

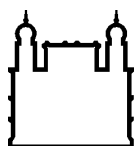
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

PAPEL DA VIA DE INOCULAÇÃO E DA GENÉTICA DO HOSPEDEIRO  
NO CURSO DA INFECÇÃO PELO ISOLADO SC2005 DE *Trypanosoma*  
*cruzi*, PROVENIENTE DE UM SURTO ORAL DA DOENÇA DE  
CHAGAS.

CAROLINA SALLES DOMINGUES

Rio de Janeiro  
Novembro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*CAROLINA SALLES DOMINGUES*

Papel da Via de Inoculação e da Genética do Hospedeiro no Curso da Infecção pelo Isolado SC2005 de *Trypanosoma cruzi*, Proveniente de um Surto Oral da Doença de Chagas.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária.

**Orientador (es):** Prof(a). Dr(a). Kátia da Silva Calabrese

**RIO DE JANEIRO**

Novembro de 2017

Domingues, Carolina Salles .

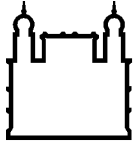
Papel da via de inoculação e da genética do hospedeiro no curso da infecção pelo isolado SC2005 de *Trypanosoma cruzi*, proveniente de um surto oral da doença de chagas. / Carolina Salles Domingues. - Rio de Janeiro, 2017. 157 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Kátia da Silva Calabrese.

Bibliografia: f. 123-137

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Infecção experimental. 4. surto oral. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: CAROLINA SALLES DOMINGUES**

**PAPEL DA VIA DE INOCULAÇÃO E DA GENÉTICA DO HOSPEDEIRO NO  
CURSO DA INFECÇÃO PELO ISOLADO SC2005 DE *Trypanosoma cruzi*,  
PROVENIENTE DE UM SURTO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS.**

**ORIENTADOR (ES): Prof(a). Dr(a). Kátia da Silva Calabrese**

**Aprovada em: 21/11/2017**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado - Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

**Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello** (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

**Prof. Dr. Juliana de Meis** (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

**Prof. Dr. Jacenir Reis dos Santos Mallet** (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ)

**Prof. Dr. Suzete Araújo Gomes** (Universidade Federal Fluminense)

Rio de Janeiro, 21 de Novembro de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por sua infinita bondade, me dando força para conquistar meus objetivos e me acalentando nos momentos de fraqueza. Pelas pessoas que colocou em minha vida, pelas oportunidades e pela presença em minha vida.

Aos meus pais, Andréia e Celso, por estarem ao meu lado, me incentivando sempre. Sou grata pelo amor, carinho e confiança em mim depositada. Obrigada por serem exemplos de companheirismo, dignidade e família. Por estarem sempre presentes, comemorando as minhas conquistas e nunca me deixando desistir.

À minha irmã, Bárbara, por poder contar com a sua amizade, apoio e carinho. Por estar sempre comigo, em todos os momentos e para o que for. Por ter me dado a afilhada mais linda do mundo, Maria Clara!

Ao meu namorado Victor, pela força, amor, companheirismo e amizade, que permanecem após 10 anos juntos. Pelo incentivo e persistência para alcançarmos nossos objetivos.

Aos meus avós, tios e primos por estarem sempre presentes, pela preocupação, carinho e por acreditarem em mim. Por compartilharmos maravilhosos momentos e lembranças, fortalecendo o amor e a amizade entre nós. Agradeço em especial as minhas primas Tatiana e Jéssica, pelo carinho e paciência, por estarem bastante presentes nesta fase da minha vida, morando juntas e compartilhando experiências.

Às minhas amigas, Fernanda Rodrigues, Fernanda e Sumaya que tornaram a minha jornada mais leve e divertida. Pela amizade e pelos momentos maravilhosos.

À doutora Kátia da Silva Calabrese, pela orientação dedicada e amiga que influenciou na minha formação e conclusão deste trabalho. Pelo apoio, ensinamentos e incentivos nesta importante etapa da minha vida.

Ao doutor Marcelo Pelajo não só pela sua colaboração, mas também pelos ensinamentos e disponibilidade, em ajudar na análise de alguns resultados.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Caroline Magalhães, Carla Arruda, Fernando Almeida, Henrique Previtalli, Mariana

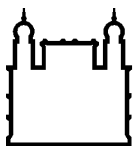
Rotini, Yasmim Rizk, Luzilene Souza, Iasmim Souza, Celeste Souza, Tânia Zaverucha, Luiz Otávio Carvalho, Luiz D'Escofier e Celso, por estarem sempre dispostos a ajudar, pela amizade, pelo ambiente maravilhoso de cooperação e dedicação.

Às minhas amigas e companheiras de experimento Daiana Hardoim e Sandy Pereira pela preocupação e disponibilidade em ajudar na realização do trabalho. Em especial, à Flávia Cardoso pela ajuda no laboratório e na revisão da tese, pela dedicação, preocupação e valiosa ajuda nos qPCRs e análise dos dados. Agradeço às três pelas risadas, conversas e conselhos.

Às plataformas de citometria de fluxo da FIOCRUZ: Plataforma de Citometria de Fluxo – Núcleo de Purificação Celular (sorting) e Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica. Pela disponibilidade e auxílio para a realização desta parte do experimento.

Aos membros da banca por aceitarem o convite, se prontificando a contribuir para mais um passo da minha formação profissional.

“A verdadeira viagem de descobrimento  
não consiste em procurar novas  
paisagens, mas em ter novos olhos.”  
(Marcel Proust)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PAPEL DA VIA DE INOCULAÇÃO E DA GENÉTICA DO HOSPEDEIRO NO CURSO DA INFECÇÃO PELO ISOLADO SC2005 DE *Trypanosoma cruzi*, PROVENIENTE DE UM SURTO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS.

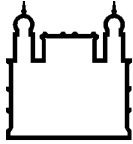
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Carolina Salles Domingues**

A doença de Chagas é um problema de saúde pública mundial, acometendo entre 6 e 7 milhões de pessoas em todo o mundo. Os diversos surtos orais da doença de Chagas que têm ocorrido mostraram a importância desta via de transmissão em humanos e ampliaram o interesse no estudo de isolados de *Trypanosoma cruzi* oriundos destes surtos. Os mecanismos envolvidos na infecção oral, assim com sua imunopatologia tanto no que diz respeito ao papel do parasito quanto do hospedeiro, são complexos e pouco discutidos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é identificar as alterações imunopatológicas causadas pela infecção do *Trypanosoma cruzi* isolado SC2005 em camundongos, analisando a influência da via de infecção, assim como da genética do hospedeiro. Para isto o presente trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira, camundongos Swiss Webster foram infectados por via intragástrica (IG) ou intraperitoneal (IP) com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC 2005, derivadas de cultura de célula. Na segunda, camundongos BALB/c e A foram infectados por via IG, pelo mesmo isolado. Foram realizadas análises hematológicas, histopatológicas e imunológicas nos camundongos infectados e controles. Os resultados mostraram uma parasitemia com picos mais tardios e menores e uma menor mortalidade nos camundongos Swiss Webster infectados pela via IG, quando comparado aos mesmos animais infectados por via IP. Por sua vez, a linhagem BALB/c apresentou maior parasitemia e mortalidade do que os animais A. Em ambos os experimentos foram observados parasitos em diferentes órgãos, com a presença de infiltrados inflamatórios e, que variaram de intensidade dependendo da via de infecção e da linhagem de camundongo estudada. Foi observado o acometimento do coração, o qual se iniciou pela região atrial, além de hematopoiese extramedular no fígado. Uma flutuação da população de linfócitos T foi notada nos diferentes tecidos de todos os animais infectados, caracterizada, principalmente, pelo aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. No soro dos animais das linhagens A e BALB/c também foi observado o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a influência da via de inoculação, no estabelecimento e desenvolvimento da infecção pelo isolado SC2005, além do papel da resposta do hospedeiro frente à infecção. O presente estudo enfatiza a importância do desenvolvimento de uma resposta imune precoce, caracterizada por um perfil celular citotóxico e produção de citocinas pró-inflamatórias para uma manifestação mais branda da doença de Chagas.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ROLE OF INOCULATION ROUTE AND HOST GENETICS IN THE COURSE OF INFECTION BY *Trypanosoma cruzi* STRAIN SC2005, FROM AN ORAL OUTBREAK OF CHAGAS DISEASE.

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Carolina Salles Domingues**

Chagas disease is a global public health problem that affects from six to seven million people worldwide. Several outbreaks of oral Chagas disease have occurred highlighting the importance of this route of transmission and extending the interest in studying *Trypanosoma cruzi* isolates from these outbreaks. The immunopathology of oral infection, as well as the roles of the parasite and host genetics, are complex and unknown. Therefore, the aim of this work is to identify the immunological alterations caused by *T. cruzi* (isolate SC2005) infection in mice, studying the influence of the infection route and host genetics. The work was divided in two parts. On the first, Swiss Webster mice were infected either by intragastric (IG) or intraperitoneal (IP) route with culture-derived trypomastigotes from the SC2005 isolate of *T. cruzi*. On the second, BALB/c and A mice were infected by IG route with the same isolate. Hematological, immunological and histopathological analysis were carried out on infected and control animals. Results showed later and milder parasitemia peaks and a lower mortality rate in Swiss Webster mice infected by the IG route, when compared with the same animals infected IP. Moreover, BALB/c mice presented higher parasitemia and mortality rate than the A animals. In both experiments, parasites and inflammatory infiltrate could be observed in several organs; however the intensity varied depending on the mouse strain and infection route. Heart alterations initiated at the atrial region. Extramedullary hematopoiesis in the liver was also observed. A fluctuation of the T lymphocyte population was noted in the different tissues of the infected animals, characterized mainly by the increase of CD8<sup>+</sup> T cells. In the serum of infected A and BALB/c mice, increased production of proinflammatory cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was observed. The results of this study show the influence of the infection route on the establishment and development of the *T. cruzi* SC2005 isolate, as well as the role of the host response to infection. The present study emphasizes the importance of an early development of the immune response, characterized by a cytotoxic cellular profile and production of proinflammatory cytokines for a milder manifestation of Chagas disease.

# ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VVIII
1 INTRODUÇÃO	1
<b>1.1 Transmissão</b>	<b>2</b>
1.1.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.1.2 O parasito	5
1.1.3 Infecção oral	7
<b>1.2 Glicoproteínas de superfície</b>	<b>9</b>
<b>1.3 A doença de Chagas</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Tratamento</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Justificativa</b>	<b>14</b>
2 OBJETIVOS	16
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>16</b>
2.2.1 Camundongos Swiss Webster infectados pelas vias IG e IP com o isolado SC 2005 de <i>T. cruzi</i>	16
2.2.2 Camundongos A e BALB/c infectados pela via IG com o isolado SC 2005 de <i>T. cruzi</i>	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
<b>3.1 Parte I – Camundongos Swiss Wwebster infectados via IG e IP com o isolado SC 2005 de T. cruzi</b>	<b>18</b>
3.1.1 Animais	18
3.1.2 Parasito	18
3.1.2.1 Caracterização do isolado	18
3.1.2.2 Obtenção de formas tripomastigotas derivadas de cultura de célula VERO de <i>T. cruzi</i>	20
3.1.3 Desenho experimental	21
3.1.4 Parasitemia e Mortalidade	21
3.1.5 Leucometria global	21
3.1.6 Leucometria diferencial absoluta	22

3.1.7	Histopatologia .....	22
3.1.7.1	<i>Técnica de Hematoxilina-eosina</i> .....	23
3.1.7.2	<i>Técnica de Giemsa de Lennert (Lennert 1978)</i> .....	24
3.1.7.3	<i>Técnica de Picrosirius Red (Sweat et al. 1964)</i> .....	24
3.1.8	Identificação de populações celulares por citometria de fluxo .....	24
3.1.9	Identificação da presença de DNA do <i>T. cruzi</i> por PCR .....	26
3.1.9.1	<i>Extração do DNA tecidual</i> .....	26
3.1.9.2	<i>PCR</i> .....	27
3.1.10	Análise estatística .....	29
<b>3.2</b>	<b>Parte II – Camundongos A e BALB/c infectados via IG com o</b>	
	<b>isolado SC 2005 de <i>T. cruzi</i>.</b> .....	<b>30</b>
3.2.1	Animais .....	30
3.2.2	Parasito .....	30
3.2.2.1	<i>Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i>, cepa SC2005, derivadas de cultura axênica</i> .....	30
3.2.2.1.1.	<i>Avaliação da gp82, gp90 e gp35/50 na superfície do parasita</i> .....	31
3.2.3	Desenho experimental .....	31
3.2.4	Parasitemia e Mortalidade .....	32
3.2.5	Análise hematológica .....	32
3.2.6	Dosagem de citocinas .....	32
3.2.7	Histopatologia .....	33
3.2.8	Caracterização fenotípica de populações celulares por citometria de fluxo .....	33
3.2.9	Quantificação dos parasitas por qPCR .....	34
3.2.9.1	<i>Extração de DNA dos tecidos</i> .....	35
3.2.9.2	<i>qPCR</i> .....	35
3.2.10	Análise estatística .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Parte I – Infecção de camundongos Swiss Webster com o</b>	
	<b>isolado SC 2005 de <i>T. cruzi</i>, pelas vias IG e IP.</b> .....	<b>37</b>
4.1.1	Caracterização do isolado .....	37
4.1.2	Parasitemia e Mortalidade .....	37

4.1.3	Cinética de leucometria global e diferencial.....	40
4.1.4	Histopatologia.....	44
4.1.4.1	<i>Análise histológica dos órgãos dos animais controle não infectados</i> .....	44
4.1.4.2	<i>Análise histopatológica dos órgãos dos camundongos da linhagem Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal (IP)</i> .....	44
4.1.4.3	<i>Análise histopatológica dos órgãos dos camundongos da linhagem Swiss Webster infectados pela via intragástrica (IG)</i> .....	48
4.1.5	Quantificação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> por citometria de fluxo.....	51
4.1.5.1	<i>Baço</i> .....	51
4.1.5.2	<i>Sangue</i> .....	51
4.1.5.3	<i>Linfonodos mesentéricos</i> .....	52
4.1.6	PCR.....	52
<b>4.2</b>	<b>Parte II – Infecção de camundongos A e BALB/c com o isolado SC 2005 de <i>T. cruzi</i>, pela via IG</b> .....	<b>56</b>
4.2.1	Avaliação de proteínas de superfície das formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> .....	56
4.2.2	Parasitemia e Mortalidade.....	58
4.2.3	Avaliação do hemograma.....	60
4.2.4	Dosagem de citocinas.....	66
4.2.5	Histopatologia.....	68
4.2.5.1	<i>Análise histológica dos órgãos dos animais controle não infectados</i> .....	68
4.2.5.2	<i>Análise histopatológica dos órgãos dos camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica (IG) com formas tripomastigotas metacíclicas de T.cruzi</i> .....	68
4.2.5.3	<i>Análise histopatológica dos órgãos dos camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragástrica (IG) com formas tripomastigotas metacíclicas de T.cruzi</i> .....	78
4.2.6	Citometria de fluxo.....	89
4.2.6.1	<i>Coração</i> .....	89

4.2.6.2	<i>Fígado</i> .....	94
4.2.6.3	<i>Sangue</i> .....	100
4.2.7	PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR) .....	105
5	DISCUSSÃO	109
6	CONCLUSÕES	122
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
8	APÊNDICES	138
	APÊNDICE A- LICENÇA LW 16/11	138
	APÊNDICE B- LICENÇA LW 42/14	139
	APÊNDICE A- ARTIGO: ORAL OUTBREAK OF CHAGAS DISEASE IN SANTA CATARINA, BRAZIL: EXPERIMENTAL EVALUATION OF A PATIENT'S STRAIN	140

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 4.1	Visualização em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR do <i>T. cruzi</i> , isolado SC2005 (PM- Peso Molecular; 1- Cepa Dm28/ <i>T. cruzi</i> (Tc I); 2- Cepa Y/ <i>T. cruzi</i> (Tc II); 3- 4167 (Tc III); 4- Cepa SC2005/ <i>T. cruzi</i> (Tc II) e 5- Controle Negativo).	38
FIGURA 4.2	Parasitemia dos camundongos Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal ou intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, derivadas de cultura de célula.	39
FIGURA 4.3	Curva de sobrevivência dos camundongos Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal ou intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, derivadas de cultura de célula.	39
FIGURA 4.4	Leucometria global e diferencial dos camundongos Swiss Webster controles e infectados pela via intraperitoneal ou intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, derivadas de cultura de célula.	41
FIGURA 4.5	Teste de Spearman dos camundongos Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal com $10^7$ formas tripomastigotas derivadas de cultura de célula de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	42
FIGURA 4.6	Teste de Spearman dos camundongos Swiss Webster infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas derivadas de cultura de célula de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	43
FIGURA 4.7	Alterações histopatológicas nos camundongos Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal com $10^7$ formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, derivadas de cultura de célula.	46
FIGURA 4.8	Alterações histopatológicas nos camundongos Swiss Webster infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, derivadas de cultura de célula.	49
FIGURA 4.9	Eletroforese em gel de agarose a 2%, mostrando os produtos de 330 pb da PCR utilizando os primers 121 e 122.	54
FIGURA 4.10	Avaliação, por Western blotting, das glicoproteínas de superfície gp82, gp90 e gp35/50 de culturas axênicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, com 7 (AM1), 15 (AM2) e 22 (AM3) dias.	57
FIGURA 4.11	Parasitemia dos camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC2005.	59
FIGURA 4.12	Curva de sobrevivência dos camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas	59

metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC 2005.

FIGURA 4.13	Eritrograma dos camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	62
FIGURA 4.14	Hemograma dos camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	64
FIGURA 4.15	Dosagem de citocinas no soro dos camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005	67
FIGURA 4.16	Histopatologia do estômago e coração de camundongos da linhagem A infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 7 dpi.	69
FIGURA 4.17	Histopatologia do esôfago e estômago de camundongos da linhagem A infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 14 dpi.	71
FIGURA 4.18	Histopatologia do coração de camundongos da linhagem A infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 14 dpi.	72
FIGURA 4.19	Histopatologia do fígado de camundongos da linhagem A infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 14 dpi.	73
FIGURA 4.20	Histopatologia do esôfago e estômago de camundongos da linhagem A infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 21 dpi.	75
FIGURA 4.21	Histopatologia do coração, tecido adiposo adjacente e fígado de camundongos da linhagem A infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 21 dpi.	76
FIGURA 4.22	Histopatologia do esôfago, estômago, coração, tecido adiposo adjacente e fígado de camundongos da linhagem A infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 40 dpi.	77
FIGURA 4.23	Histopatologia do estômago, coração e fígado de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 7 dpi.	79
FIGURA 4.24	Histopatologia do estômago de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos	80

	14 dpi.	
FIGURA 4.25	Histopatologia do coração de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 14 dpi.	81
FIGURA 4.26	Histopatologia do fígado de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 14 dpi.	83
FIGURA 4.27	Histopatologia do estômago de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 21 dpi.	84
FIGURA 4.28	Histopatologia do coração e fígado de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 21 dpi.	85
FIGURA 4.29	Histopatologia do estômago, coração e fígado de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005, aos 40 dpi.	87
FIGURA 4.30	Análise da dinâmica de subpopulações de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e/ou CD8 <sup>+</sup> no coração de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragastrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	90
FIGURA 4.31	Análise da dinâmica de populações de linfócitos B CD19 <sup>+</sup> , macrófagos F4/80 <sup>+</sup> e células inflamatórias no coração de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	93
FIGURA 4.32	Análise da dinâmica de subpopulações de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e/ou CD8 <sup>+</sup> no fígado de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	95
FIGURA 4.33	Análise da dinâmica de populações de linfócitos B CD19 <sup>+</sup> , macrófagos F4/80 <sup>+</sup> , megacariócitos CD41 <sup>+</sup> e células inflamatórias no fígado de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	98
FIGURA 4.34	Análise da dinâmica de subpopulações de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e/ou CD8 <sup>+</sup> no sangue de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com $10^7$ formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , isolado SC 2005.	101
FIGURA 4.35	Análise da dinâmica de populações de linfócitos B CD19 <sup>+</sup> e células inflamatórias no sangue de camundongos A e BALB/c	104



controles e infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC 2005.

- FIGURA 4.36 Quantificação de DNA do *T. cruzi*, por qPCR, no estômago de camundongos A e BALB/c infectados pela via intragastrica com  $10^7$  formas tripomastigotas do isolado SC2005 106
- FIGURA 4.37 Quantificação de DNA do *T. cruzi*, por qPCR, no coração de camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas do isolado SC 2005. 107
- FIGURA 4.38 Quantificação de DNA de *T. cruzi*, por qPCR, no estômago e coração de camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas do isolado SC2005. 108

## LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1	Análise dos perfis de linfócitos T no baço, sangue e linfonodos mesentéricos de camundongos inoculados pelas vias IG e IP com o isolado SC2005 de <i>T. cruzi</i> .	53
------------	---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Alofococianina
APC-H7	Alofococianina H7
BB515	Brilliant Blue 515
BV421	Brilliant Violet 421
CH	Contagem de Hemácias
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CL	Contagem global de Leucócitos
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dpi	dia pós-infecção
DTU	Discrete Typing Units
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hct	Hematócrito
Hgb	Hemoglobina
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IG	Intragástrica
IL-10	Interleucina - 10
IL-17 <sup>a</sup>	Interleucina- 17A
IL-2	Interleucina- 2
IL-4	Interleucina - 4
IL-6	Interleucina- 6
LIT	Liver Infusion Triptose
mAb	anticorpo monoclonal
PBS	Tampão Fosfato Salínico
PBS-BSA	Tampão Fosfato Salínico- Albumina Sérica Bovina
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformoldeido
PLT	Plaquetas
q-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
qsp	Quantidade suficiente para
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Meio de cultura celular)

SEM	Erro médio padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
SFC	Soro Fetal de Cavalo
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
VCM	Volume Corpuscular Médio

# 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma zoonose parasitária, sistêmica e crônica causada pelo parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta doença é determinada por uma fase aguda, que ocorre durante as primeiras semanas de infecção, e uma fase crônica, que pode acarretar na população acometida lesões irreversíveis e crônicas no coração, no sistema digestório e no sistema nervoso (Bern 2015; PAHO 2016).

Atualmente, esta enfermidade acomete entre 6 e 7 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a maioria residente nas áreas endêmicas de 21 países nas Américas Central e do Sul (Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela) (WHO 2017). Nestas regiões, a incidência anual da doença de Chagas é de cerca de 28.000 casos causando em torno de 7.000 mortes por ano, sendo a doença parasitária que mais leva a óbito na América Latina. Além disso, nas Américas, aproximadamente 65 milhões de pessoas estão susceptíveis a contrair essa doença (PAHO 2016; Chatelain 2017).

Argentina, Brasil e México são os três países com o maior número estimado de pessoas acometidas pela doença de Chagas na região da América Latina, com 26%, 20% e 15% do total de infectados respectivamente. No entanto, se forem considerados o número total de casos de cada país em relação ao número da sua respectiva população, uma alta prevalência da doença de Chagas, acima de 3%, é observada na Argentina e Bolívia. O Brasil apresenta uma baixa prevalência de 0,6%, com 6 pessoas infectadas a cada 1000 habitantes (WHO 2015; Dias et al. 2016).

Apesar do grande número de casos registrados nas Américas Central e do Sul, a doença deixou de ser um problema isolado de saúde pública e passou a se estender a outros continentes. Nas últimas décadas o número de pacientes acometidos pela doença em regiões da América do Norte, Japão, Austrália e muitos países da Europa têm aumentado. A ocorrência de casos fora das regiões endêmicas e até mesmo em regiões sem transmissão vetorial é resultado da grande mobilidade da população mundial, seja por migração, viagens e até mesmo processos internacionais de adoção de crianças, e das diferentes formas de transmissão da doença (Filigheddu et al. 2017; WHO 2017).

## 1.1 Transmissão

Desde sua descrição em 1909 pelo médico sanitário Carlos Chagas, a doença de Chagas ou tripanossomíase americana vem apresentando diferentes perfis epidemiológicos. A evolução dos cenários epidemiológicos se deve tanto às variadas formas de transmissão de seu agente etiológico, que vem sendo descritas ao longo dos anos, como ao desenvolvimento de diferentes estratégias de prevenção e combate à transmissão da doença. Apesar dos progressos alcançados, ao longo dos anos, tanto no controle da transmissão, quanto no apoio contínuo de diferentes organizações à população atingida, esta doença ainda afeta indivíduos das populações de baixa renda, sendo considerada negligenciada pelas autoridades (Molyneux et al. 2017).

As diversas vias de transmissão da doença como a transfusional (Moncayo 1999; Moncayo 2003), a transplacentária ou congênita (WHO 1991; Prata 2001; WHO 2005), por transplantes de órgãos (Prata 2001), acidentes de laboratório (Coura et al. 2002; Dias 2006); sexual (Vianna, 1911; Araújo et al. 2017) e pela ingestão de alimentos contaminados (Coura et al. 2002; Dias 2006) continuam ocorrendo e garantindo a manutenção desta zoonose.

Ações sistematizadas de programas regionais, visando o controle químico do vetor da doença, como as ocorridas nos países do Cone Sul, do Pacto Andino e América Central, mostraram uma redução significativa de novos casos da doença, que passaram de 700.000 em 1990 para 41.200 em 2006. Tais ações levaram o Brasil a receber em 2006 uma certificação internacional pela interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, inseto de hábito essencialmente domiciliar, considerado na época, o principal responsável pela transmissão vetorial do *T. cruzi* (Ministério da Saúde 2015; WHO 2017). Além disso, também foi alcançada em 2010, a interrupção da transmissão vetorial pelo vetor *Rhodnius prolixus*, em todos os países da América Central, além da Costa Rica, El Salvador e México (Hashimoto & Schofield 2012). Apesar do controle do principal vetor da doença de Chagas, vetores secundários como *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*, ainda desempenham um importante papel na transmissão da doença para o homem. A maioria das espécies de vetores conhecidas vive no meio silvestre, no entanto, ainda podem ser encontradas em distintas regiões do Brasil diferentes espécies de triatomíneo habitando regiões domiciliares e peridomiciliares (Ministério da Saúde 2009).

A partir da década de 1980, o controle sorológico de doadores nos bancos de sangue foi responsável por uma expressiva redução da transmissão transfusional, que com o combate ao inseto vetor, se tornava o principal mecanismo de transmissão. Tais iniciativas foram responsáveis, no Brasil, por uma redução, tanto da prevalência de soropositividade nos bancos de sangue, que passou de 6,9%, em 1970, para 0,2%, na década de 90, quanto do índice de transmissão anual, via transfusão de sangue, de 20.000 para 13 em quatro décadas (Moraes-Souza & Ferreira-Silva 2011). Além disso, 19 dos 21 países da América Latina alcançaram a realização de 100% da triagem de doadores de sangue (WHO 2015).

Graças ao controle vetorial e ao controle sorológico nos bancos de sangue e órgãos, segundo dados do Ministério da Saúde, a transmissão oral é, atualmente, a principal via de infecção da doença (Ministério da Saúde 2015). Esta via tem se mostrado altamente eficiente, já que até mesmo triatomíneos que não eram considerados vetores em potencial conseguem atuar na transmissão oral do parasito (de Noya & González 2015). Atualmente, numerosos casos da doença de Chagas têm sido associados com a transmissão oral no Brasil, Colômbia e Venezuela (Filigheddu et al. 2017). No Brasil, entre os anos de 2000 a 2013 foram notificados 1.570 casos de doença de Chagas aguda, sendo a maioria destes casos (91,1%) registrados na região Norte, onde o estado do Pará foi responsável por 82% dos casos, seguida pelas regiões Nordeste (4,7%), Sul (1,8%), Centro-Oeste (1,7%) e Sudeste (0,8%). Dos casos registrados neste período, 68,9% ocorreram através da transmissão oral (Ministério da Saúde 2015).

A alteração na epidemiologia da transmissão da doença de Chagas no Brasil aconteceu devido à ocorrência de diversos casos da infecção adquirida pela via oral em regiões onde o vetor da enfermidade não está presente, pelas modificações ambientais, demográficas, econômicas e sociais, além das alterações realizadas no controle e vigilância da doença (Dias et al. 2016). Devido a essas mudanças do quadro epidemiológico da doença, no Brasil, foi adotado um novo modelo de vigilância epidemiológica, de acordo com os padrões de transmissão de cada área geográfica do país (Ministério da Saúde 2017). No entanto, essas ações e estratégias de vigilância ainda precisam ser mais detalhadas, para promover melhorias nas práticas sobre políticas de vigilância epidemiológica, no acompanhamento clínico dos casos da doença de Chagas e nos processos de educação em saúde (de Góes Costa et al. 2017).

### **1.1.1 Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi**

A doença de Chagas teve início nas populações humanas como uma enzootia, onde a transmissão do *T. cruzi* ocorria em um ciclo silvestre entre animais e vetores selvagens, sendo acidentalmente transmitida aos seres humanos. A transmissão do parasito aos hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, acontece através de vetores hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae, denominados triatomíneos, sendo, portanto, o *T. cruzi*, um parasito heteroxeno (Chagas 1909; Tyler & Engman 2001; Coura 2015).

Existem mais de 140 espécies de triatomíneos distribuídas pela América Latina, dentre as quais os gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* estão entre os principais vetores do *T. cruzi*. Além disso, existem dezenas de espécies de mamíferos silvestres e domésticos distribuídos em diversos biomas, que são reservatórios para este parasito. A extensa distribuição, nos mais distintos ecótopos, de vetores e reservatórios, contribui para a ocorrência de distintos focos naturais de transmissão (Coura 2015; Dias et al. 2016).

Durante muitos anos, a doença de Chagas esteve restrita ao ambiente rural. No entanto, as modificações ocorridas na sociedade ao longo dos anos tais como: o êxodo rural, o desmatamento, as mudanças socioeconômicas e a urbanização modificaram o perfil epidemiológico desta enfermidade. Com o desmatamento em áreas geográficas que abrigam triatomíneos, houve a adaptação destes às áreas peridomiciliares e domiciliares. A doença de Chagas foi classificada como uma antropozoonose, uma vez que seres humanos se infectavam, quando ocupavam o ambiente silvestre ou quando vetores e/ou reservatórios silvestres invadiam ambientes domésticos. Com a domiciliação de vetores e reservatórios, a transmissão do *T. cruzi* ocorre também em um ciclo doméstico, envolvendo hemípteros domiciliados, homens e animais domésticos, tornando a doença um fenômeno mais urbano/periurbano. No cenário atual, com a infecção permutando entre animais e humanos, a doença de Chagas ocorre como uma zoonose (Coura & Dias 2009; Coura 2015; Dias et al. 2016).

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve três formas evolutivas diferentes do parasito: epimastigota, tripomastigota e amastigota, nas quais as transformações morfológicas ocorridas estão relacionadas à interação do parasito com o hospedeiro mamífero e o inseto vetor (Goldenberg & Ávila 2011). O inseto vetor, quando infectado, apresenta formas epimastigotas, não infectivas, em seu intestino anterior, as quais se replicam



por reprodução assexuada e migram para a porção distal do intestino, onde sofrem o processo de metaciclogênese se diferenciando em tripomastigotas metacíclicas, infectivas para os hospedeiros mamíferos. No momento do repasto sanguíneo o inseto, subsequentemente, defeca próximo à área da lesão causada por sua picada liberando formas tripomastigotas metacíclicas. A infecção do hospedeiro pode ocorrer através do local da picada, por lesões da pele, ou pelo contato da mão contaminada com o parasito presente na dejeção dos barbeiros, com as mucosas da boca ou dos olhos. Uma vez no interior do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas invadem as células ou são fagocitadas, principalmente por macrófagos, onde os parasitos, evadem do vacúolo parasitóforo, alcançam o citoplasma e diferenciam-se em amastigotas, formas não infectivas, que se replicam assexuadamente. Após completar diversos ciclos de multiplicação, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, que lisam as células hospedeiras podendo infectar células próximas, ou se dispersar através da corrente sanguínea (Engman & Leon 2002; Andrade & Andrews 2005). No momento de um novo repasto sanguíneo, no hospedeiro mamífero infectado, os triatomíneos ingerem formas tripomastigostas sanguíneas do *T. cruzi*, que, no intestino anterior, se diferenciam em epimastigotas, dando continuidade ao ciclo de vida deste parasito (Chagas 1909; Tyler & Engman 2001).

### **1.1.2 O parasito**

O *T. cruzi* durante seu ciclo de vida apresenta diferentes formas evolutivas, as quais se desenvolvem em diferentes hospedeiros e possuem característica definidas. As formas amastigotas, com aproximadamente 5 µm de comprimento, são caracterizadas pelo formato esférico ou oval, cinetoplasto visível e corpo achatado com flagelo não exteriorizado, restrito a bolsa flagelar. As formas epimastigotas, medem 20 a 40 µm de comprimento, possuem cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre. As formas tripomastigotas possuem aproximadamente 25 µm de comprimento e caracterizam-se pela presença do cinetoplasto posterior ao núcleo, flagelo livre e membrana ondulante que percorre toda extensão da célula (Hoare 1972; Tyler & Engman 2001; Burleigh & Woolsey 2002).

Além das características que diferem as formas evolutivas, são observadas particularidades comuns à ordem. A ordem Kinetoplastida, da qual o *T. cruzi* é membro, se caracteriza pela presença de um único flagelo e uma mitocôndria única, que percorre toda extensão celular. O DNA mitocondrial, denominado kDNA, é

mantido de forma organizada e compactada pela presença de proteínas básicas associadas ao DNA, formando uma estrutura denominada cinetoplasto (Sibley 2011). O kDNA representa cerca de 20 a 30% do DNA total do parasito e está organizado sob a forma de maxi e minicírculos (Cano et al. 1995; Shapiro & Englund 1995). Outras estruturas e organelas intracelulares especializadas como glicosossomos, citóstomo, reservossomo, acidocalcissoma e vacúolo contrátil estão presentes nos parasitos pertencentes a esta ordem (Souza 2009).

A membrana plasmática que envolve a célula atua de forma altamente seletiva e específica no sentido de interligar funcionalmente o ambiente extra e intracelular. Dependendo da forma evolutiva na qual se encontram os parasitos e da virulência deste, diferenças significativas na conformação e na constituição da membrana podem ser notadas. Abaixo da membrana plasmática está presente um conjunto de microtúbulos em arranjo helicoidal ao longo de todo o corpo celular, conferindo maior rigidez e garantindo a manutenção da forma do parasito, exceto no cistóstoma, região envolvida na captação de macromoléculas do meio extracelular (Souza 2009).

O flagelo do *T. cruzi*, presente em todas as formas evolutivas do parasito, é formado por uma estrutura básica semelhante a outros flagelos. Este é composto por um axonema formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, envolvido por uma membrana que emerge da bolsa flagelar. Nas formas evolutivas epimastigotas e tripomastigotas, uma estrutura denominada corpo paraxial ou estrutura paraflagelar está presente. Esta estrutura está localizada ao lado do axonema, sendo formada por um complexo arranjo de filamentos de diferentes espessuras compostos por diversas proteínas (Bastin & Gull 1999).

Apesar das características comuns apresentadas pelo *T. cruzi*, uma grande variabilidade genética é observada dentro desta espécie. Estas diferenças são responsáveis por uma grande diversidade de isolados, os quais são classificados em distintos grupos. Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos abordando a caracterização de subpopulações de *T. cruzi*. O parasito apresenta inúmeros isolados distribuídos entre diferentes espécies de insetos vetores e hospedeiros mamíferos domésticos e silvestres (Zingales et al. 1998).

Atualmente, a classificação intraespecífica do *T. cruzi* é feita em Unidades Discretas de Tipagem (DTUs- Discrete Typing Units). Em um consenso de nomenclatura, ocorrido no ano de 2009, foram definidas seis DTUs de TcI a TcVI, incluindo, recentemente, um novo genótipo associado a morcegos antropogênicos com potencial para infectar humanos, o TcBat detectado no Brasil, Panamá e

Colômbia (Zingales et al. 2009; Zingales et al. 2011; Messenger et al. 2015). As subdivisões em DTUs estão associadas a padrões ecológicos, de transmissão (ciclo doméstico / silvestre) e de manifestações clínicas da doença (Ramírez & Hernández 2017).

Os isolados pertencentes ao grupo TcI são os mais abundantes e possuem ampla dispersão nas Américas. São encontrados em uma ampla gama de triatomíneos e estão associados com os ciclos silvestre e doméstico do *T. cruzi*. Infecções humanas com isolados TcI estão geralmente associadas à cardiomiopatia chagásica. A DTU TcII é encontrada em ciclos domésticos principalmente nas regiões sul e central da América do Sul, estando associada a manifestações cardíacas, que podem estar acompanhadas por megaesôfago e megacólon. Os isolados TcIII estão normalmente associados ao ciclo silvestre do *T. cruzi* com poucas infecções humanas descritas, sua distribuição ocorre no Brasil e países adjacentes. O TcIV mostra um padrão de distribuição semelhante ao observado na DTU TcIII, porém sua frequência em infecções humanas é alta, sendo a segunda causa da doença de Chagas na Venezuela. TcV e TcVI são DTUs híbridas associadas a ciclos domésticos que ocorrem no sul e centro da América do Sul (Zingales et al. 2011). A maioria dos casos de doença de Chagas adquirida pela via oral foi devido a isolados pertencentes à DTU TcI, com raros casos envolvendo TcIII e TcIV, sendo notificados no sul do Brasil surtos associados ao TcII (Zingales et al. 2011; Ramírez & Hernández 2017).

Apesar de diversos estudos tentarem relacionar localização geográfica com o isolado de *T. cruzi* e o tipo de patologia induzida, esta correlação depende de diferentes fatores como a idade e a genética do hospedeiro, a origem geográfica, a via de infecção, entre outros. Além disso, nenhuma evidência clara foi observada entre a morbidade crônica e a variabilidade genética do *T. cruzi* (Messenger et al. 2015; Chatelain 2017).

### **1.1.3 Infecção oral**

Em humanos, a primeira microepidemia da doença de Chagas transmitida por via oral foi relatada por Mazza et al. (1936). Os autores descreveram a transmissão do *T. cruzi* por meio do leite materno. Na Argentina, relatos de casos humanos foram descritos na região do Chaco através do consumo de uma bebida composta por várias ervas e sangue de tatu, provavelmente contaminado, ou pelo consumo de carne de animais silvestres mal cozida (Valente et al. 2006). No Brasil, a primeira microepidemia foi registrada em 1965 em Teutônia, RS onde, simultaneamente, 17 pessoas se

contaminaram após a ingestão de alimentos contaminados com secreções de animais silvestres (Coura 1966; Nery-Guimarães et al. 1968). A segunda microepidemia, em 1969, foi registrada em uma família residente em Belém (PA) onde os estudos epidemiológicos sugeriram a hipótese de transmissão por alimentos contaminados com fezes de triatomíneos (Shaw et al. 1969).

No entanto, os casos de doença de Chagas aguda, no Brasil, passaram a ser oficialmente investigados a partir do primeiro surto de transmissão oral da infecção, relatado na cidade de Navegantes, Santa Catarina, no ano de 2005. A provável fonte de infecção apontada foi a ingestão de caldo de cana contaminado com o *T. cruzi*. A partir do estudo deste surto, percebeu-se o importante papel da transmissão oral entre as formas de transmissão da doença (Ministério da Saúde, 2015). Surtos da doença de Chagas adquirida pela via oral, foram observados mais frequentemente na região Norte do país, contribuindo para o aumento do número de casos registrados. Entre os anos de 2005 e 2013 foram registrados 112 surtos no Brasil, sendo apontada como a provável fonte de infecção o consumo de alimentos como o açaí, o caldo de cana, a bacaba, jaci e o palmito de babaçu, todos contaminados com *T. cruzi*. A região Amazônica foi a mais comprometida, envolvendo 35 municípios. Dentre os estados mais afetados estavam o Pará e o Amapá, onde foram detectados 85 (75,9%) e 14 (12,5%) surtos respectivamente (Ministério da Saúde 2015).

Mais recentemente, no Brasil, Colômbia e Venezuela, diversos surtos da doença têm sido descritos, associados, sobretudo, ao consumo de bebidas produzidas com frutas e outros vegetais contaminados com secreções de reservatórios, mas principalmente, com dejeções de triatomíneos (Rueda et al. 2014; de Noya & González 2015; Filigheddu et al. 2017). No Equador e Argentina, casos esporádicos ocorreram associados ao consumo de carne mal cozida de animais contaminados. Em 2015, no Brasil, foi registrado um pequeno surto na cidade de Carauari-AM, onde 12 pessoas se infectaram pelo consumo de açaí contaminado com o *T. cruzi* (SUSAM 2015). No mesmo ano, foram notificados pela Secretaria de Saúde do Rio Grande do Norte (SESAP-RN) 14 casos confirmados da doença de Chagas aguda, onde foi relatado, pelos envolvidos, o consumo de caldo de cana proveniente da mesma fazenda, indicando uma possível infecção por via oral (SESAP 2016).

## 1.2 Glicoproteínas de superfície

Na tentativa de entender o mecanismo de infecção oral na doença de Chagas, vários estudos têm sido realizados desde a década de 1920. Utilizando diversos modelos experimentais, os estudos mostraram que o estabelecimento da infecção pode ocorrer com a ingestão de diferentes formas evolutivas do parasito (Cardoso 1933; Kofoid & Donat 1933; Dias 1940; Marsden 1967). No entanto, variações na infectividade ocorrem por diversos fatores. Diferenças na presença e na abundância de glicoproteínas de superfície do parasito, apresentado por diferentes isolados e formas evolutivas, determinam a eficiência na migração através da mucosa gástrica, na invasão deste epitélio e na multiplicação neste órgão (Clemente et al. 2016; Maeda et al. 2016).

Estas glicoproteínas presentes na membrana das diversas formas evolutivas do *T. cruzi* são responsáveis pela interação do parasito com o hospedeiro, as quais variam em decorrência das alterações ambientais sofridas durante o ciclo de vida do parasito. Tripomastigotas metacíclicas expressam glicoproteínas de superfície como a gp82, responsável pela ligação dos parasitos à mucina gástrica e consequente penetração na mucosa adjacente. A ligação desta molécula ao seu receptor dispara uma cascata de sinalização intracelular, por diferentes vias, resultando na mobilização de  $Ca^{+}$  do retículo endoplasmático para o citossol. A elevação do  $Ca^{+}$  citossólico induz dois eventos associados como: a desorganização do citoesqueleto e a mobilização de lisossomos. Estes dois eventos estão associados à formação do vacúolo parasitóforo e ao subsequente processo de invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi* (Maeda et al. 2012). A importância da gp82 para a infecção de células hospedeiras também foi comprovada por Eickoff et al. (2010) os quais mostraram que a opsonização de tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* por anticorpos anti-gp82-específicos leva a uma redução da infecção na mucosa.

Outras glicoproteínas de superfície também são descritas atuando na interação parasito-hospedeiro. Covarrubias et al. (2007) descreveram a presença das glicoproteínas gp82, gp90, gp35/50 na cepa SC2005 de *T. cruzi* e verificaram que a interação destas com componentes presentes no estômago do hospedeiro (pepsina e mucina) interferem na capacidade de invasão do parasito na infecção oral. A gp35/50, além de proteger o parasito contra a ação do suco gástrico, também possui uma afinidade com a mucosa gástrica, embora menos intensa que a apresentada pela gp82 (Niyogi et al. 2014).

Contrariamente, a presença da gp90 está inversamente relacionada à capacidade de infecção do parasito, uma vez que esta molécula regula negativamente o processo. Esta glicoproteína interage com as células do hospedeiro, porém, ao contrário da gp82, não leva ao aumento do Ca<sup>+</sup> citossólico e consequente invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi*. Cepas com alta capacidade de invasão celular, como a CL, expressam pequenos níveis de gp90, indicando a modulação negativa desta glicoproteína durante a invasão (Hoft et al. 1996; Ruiz et al. 1998; Neira et al. 2003; Yoshida 2009).

Estudos recentes mostraram que ambas, gp82 e gp90, além de estarem presentes na superfície do parasito, também são liberadas espontaneamente por este no meio extracelular. Estas proteínas de superfície liberadas pelas formas metacíclicas de *T. cruzi* prejudicam a invasão da célula hospedeira pelo parasito, pois as moléculas livres de gp82 competem com a proteína expressa na superfície do parasito para a ligação ao receptor da célula hospedeira. Além disso, a presença da gp90 liberada resulta na manutenção dos lisossomos próximo à área perinuclear da célula hospedeira, contribuindo para a modulação negativa do processo de invasão (Clemente et al. 2016).

Ao passo que tripomastigotas sanguíneas e tripomastigotas derivadas de cultura de célula expressam a glicoproteína TC85-11, pertencente à mesma superfamília da gp82, a qual se liga à laminina e permite a passagem dos parasitos através da matriz extracelular (Giordano et al. 1999). Apesar das diferenças apresentadas entre as formas evolutivas do *T. cruzi*, ambas são igualmente capazes de atravessar a barreira de mucina gástrica e alcançar as células alvo. A gp82, por se ligar a mucina gástrica, é adequada para dar início a infecção pela via oral, enquanto Tc85-11, por apresentar afinidade pela laminina, facilita a disseminação do parasito através de diversos tecidos e órgãos (Cortez et al. 2012).

Essa capacidade do *T. cruzi* em invadir e multiplicar-se no epitélio da mucosa gástrica murina foi demonstrada por Hoft et al. (1996), onde este epitélio foi identificado como a única porta de entrada para uma infecção sistêmica. Posteriormente, de Noya e González (2015), realizaram estudos com cães e demonstraram, através de estudos histopatológicos, uma possível penetração do *T. cruzi* através das mucosas oral, esofágica, gástrica e intestinal. Mais recentemente, um estudo realizado com camundongos BALB/c infectados por via oral, com isolado de *T. cruzi* geneticamente modificado para a expressão de luciferase fluorescente,

sugere a região nasomaxilar como a principal porta de entrada do *T. cruzi* para uma infecção sistêmica (Silva-dos-Santos et al. 2017).

### 1.3 A doença de Chagas

O período de latência da infecção varia de 3 a 22 dias, na doença adquirida pela via oral, enquanto na transmissão vetorial este período varia de 15 a 20 dias. O desenvolvimento da doença de Chagas ocorre em duas fases clínicas, a fase aguda da infecção, com duração de até dois meses após o contato com o *T. cruzi*, e a fase crônica, mais tardia, que ocorre após o término da primeira.

A fase aguda da doença pode ser assintomática ou caracterizada pela presença de manifestações clínicas variadas, envolvendo de 5 a 10% dos casos. Estas podem ser mais brandas como febre persistente, astenia, edema de face e/ou membros e cefaleia ou mais graves como, hepatomegalia, miocardite associada a taquicardia/arritmias, esplenomegalia e meningoencefalite. As manifestações clínicas desenvolvidas durante a infecção oral tendem a ser mais graves, quando comparadas com a via vetorial. Nesta fase a parasitemia é elevada, com a mortalidade alcançando de 2 a 8% dos casos adquiridos pela via vetorial (Chatelain 2017; de Góes Costa et al. 2017; Filigheddu et al. 2017). Entre os pacientes que adquirem o *T. cruzi* pela via oral a mortalidade pode atingir 33%, sendo a miocardite a principal causa de morte (Filigheddu et al. 2017).

Na fase aguda, diversos órgãos são afetados e diversos trabalhos objetivando esclarecer os mecanismos envolvidos na resposta imune contra o *T. cruzi* durante esta fase têm sido desenvolvidos ao longo dos anos. As imunidades inata e adaptativa desempenham um importante papel para o controle da infecção, através da ação conjunta de diferentes tipos celulares, como células Natural-Killer (NK), linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, além da produção de anticorpos pelos linfócitos B. Uma resposta imune resistente ao *T. cruzi* tem sido associada à produção de citocinas inflamatórias, como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais estimulam macrófagos a produzir óxido nítrico, atuando na eliminação do parasito (Kuehn et al. 2014).

Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> desempenham um importante papel no controle da infecção pelo *T. cruzi*. O aumento da população deste tipo celular é observado durante a infecção, independente da via e do inóculo utilizado, sendo estas células amplamente utilizadas em estudos experimentais de vacinação contra o *T. cruzi*

(Collins et al. 2011). O papel dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> foi descrito em modelo experimental. A redução deste tipo celular acarreta o bloqueio da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a redução da ativação policlonal dos linfócitos B (Minoprio et al. 1986). Existe um crescente consenso de que uma resposta imunológica protetora requer a ativação de um perfil imunológico do tipo Th1, com a estimulação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> (Rodrigues et al. 2016). Em alguns modelos experimentais, é observada a produção tanto de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-9, como pró-inflamatórias durante a infecção pelo *T. cruzi*. O padrão misto de expressão de citocinas pode favorecer a persistência do parasito e o controle retardado da infecção, levando a falha do hospedeiro no controle do parasitismo durante a fase aguda (Rodrigues et al. 2016).

Na infecção pelo *T. cruzi*, os linfócitos B são necessários para a proteção sistêmica. Estas células foram descritas atuando na produção de anticorpos que reduzem a carga parasitária e desempenhando um papel crítico no desenvolvimento e manutenção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> multifuncionais, prevenindo o esgotamento destas últimas após a exposição prolongada a altos níveis de antígeno (Sullivan 2015).

Com a drástica queda parasitêmica, resultado da resposta imune do hospedeiro frente a infecção, têm início a fase crônica da doença que se caracteriza por dois períodos, o assintomático ou indeterminado e o sintomático. No primeiro estágio, como o próprio nome sugere, não são observadas manifestações clínicas, uma vez que a infecção está controlada, embora o indivíduo ainda permaneça infectado pelo *T. cruzi*. Esta condição pode permanecer durante décadas após a infecção, podendo evoluir ou não para o próximo estágio da doença, a fase crônica sintomática. A evolução para esta fase da doença ocorre em 10 a 40% dos indivíduos infectados, sendo observados comprometimentos cardíacos (cardiomegalia, arritmias, insuficiência cardíaca) ou digestivos (megaesôfago e/ou megacólon) ou associados (cardiodigestivos). Nesta fase da doença, a mortalidade está associada a problemas cardíacos, com 70% dos casos de morte envolvendo insuficiência cardíaca progressiva e 30% morte súbita. (Rassi et al. 2010; Ayub-Ferreira et al. 2013; Chatelain 2017).

Diversos estudos mostram que a via de infecção é a chave que irá influenciar na progressão da doença de Chagas e na resposta imune gerada pelo hospedeiro (Barreto-de-Albuquerque et al. 2015; Domingues et al. 2015; Silva-dos-Santos et al. 2017). Diferentemente da infecção vetorial, a infecção oral apresenta alta mortalidade e uma variedade de sinais e sintomas na fase aguda da doença, provavelmente pelo grande inóculo que ocorre nesta via, pela capacidade de infecção da mucosa e pelo



próprio local de entrada do parasito, que interfere na resposta imune gerada. Além disso, fatores relacionados com a genética, a idade, o sexo, a nutrição, o perfil imunológico e a espécie do hospedeiro, também interferem na infecção.

Diferentes linhagens de camundongos inbred quando infectados pelo *T. cruzi* exibem perfis distintos de resposta à infecção, sendo observadas variações na mortalidade, produção de citocinas, infiltrados inflamatórios e presença do parasito estabelecendo diferentes graus de susceptibilidade nos hospedeiros (Silva et al. 2013; Hardoim 2014). Camundongos CBA, infectados via IP com o isolado SC2005 de *T. cruzi*, apresentaram maior mortalidade e parasitemia, quando comparados com a linhagem C57BL/10. Estas mesmas linhagens quando infectadas pelas vias IG e IP apresentaram um perfil Th1/Th2/Th17 de produção de citocinas, no entanto, animais CBA infectados pela via IG mostraram uma resposta Th2/Th17 maior (Hardoim 2014). Em outro estudo, Silva et al. (2013) demonstraram que camundongos A/J, BALB/c, C3H/HePas, C57BL/6 e DBA, infectados via IP com o isolado Y de *T. cruzi*, apresentaram diferenças na mortalidade e na parasitemia. A linhagem A/J apresentou maior sensibilidade à infecção, com maior parasitemia, mortalidade, número de células inflamatórias no fígado e número de amastigotas por célula, em relação aos animais C57BL/6 infectados, que demonstraram menor susceptibilidade a esta.

#### 1.4 Tratamento

No mundo todo, o custo com o tratamento dos indivíduos infectados atinge os US\$ 7 bilhões/ano (WHO 2017). Apesar disso, menos de 1% das pessoas atingidas têm acesso a um tratamento sistemático e diagnóstico, contribuindo para um elevado impacto na morbimortalidade da doença e assegurando o alto custo social da enfermidade (Dias et al. 2016; Chatelain 2017; Molyneux et al. 2017).

As opções de tratamento na doença de Chagas são limitadas. Atualmente são utilizados apenas dois medicamentos contra a infecção, o benzonidazol e o nifurtimox. Ambos são mais eficientes quando utilizados na fase aguda da doença, quando o percentual de cura pode alcançar 100% dos casos. Porém, na fase crônica, a porcentagem de cura dos pacientes fica restrita entre 20 a 60% dos casos (Rassi et al. 2010).

Além disto, inúmeros estudos têm relatado a alta toxicidade dos medicamentos utilizados, os quais provocam diversos efeitos colaterais associados ao tratamento.

No tratamento com nifurtimox encontram-se entre os efeitos colaterais dermatite, cefaleia, anorexia, excitação psíquica, sonolência, náusea, vômitos, polineuropatia, perda de peso e gastralgia, ao passo que o uso do benzonidazol está associado a vômitos, polineuropatia, dermatite e distúrbios da medula óssea, como agranulocitose e trombocitopenia. Além dos inúmeros efeitos adversos gerados, o esquema de tratamento de ambos os medicamentos é longo. As doses dependem da idade e peso do paciente, sendo o benzonidazol administrado oralmente duas vezes ao dia, durante cerca de 60 dias, e o nifurtimox de 3 a 4 vezes ao dia, por em média 90 dias (Castro et al. 2006; Pinazo et al. 2010).

O benzonidazol é considerado o tratamento de primeira linha para a doença de Chagas, uma vez que este medicamento apresenta efeitos colaterais mais brandos e uma melhor eficácia quando comparado com o nifurtimox (Bern 2015).

Uma análise do risco/benefício deve ser realizada para o tratamento de pacientes assintomáticos, na fase indeterminada da doença, uma vez que o medicamento mostra efeitos colaterais significativos e apenas uma pequena proporção destes indivíduos irão desenvolver a doença crônica sintomática (Filigheddu et al. 2017). Um estudo clínico realizado com 2854 pacientes chagásicos crônicos da Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia e El Salvador, entre os anos de 2004 e 2011, denominado BENEFIT (Avaliação do Benzonidazol para Interrupção da Tripanossomíase) concluiu que o benzonidazol, apesar de reduzir significativamente a detecção de parasitas no soro, não impediu a progressão dos problemas cardíacos já estabelecidos (Morillo et al. 2015).

Em razão dos medicamentos disponíveis não apresentarem uma completa eficiência no tratamento da doença de Chagas, causarem severos efeitos adversos e por necessitarem de um longo período de utilização, diversos estudos têm sido desenvolvidos visando a elaboração de vacinas profiláticas e terapêuticas (Matos et al. 2017). A pesquisa utilizando intervenções imunes é muito importante, uma vez que são observados efeitos positivos na redução do parasitismo e de lesões devido a indução de uma potente resposta imune contra o *T. cruzi*, sendo fundamental tanto para o esclarecimento da própria patologia, quanto de sua cura (Nascentes et al. 2016).

## 1.5 Justificativa

Os surtos orais da doença de Chagas têm enfatizado a importância desta via de transmissão em humanos e ampliado o número de estudos nas fases aguda e crônica desta infecção. Ensaios experimentais, utilizando diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, são de extrema relevância devido à grande heterogeneidade apresentada por distintas populações do parasito, no comportamento biológico.

Apesar do importante papel da resposta imunológica no desenvolvimento de diferentes manifestações clínicas durante a infecção humana pelo *T. cruzi*, este não está inteiramente esclarecido. Levando-se em consideração a complexidade dos fatores envolvidos na imunopatologia da doença de Chagas, relacionados tanto ao parasito (variabilidade genética, inóculo, virulência, infectividade, patogenicidade e vias de inoculação), quanto ao hospedeiro (idade, sexo, nutrição, perfil imunológico e espécie), os quais exercem uma influência crucial na fisiopatologia da doença de Chagas, interferindo na resposta imune do hospedeiro e na evolução da doença, há a necessidade de estudos que auxiliem na elucidação de tais mecanismos. Desta forma, o presente trabalho possibilitará esclarecer os aspectos imunopatológicos envolvidos com a via de transmissão e os prováveis mecanismos relacionados à suscetibilidade e à resistência à infecção no modelo murino, contribuindo com informações tanto sobre o comportamento da cepa SC2005, isolada de um surto de transmissão oral em humanos, quanto para o desenvolvimento de imunoterapias, que minimizem as lesões teciduais e inflamações, e eliminem o parasito.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a influência da via de inoculação e da genética do hospedeiro no estabelecimento e desenvolvimento da infecção pelo *T. cruzi*, isolado SC 2005, comparando as alterações imunopatológicas ocasionadas por este parasito.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### 2.2.1 *Camundongos Swiss Webster infectados pelas vias IG e IP com o isolado SC 2005 de T. cruzi*

- Classificar genotipicamente o isolado SC 2005 de *T. cruzi*;
- descrever e comparar a parasitemia e a mortalidade observadas nos camundongos infectados pelas vias IG e IP;
- realizar a quantificação absoluta e diferencial de leucócitos;
- descrever as alterações histopatológicas encontradas ao longo da infecção;
- quantificar as subpopulações de células inflamatórias presentes no sangue, baço e linfonodos mesentéricos;
- Identificar a presença de DNA de *T. cruzi* no esôfago, estômago e intestinos dos camundongos, avaliando a influência da via de infecção sobre este parâmetro;

#### 2.2.2 *Camundongos A e BALB/c infectados pela via IG com o isolado SC 2005 de T. cruzi*

- Avaliar a expressão das proteínas de superfície gp82, gp90 e gp35/50 em culturas axênicas de *T. cruzi*;
- descrever e comparar a parasitemia e a mortalidade observadas em ambas as linhagens de animais utilizados;
- analisar alterações hematológicas (série vermelha e série branca) ocasionadas pela infecção;

- determinar o perfil de citocinas induzido pela infecção, no soro dos camundongos;
- descrever as alterações histopatológicas encontradas ao longo da infecção, nos diferentes órgãos das diferentes linhagens de camundongos infectados;
- quantificar as subpopulações de células inflamatórias presentes no sangue, coração e fígado;
- quantificar a carga parasitária no coração e estômago em diferentes momentos da infecção.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do presente estudo os protocolos experimentais foram divididos em duas partes e realizados em duplicata.

#### 3.1 Parte I – Camundongos Swiss Webster infectados pela via IG e pela via IP com o isolado SC 2005 de *T. cruzi*.

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster com idade entre 4 a 6 semanas, obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB). Esta linhagem foi escolhida por apresentar um perfil genético heterogêneo, permitindo a observação de diferentes respostas à infecção. Os animais foram mantidos em microisoladores no biotério de experimentação animal do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira do Instituto Oswaldo Cruz, com temperatura controlada, alimentação por ração apropriada e água filtrada *ad libitum*. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório da FIOCRUZ, licença nº LW 16/11.

##### 3.1.2 Parasito

Para o desenvolvimento do presente estudo utilizou-se o isolado SC2005 de *Trypanosoma cruzi*, proveniente de sangue periférico de um paciente humano na fase aguda da doença de Chagas. A infecção foi adquirida por via oral durante um surto na cidade de Navegantes em Santa Catarina, Brasil, no ano de 2005 (Silva et al. 2006).

##### 3.1.2.1 Caracterização do isolado

Para caracterização do isolado SC2005 foi empregada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) - multiplex.

Os parasitos foram cultivados em meio de cultura axênico LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964) e mantidos em estufa (Shell Lab Mod.2020) a 28 °C. Para extração do DNA do *T. cruzi*, a cultura do parasito foi centrifugada (Jouan rotor AB2.14) a 4.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi

ressuspendido em 500 µL de tampão de lise (10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate) e 5 µL de proteinase K a 20 mg/mL) e incubado por 2 horas a 37 °C. A seguir, foi acrescentado 500 µL de fenol e a mistura agitada. Posteriormente, uma nova centrifugação foi realizada a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo, onde foi acrescentado ao volume 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e a mistura agitada por inversão durante 30 segundos. A mistura foi novamente centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. Posteriormente, acrescentou-se 1mL de etanol absoluto gelado, a solução foi agitada durante 30 segundos por inversão e, novamente, centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento deixado à temperatura ambiente até a total evaporação do etanol. O sedimento foi ressuspendido em 100 µl de água livre de DNA e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

Após a extração, o DNA foi submetido à técnica de PCR-multiplex, na qual foram utilizados cinco primers, sendo três representantes de diferentes grupos de isolados de *T. cruzi* (TcI, TcII e TcIII), conforme demonstrado na tabela abaixo:

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
Tc1	5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCAT-3'
Tc2	5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G-3'
Tc3	5'-CCG CGW ACA ACC CCT MAT AAA AAT G-3'
Tr	5'-CCT ATT GTG ATC CCC ATC TTC G-3'
Exon	5'-TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G-3'

As condições da reação e o perfil térmico utilizado foram padronizados para um termociclador Eppendorf Mastercycler gradiente, de acordo com o exposto no quadro a seguir:

Temperatura °C	Tempo	Número de Ciclos
95	5 min	1
94	30 seg	
55	30 seg	35
72	30 seg	
72	10 min	1
4	∞	

O produto da amplificação foi observado em gel de agarose a 2% em TBE 0,5X (2 g de agarose em Tris 44,5 mM; Ácido bórico 44,5 mM; EDTA 1 mM pH8.3) e seu tamanho estimado através do uso de um marcador padrão de peso molecular em escala de 100 pares de bases.

### **3.1.2.2 Obtenção de formas tripomastigotas derivadas de cultura de célula VERO de *T. cruzi*.**

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa SC 2005, foram mantidas em meio de cultura axênico LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964) a 28 °C por 30 dias para a obtenção de tripomastigotas metacíclicos.

Células de linhagem extraída do epitélio renal de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*, (VERO) foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (cat: 31800-014, Gibco™) completo (suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), L-glutamina 200 mM e antibiótico/antimicótico, contendo penicilina, estreptomina e anfotericina B (cat: 15240062, Gibco™), a 37 °C em incubadora de CO<sub>2</sub> (Water Jacketed Forma Scientific, Inc mod. 3546). As células foram infectadas com tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* e mantidas a 34 °C. Após cinco dias de infecção, as formas tripomastigotas liberadas pela lise celular no meio de cultivo foram recolhidas e transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL, os quais foram centrifugados a 4.000 rpm (Jouan BR4i rotor S40) por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio RPMI 1640 sem SFB. As formas tripomastigotas derivadas de cultura celular foram quantificadas em câmara de Neubauer e a concentração do inóculo ajustada para a posterior infecção dos animais.



### **3.1.3 Desenho experimental**

Os camundongos da linhagem Swiss Webster foram divididos em três grupos experimentais, os quais foram submetidos a 4 horas de jejum anteriores à infecção. O grupo 1 (G1) foi composto por 55 camundongos infectados pela via intragástrica (IG), com o auxílio de uma agulha de gavagem, com  $10^7$  formas tripomastigostas derivadas de cultura celular (TCC) da cepa SC2005 de *T. cruzi*, em um volume de 0,1 mL de meio RPMI 1640 completo. O grupo 2 (G2) foi formado por 30 animais inoculados pela via intraperitoneal (IP) com  $10^7$  TCC do isolado SC2005 em 0,2 mL de meio RPMI 1640. Somente os animais positivos na parasitemia, destes dois grupos, foram utilizados para a realização do experimento. O grupo 3 (G3) foi composto por 15 animais normais não infectados, utilizados como grupo controle.

Os animais infectados e controles foram utilizados para a obtenção de material biológico. Para isto, foram definidos 2 pontos diferentes de necropsia para os grupos 1 e 2: 11<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> dias pós-infecção nos animais infectados por via IP e 26<sup>o</sup> e 32<sup>o</sup> dias nos animais infectados por via IG. Em cada um desses momentos os animais foram eutanasiados, em câmara de atmosfera rica em CO<sub>2</sub>, e necropsiados.

### **3.1.4 Parasitemia e Mortalidade**

Os animais infectados tiveram sua parasitemia acompanhada diariamente até a morte de 50% dos animais. Os camundongos do G1 tiveram sua parasitemia acompanhada a partir do 5<sup>o</sup> dia de infecção e os camundongos do G2 a partir do 3<sup>o</sup> dia de infecção. Para isso, 10 camundongos de cada grupo (G1 e G2) foram sangrados pela cauda para a retirada de 5 µL de sangue, o qual foi examinado entre lâmina e lamínula (22 x 22 mm) através da contagem de 50 campos de microscópio num aumento de 400X. A quantidade de parasitos por mililitro de sangue foi estimada conforme metodologia descrita por Pizzi e Prager (1952). A média e o erro médio foram calculados.

A mortalidade destes animais foi acompanhada do início da infecção até o 30<sup>o</sup> dia após a infecção.

### **3.1.5 Leucometria global**

A contagem de leucócitos totais (leucócitos/mm<sup>3</sup>), presentes no sangue de 10 camundongos representantes de cada um dos três grupos experimentais, foi

realizada concomitantemente à parasitemia. Para tal, o volume de 5 µL de sangue, foi diluído 1:20 em líquido de Turk (1 mL de solução de violeta de genciana 1 M em 100 mL de solução de ácido acético 2%). A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer e o número de leucócitos totais foi estimado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de leucócitos} \times 200}{4}$$

### **3.1.6 Leucometria diferencial absoluta**

Para a contagem diferencial de leucócitos, esfregaços sanguíneos foram realizados concomitantemente à parasitemia e à contagem de leucócitos totais. Uma pequena gota de sangue foi obtida da cauda de 10 camundongos representantes de cada um dos três grupos experimentais, e colocada diretamente sobre uma lâmina de vidro e estendida com o auxílio de uma lâmina extensora, em um ângulo aproximado de 45°. Após secagem em temperatura ambiente, os esfregaços foram corados em Panótico rápido (Laborclin – 07.379).

Para determinar os valores absolutos de cada tipo leucocitário foi realizada a contagem diferencial de 100 células por lâmina analisada. Para estabelecer a relação entre a leucometria global e a específica foi empregada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total específico de leucócitos} \times \text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos totais}}{100}$$

### **3.1.7 Histopatologia**

As necropsias para obtenção de fragmentos de tecidos foram realizadas nos dias: 11<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> pós-infecção nos animais infectados por via IP e 26<sup>o</sup> e 32<sup>o</sup> nos animais infectados por via IG. Para esta análise, três camundongos de cada grupo tiveram os órgãos (cérebro, esôfago, estômago, intestinos, linfonodos, fígado, baço, pâncreas, rim e suprarenal, coração, timo, órgãos sexuais e bexiga) removidos e fixados em paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS 0,01M, pH 7,45, a 4 °C por um

período de 72 horas. Os intestinos foram lavados com PBS, pH7,2, antes da fixação, enrolados e amarrados, segundo técnica descrita por Moolenbeek e Ruitenberg (1981).

Após esse período, os órgãos foram clivados e processados, por desidratação em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 100 GL), clarificados em xilol e impregnados em parafina em inclusor automático (Leica TP1020). Posteriormente, o material foi incluído em blocos de parafina, em central de inclusão (Microm AP280). Os blocos obtidos foram trimados e cortes de 5 µm obtidos em micrótomo (Microm HM360). Em seguida, os cortes obtidos foram desparafinizados em três trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (100, 90, 80, 70 GL) e em água destilada, e corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), Giemsa de Lennert e Picrosirius Red. As análises e a fotodocumentação dos tecidos foram realizadas em microscópio de luz Zeiss Axioplan 2, acoplado a câmera Soft Imaging System (CC-12), utilizando, principalmente, as objetivas de 10X e 20X.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliado de acordo com Dias et al. (2013), consideradas 10 ou mais células inflamatórias por campo como infiltrado inflamatório, sendo classificados como: ausente, sem presença de células inflamatórias; leve, com a presença de 10 a 25 células (+); moderado, com 26 a 50 células (++); e intenso, com mais de 50 células (+++). Foi avaliado todo o tecido de 6 animais de cada grupo.

### **3.1.7.1 Técnica de Hematoxilina-eosina**

Esta técnica foi utilizada para o estudo da morfologia tecidual, a qual evidencia os núcleos celulares pela coloração por hematoxilina e o citoplasma pela eosina.

Após desparafinização e hidratação, os cortes obtidos foram corados durante 7 minutos em hematoxilina de Harris pré-filtrada preparada previamente (2,5 g de hematoxilina (Sigma) dissolvida em 25 mL de álcool absoluto, e 50 g de alúmen de amônio dissolvidos em 500 mL de água destilada pré-aquecida. As duas soluções foram misturadas e aquecidas até breve fervura, retirada do fogo e acrescida de 1,25 g de óxido vermelho de mercúrio. A solução foi resfriada, através da imersão do frasco em água fria. Posteriormente, foram acrescidos 20 mL de ácido acético glacial, e a solução foi amadurecida por 2 meses). Os cortes foram lavados, azurecidos em água corrente e corados por 2 minutos em solução alcoólica de

eosina (5 g de eosina Y “yellowish” (Merck) dissolvidas em 200 mL de água destilada acrescida de 800 mL de álcool etílico absoluto). Finalmente, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 100 GL), diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck).

### **3.1.7.2 Técnica de Giemsa de Lennert (Lennert 1978)**

Esta técnica foi utilizada para melhor identificação do *T. cruzi* e dos diferentes tipos celulares presentes nos tecidos.

Após desparafinização e hidratação, os cortes obtidos foram corados pelo Giemsa (20 mL de solução de estoque Giemsa (Merck) em 80 mL de água destilada) por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram imersas três vezes em solução aquosa de ácido acético a 0,3% e, posteriormente, em álcool etílico a 95 GL até atingir a diferenciação desejada. Finalmente, os cortes foram desidratados em três banhos de álcool isopropílico com duração de três minutos cada, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck).

### **3.1.7.3 Técnica de Picrosirius Red (Sweat et al. 1964)**

Esta coloração foi empregada para análise de algumas fibras do complexo colágeno nos tecidos. A coloração permite a visualização das fibras que se apresentam marcadas de vermelho.

Após desparafinização e hidratação, os cortes obtidos foram corados por 1 hora em solução de Picrosirius Red (0,1 g de Sirius Red F3B200 (Sigma) dissolvido em 100 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico). Em seguida foram lavados rapidamente em água destilada, corados durante 15 minutos em hematoxilina de Harris, lavados e azurecidos em água corrente por 10 minutos. Na sequência, foram desidratados em crescentes concentrações de etanol, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck).

### **3.1.8 Identificação de populações celulares por citometria de fluxo**

Nos mesmos pontos de necropsia, esta técnica foi empregada para quantificação e identificação das subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> presentes no sangue total, linfonodos mesentéricos e baço de três camundongos Swiss Webster de cada grupo experimental.

Sangue periférico de cada animal foi coletado por punção cardíaca utilizando salina citratada (NaCl 0,87%; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 3,8%) como anticoagulante e mantido em banho de gelo. Ao volume total foi acrescentado mesmo volume de meio RPMI completo. A mistura foi colocada delicadamente sobre 1 mL de Histopaque® (cat. 10771; Sigma-Aldrich) em tubos de centrífuga de 15 mL. Em seguida, esta mistura foi centrifugada (Jouan BR4i rotor S40) a 2400 rpm por 20 minutos, sem freio, em temperatura ambiente, para a formação do anel de células mononucleares.

As células do baço e linfonodos mesentéricos foram obtidas após os mesmos serem coletados, imediatamente colocados em meio RPMI completo e macerados em placas de Petri com auxílio de malha metálica e êmbolo de seringa plástica, em banho de gelo.

As suspensões celulares do sangue, baço e linfonodos foram lavadas, separadamente, duas vezes com 10 mL de PBS-BSA (Sigma – P3688) com 10% de SFB e centrifugadas a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes de cada suspensão foram desprezados e os sedimentos reservados (em gelo).

Ao sedimento obtido da suspensão de células do baço foi acrescentado 3 mL de tampão de lise de hemácias ACK 5M (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 M KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub> / EDTA em H<sub>2</sub>O destilada) e homogeneizado. A mistura foi incubada em estufa a 37 °C por aproximadamente 5 minutos. Decorrido esse tempo, foram acrescentados à solução, 27 mL de meio RPMI completo. A seguir, a suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos a 4 °C e lavada uma vez com 10 mL de PBS-BSA suplementado com 10% de SFB.

As células do linfonodo, baço e sangue foram incubadas por 30 minutos em 5 mL PBS-BSA suplementado com 10% de Soro Fetal de Cavalo (SFC), em banho de gelo. Posteriormente, as células foram contadas em câmara de Neubauer e as quantidades ajustadas para uma concentração final de 1x10<sup>6</sup> células por poço em placa de 96 poços. As placas foram, então, centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos (Jouan BR4i – rotor S20) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de cada poço ressuspenso em 20 µL de solução contendo anticorpos monoclonais anti-linfócitos T totais (CD3) conjugado com Alexa Fluor 488 (Biolegend), anti-linfócitos T CD4 conjugado com PE (Biolegend), e anti-linfócitos TCD8 conjugado com Percp (Biolegend) diluídos em PBS-BSA suplementado com 10% de SFC, conforme titulação prévia. Após 20 minutos de incubação ao abrigo da luz em geladeira, as placas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2, e

centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. As células foram, então, ressuspendidas em 100 µL de solução de PFA a 1% e incubadas ao abrigo da luz, em geladeira, por 30 minutos. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS pH 7,2, seguidas de nova incubação em temperatura ambiente por 10 minutos na solução da última lavagem. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo Cyan ADP (Dako Cytomation), pertencente à plataforma de equipamentos multi-usuários de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica do Instituto Oswaldo Cruz, e analisadas utilizando o pacote do software Summit (Dako Cytomation). Foram adquiridos 20.000 eventos em cada amostra. As populações de linfócitos foram selecionadas para análise com base nos padrões de granulosidade e tamanho celular. A partir desta população selecionada, as porcentagens de células positivas, para cada anticorpo utilizado, e de células não marcadas foram determinadas.

### **3.1.9 Identificação da presença de DNA do *T. cruzi* por PCR**

#### **3.1.9.1 Extração do DNA tecidual**

Amostras teciduais do esôfago, estômago e intestinos de três camundongos de cada grupo foram coletadas, no momento da necropsia, e armazenadas a -70 °C em microtubos (livres de RNA e DNA) de 1,5 mL até o momento da extração do DNA. Foram adicionados aos tecidos, 500 µL do tampão de lise (10mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% SDS e 5 µL de proteinase K a 20 mg/mL. A suspensão foi incubada durante a noite a 56 °C (Thermostat 5320 – Eppendorf). Após esse período, foram acrescentados ao lisado 500 µL de fenol saturado (cat: P4557, Sigma) e homogeneizados em Vortex (Phoenix – A56). A mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C (Jouan rotor AB 2.14). Os sobrenadantes foram recuperados e transferidos para microtubos novos, aos quais foram acrescentados 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após agitação, de 30 segundos por inversão, e nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos novos, onde, 1 mL de etanol absoluto gelado foi acrescentado. Os microtubos foram agitados por inversão durante 30 segundos e novamente centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento deixado à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Posteriormente, os

sedimentos foram ressuspensos em 100 µL de água livre de DNA e armazenados a -20 °C. A posterior quantificação do DNA genômico foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 – Thermo scientific).

### 3.1.9.2 PCR

Para a reação em cadeia da polimerase foram utilizados os primers GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de camundongo (Forward 5'-TCACCACCATGGAGAAGGC -3' e Reverse 5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3') e os primers 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTTGCATTGGGTTGGTGTAAATATA-3') de *T. cruzi*.

A amplificação do gene GAPDH de camundongo tem como produto um fragmento de 171 pares de base, sendo utilizado para o controle interno da reação e para a avaliação da viabilidade do DNA genômico. Foram escolhidos ao acaso três amostras de DNA, de diferentes tecidos e tempos de infecção distintos para a realização desta metodologia. As condições da reação foram padronizadas para um volume final de 50 µL, conforme apresentado no quadro abaixo:

Solução	Concentração	Volume
Tampão	10 X [100mM de Tris-HCl pH8,3 em 500mM de KCl]	5µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3µL
dATP	15 mM	2µL
dTTP	15 mM	2µL
dCTP	15 mM	2µL
dGTP	15 mM	2µL
Primer GAPDH Reverse	10 µM	3µL
Primer GAPDH Foward	10 µM	3µL
Taq DNA polimerase	5U/µL	0,5µL
DNA	100 ng	2µL
Água	qsp 50 µL	

O perfil térmico utilizado em um termociclador (GeneAmp 9600 PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA) obedeceu às condições apresentadas no quadro a seguir:

Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
94	10 min	1
94	30 seg	
62	30 seg	35
72	30 seg	
72	10 min	1
4	∞	

A reação de PCR, para evidenciar a presença do DNA do *T. cruzi* nos tecidos analisados, utilizando os primers 121 e 122 amplificam um fragmento de 330 pares de bases, que contêm as regiões hipervariáveis dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (k-DNA) do parasito (Carvalho et al. 2003). As reações foram padronizadas para um volume final de 50 µL de acordo com as condições de reação expostas no quadro abaixo:

Solução	Concentração	Volume
Tampão	10 X [100mM de Tris-HCl pH8,3 em 500mM de KCl]	5µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3µL
dATP	15 mM	2µL
dTTP	15 mM	2µL
dCTP	15 mM	2µL
dGTP	15 mM	2µL
Primer 122 Reverse	10 pmoles/µL	1µL
Primer 121 Foward	10 pmoles/µL	1µL
Taq DNA polimerase	5U/µL	0,5µL
DNA	100 ng	2µL
Água	q.s.p 50µl	



O perfil térmico usado em um termociclador (GeneAmp 9600 PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA) encontra-se no quadro a seguir:

Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
94	3 min	1
98	1 min	2
64	2 min	
94	1 min	38
64	1 min	
72	10 min	1
4	∞	

### **3.1.10 Análise estatística**

Os dados apresentados foram obtidos através do cálculo da média e do erro padrão da média (SEM) dos valores brutos.

A análise da mortalidade foi realizada de acordo com a curva de sobrevivência gerada pelo programa GraphPad Prism 6. Para o cálculo da significância das leucometrias globais e específicas foi aplicado o teste paramétrico ANOVA (One -Way Analysis of Variance) e o pós-teste Tukey-Kramer para dados não paramétricos. As correlações entre os valores da parasitemia e das leucometrias foram analisadas através do teste Spearman de correlação e regressão linear. Valores com o  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os resultados obtidos na técnica de citometria de fluxo foram analisados com o teste 2-Way ANOVA.

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism.

## **3.2 Parte II – Camundongos A e BALB/c infectados pela via IG com o isolado SC 2005 de *T. cruzi*.**

### **3.2.1 Animais**

Nesta parte do estudo foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens A e BALB/c com idade entre 4 a 6 semanas, obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB). Estas linhagens de camundongos foram escolhidas por apresentarem perfis genéticos isogênicos, permitindo a comparação de diferentes padrões de resposta à infecção. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira do Instituto Oswaldo Cruz, em microisoladores com temperatura controlada, alimentação por ração apropriada e água filtrada *ad libitum*. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório da FIOCRUZ, licença nº LW 42/14.

### **3.2.2 Parasitos**

Nesta parte do trabalho também foi utilizado o isolado SC2005 de *Trypanosoma cruzi* anteriormente descrito no item 3.1.2.

#### **3.2.2.1 Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, cepa SC2005, derivadas de cultura axênica**

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa SC 2005, foram mantidas em meio de cultura axênico LIT a 28 °C por 7, 14 e 21 dias para a ocorrência da metaciclogênese dos parasitos e obtenção dos tripomastigotas metacíclicos.

Após os diferentes períodos, o conteúdo de cada cultura foi transferido para tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugado a 4.000 rpm (Hettich® Universal 320/320R rotor 1619) por 10 minutos a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspenso em meio LIT e os tripomastigotas metacíclicos quantificados em câmara de Neubauer para posterior avaliação da expressão das glicoproteínas de superfície gp82, gp90 e gp35/50 do parasito, nos diferentes dias de cultivo.

### **3.2.2.1.1 Avaliação da gp82, gp90 e gp35/50 na superfície do parasito**

A expressão das proteínas de superfície dos parasitos foi avaliada por Western Blotting, em culturas axênicas de *T. cruzi* com 7, 14 e 21 dias. As proteínas totais de cada amostra foram extraídas com tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 6,8 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA) contendo inibidores de protease (PMSF 100 µg/mL, aprotinina 1µg/mL, fenantrolina 2,5µM, leupeptina 2 µg/mL e pepstatina 1 µg/mL) e coquetel de inibidores de fosfatases (PHOSStop – Roche), e posteriormente foram dosadas em espectrofotômetro.

Um total de 20 µg de proteínas foi separado eletroforéticamente em gel de poliacrilamida (12%) e posteriormente transferido para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com PBS contendo 5% de leite desnatado Molico e 0,1% de Tween 20 e incubadas “overnight” a 4 °C com os anticorpos anti-gp82, anti-gp90 e anti- gp35/50. Após lavagem em solução de bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho ou anti-IgG de cabra conjugados a peroxidase e reveladas pelo método de quimioluminescência.

### **3.2.3 Desenho experimental**

Os camundongos das linhagens A e BALB/c foram organizados em quatro grupos experimentais, os quais foram submetidos a 4 horas de jejum no momento anterior à infecção. O grupo 1 (G1) foi composto por 50 camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigostas metacíclicas de *T. cruzi*, cepa SC2005, em um volume de 0,3 mL de meio LIT. O grupo 2 (G2), formado por 50 camundongos da linhagem BALB/c, foi infectado nas mesmas condições experimentais do G1 e os grupos 3 e 4 (G3 e G4) foram compostos por 24 camundongos normais cada, não infectados, da linhagem A e BALB/c, respectivamente, utilizados como grupo controle.

Os animais infectados e controles de ambas as linhagens foram utilizados para a obtenção de material biológico. Para isto, foram definidos quatro pontos diferentes de necropsia: 7, 14, 21 e 40 dias após a infecção. Em cada um desses momentos os animais de cada grupo foram eutanasiados, com cloridrato de quetamina 10% (115 mg/mL) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg) por via intramuscular e com posterior administração do pentobarbital sódico 50 mg/mL (150mg/Kg) por via intraperitoneal, e necropsiados.

### **3.2.4 Parasitemia e Mortalidade**

A parasitemia de 20 camundongos dos grupos 1 e 2 foi acompanhada três vezes por semana a partir do 5º dia de infecção até o 40º dia após a infecção, conforme descrito anteriormente (tópico 3.1.4).

A mortalidade de 20 animais de cada grupo foi acompanhada do início da infecção até o 50º dia após a infecção.

### **3.2.5 Análise hematológica**

Para a realização do hemograma, o sangue dos animais foi obtido por punção cardíaca, após a eutanásia, de seis animais nos quatro pontos de necropsia definidos anteriormente. O sangue foi colhido em seringa de 1 mL e acondicionado em tubos contendo EDTA e as amostras encaminhadas para o laboratório de análises clínicas Laborlife, localizado no município do Rio de Janeiro.

### **3.2.6 Dosagem de citocinas**

A técnica de citometria de fluxo, utilizando o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) de citocinas Th1, Th2, Th17 (cat. 560485; BD Biosciences), foi realizada para detecção de Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleucina-10 (IL-10), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-17A (IL-17A), Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-2 (IL-2) no soro dos animais, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Após eutanásia, sangue periférico de três animais de cada grupo foi obtido, separadamente, por punção cardíaca e acondicionado em tubos sem anticoagulante. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado (Hettich® Universal 320/320R rotor 1420B) a 3500 rpm por 10 minutos, para obtenção do soro, que foi então aliquotado e armazenado a  $-70$  °C até o momento da realização das dosagens.

O kit CBA é composto por partículas, denominadas *beads*, as quais possuem o mesmo tamanho, porém apresentam diferenças na intensidade de fluorescência e no revestimento de anticorpo, que variam de acordo com a citocina a ser analisada. A quantificação das citocinas presente no soro dos animais infectados e dos animais controle não infectados foi baseada em uma curva padrão. A leitura do teste CBA foi

realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur e os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa FCAP array.

### **3.2.7 Histologia**

Nos pontos de necropsia estabelecidos, após a eutanásia, três camundongos de cada grupo tiveram os órgãos do sistema digestório (esôfago, estômago e intestinos), assim como coração e fígado removidos e fixados em PFA a 4% em PBS pH 7,45, a 4 °C por um período de 72 horas. Os intestinos foram lavados com PBS antes da fixação, enrolados e amarrados segundo a técnica de Moolenbeek e Ruitenberg (1981).

Após esse período, os órgãos foram submetidos aos mesmos processamentos e colorações descritos na parte I dos estudos (tópico 3.1.7). Os tecidos foram analisados e fotografados em microscópio de luz (Zeiss, Axioplan 2, com equipamento fotomicrográfico Axiovision LE64).

### **3.2.8 Caracterização fenotípica de populações celulares por citometria de fluxo**

Nos pontos de necropsia anteriormente citados no item 3.2.3, foi empregada a técnica de citometria de fluxo para a análise fenotípica multiparamétrica de diferentes tipos celulares presentes no sangue, fígado e coração de seis camundongos de cada grupo experimental. No sangue total dos animais foram avaliadas as subpopulações de linfócitos T CD3, CD4 e CD8 positivos e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>). No fígado foram analisadas as subpopulações de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) e megacariócitos (CD41<sup>+</sup>). No coração foram avaliadas as subpopulações de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>).

Para tal, durante necrópsia, sangue periférico de cada animal foi coletado por punção cardíaca e submetido aos mesmos processamentos descritos na primeira parte do estudo (item 3.1.8) para a obtenção do anel de células mononucleares.

Para obtenção das células do fígado, este, após a remoção, foi macerado em placa de Petri, contendo meio RPMI completo com auxílio de êmbolo de seringa plástica e malha metálica, sendo mantidas em gelo durante todo o processo.

As células cardíacas foram obtidas após a perfusão do órgão com tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2, posteriormente cortado em pequenos fragmentos e

submetido a quatro ciclos de dissociação utilizando colagenase tipo II a 0,2% em meio RPMI sem SFB a 37°C em agitação, por 30 minutos. As células foram lavadas em meio RPMI completo e mantidas em gelo.

As suspensões obtidas (sangue, fígado e coração) foram lavadas, separadamente, duas vezes em 10 mL de PBS-BSA com 10% de SFB e centrifugadas a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C (Hettich® Universal 320/320R rotor 1619). Os sobrenadantes de cada suspensão foram desprezados e os sedimentos reservados (em gelo).

Para a lise de hemácias a suspensão de células do fígado foram submetidas ao processamento apresentado para as células do baço na primeira parte deste estudo (item 3.1.8).

Após etapa anterior, as células do fígado, sangue e coração foram submetidas aos mesmos processos descritos no item 3.1.8. Os anticorpos monoclonais utilizados foram: anti-linfócitos T totais CD3 conjugado com PE (cat. 553064; BD Biosciences), anti-linfócitos T CD4 conjugado com APC-H7 (cat. 560181; BD Biosciences), anti-linfócitos T CD8 conjugado com BB515 (cat. 564422; BD Biosciences), anti-linfócitos B CD19 conjugados com APC (cat. MCA 1439; Serotec), anti-F4/80 conjugado Alexa Fluor® 700 (cat. 123130; Biolegend) e anti-CD41 conjugado com BV421 (cat. 562957; BD Biosciences).

As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman), pertencente à plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (Sorting), de equipamentos multi-usuários da Fundação Oswaldo Cruz, e analisadas utilizando o pacote do software CytExpert (Beckman). Um total de 20.000 eventos foi adquirido em cada amostra. As células do fígado, sangue e coração tiveram as populações de linfócitos e macrófagos selecionadas com base em sua distribuição nos padrões de granulosidade e tamanho. As células positivas para cada anticorpo, presentes na região delimitada, foram determinadas em um histograma e as porcentagens das diferentes subpopulações celulares foram determinadas.

### **3.2.9 Quantificação dos parasitos por qPCR**

A técnica de PCR em tempo real foi aplicada ao DNA extraído, a fim de quantificar o DNA parasitário presente nos tecidos.

### 3.2.9.1 Extração de DNA dos tecidos

Amostras de coração e estômago de seis camundongos de cada grupo experimental foram acondicionadas, no momento da necropsia, em microtubos para centrifugação e estocados a -70 °C até o momento da realização da extração do DNA. A extração e dosagem do DNA tecidual seguiu a metodologia descrita na primeira parte do estudo no item 3.1.9.1.

### 3.2.9.2 qPCR

Para amplificação do DNA do parasito foram utilizados os primers Cruzi 1 (Forward - 5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3') e Cruzi 2 (Reverse - 5'-AATTCCTCCAAGCAGCGG ATA-3'), os quais amplificam um fragmento de 166 pares de base do DNA satélite do parasito, (Piron et al. 2007). Primers específicos para a  $\beta$ -actina murina (Giulietti et al. 2001) (Forward - 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' e Reverse - 5' CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3') foram utilizados como referência a fim de monitorar a integridade do DNA genômico, a presença de potenciais inibidores da PCR e a variação nas concentrações do DNA.

A quantificação do DNA do *T. cruzi* nos fragmentos de estômago e coração foi realizada utilizando-se o equipamento Step one plus (Applied Biosystems) e o reagente Syber® Green Power Master Mix (Applied Biosystems).

As reações para quantificação de *T. cruzi* e  $\beta$ -actina foram realizadas separadamente e com volume final de 20  $\mu$ L cada. O mix das reações foi composto pelas concentrações demonstradas no quadro seguinte:

Solução	Concentração
Power Syber® Green Master Mix (2x)	1x
Primer $\beta$ -actina Reverse	100nM
Primer $\beta$ -actina Foward	100nM
Cruzi 2 Reverse	300nM
Cruzi 1 Foward	300nM
DNA	25 ng
H <sub>2</sub> O	q.s.p. 20 $\mu$ L

O perfil térmico utilizado seguiu conforme descrito no quadro abaixo:

	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
	95°C	10 min	1
	95 °C	15 seg	40
	58 °C	1 min	
	95 °C	15 seg	1
MELT	58 °C	1 min	
	95 °C	15 seg	

A análise da curva de dissociação foi realizada em todas as reações. Os resultados e os parâmetros de qualidade da reação foram analisados com o software StepOne™ (Applied Biosystems).

### **3.2.10 Análise estatística**

Todos os dados apresentados foram obtidos através do cálculo da média e SEM dos valores brutos.

Para o cálculo da significância dos resultados obtidos foi aplicado o teste paramétrico 2-way ANOVA e o pós-teste Tukey de comparação múltipla.

Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 6. A análise da mortalidade foi realizada de acordo com a curva de sobrevivência gerada pelo programa GraphPad Prism 6.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parte I – Infecção de camundongos Swiss Webster com o isolado SC 2005 de *T. cruzi*, pelas vias IG e IP.

#### 4.1.1 Caracterização do isolado

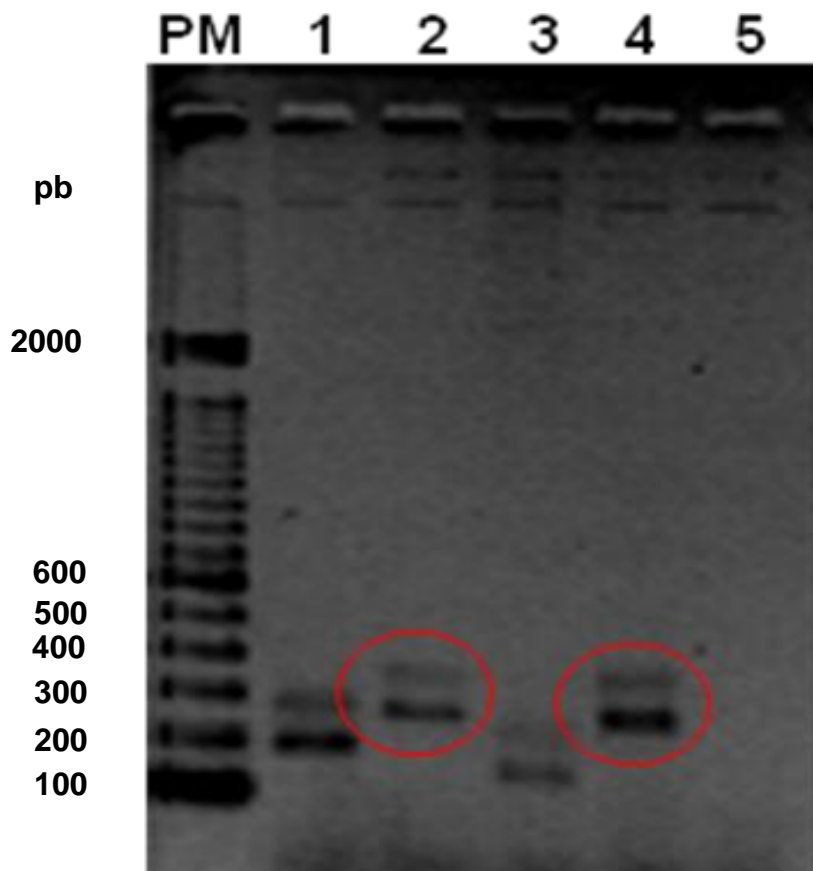
A caracterização do isolado SC 2005 de *T. cruzi*, utilizado no presente estudo, foi realizada por PCR multiplex. Os resultados apontaram para a classificação do isolado na DTU Tc II (Figura 4.1).

#### 4.1.2 Parasitemia e mortalidade

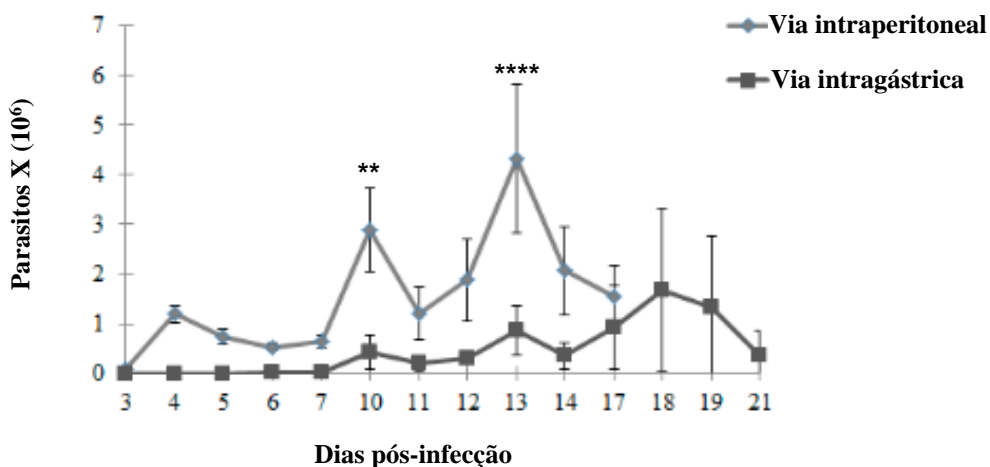
A detecção do *T. cruzi* no sangue dos camundongos Swiss Webster, infectados pela via IP, ocorreu mais precocemente do que nos animais infectados pela via IG. Nos animais infectados pela via IP, os parasitos foram observados a partir do 3º dia pós-infecção (dpi), enquanto nos animais infectados pela via IG a presença do parasito só foi detectada após 10 dias de infecção. Dois picos parasitêmicos foram observados em ambos os grupos. Nos animais infectados pela via IP, estes picos ocorreram no 10º e 13º dpi, com carga parasitária média de  $2,9 \pm 1,1 \times 10^6$  e  $8,3 \times 10^5$  parasitos/ mL, respectivamente. Já nos animais infectados pela via IG, os picos parasitêmicos ocorreram no 13º e 18º dpi, com carga parasitária média de  $0,9 \pm 2,0 \times 10^6$  e  $6,7 \times 10^5$  parasitos/ mL, respectivamente (Figura 4.2).

A via IP mostrou-se mais efetiva na infecção dos animais do que a via IG. A percentagem de infecção entre os camundongos Swiss Webster infectados pela via IP, foi de 100%, enquanto entre os animais infectados pela via IG foi de 36%.

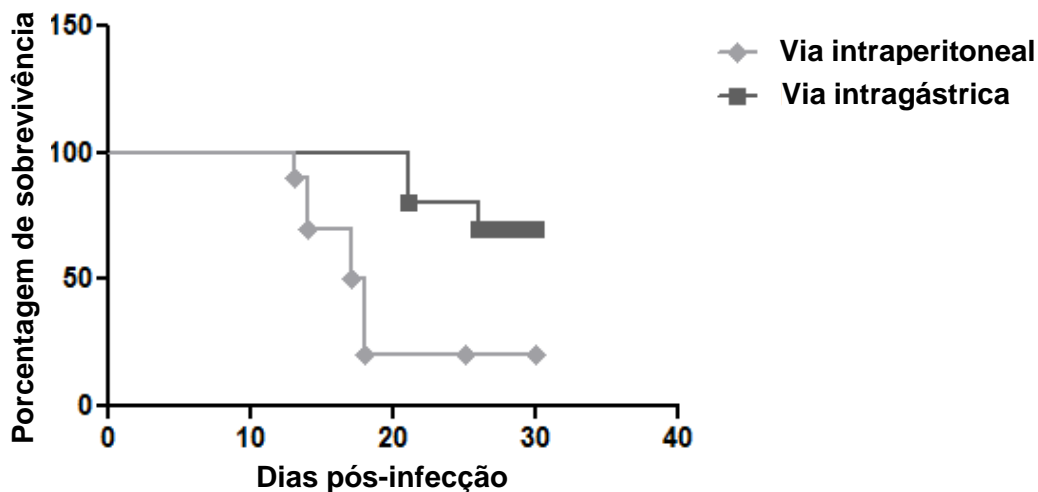
A mortalidade foi mais precoce e mais elevada entre os animais infectados pela via IP, alcançando 80% aos 18 dpi, com um tempo médio de  $16,13 \pm 0,8$  dias. No grupo infectado pela via IG a mortalidade foi de 30%, com um maior tempo médio, em torno de  $22,67 \pm 2,0$  dias (Figura 4.3).



**Figura 4.1** – Visualização em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR do *T. cruzi*, isolado SC2005 (PM- Peso Molecular; 1- Cepa Dm28/*T. cruzi* (Tc I); 2- Cepa Y/*T. cruzi* (Tc II); 3- 4167 (Tc III); 4- Cepa SC2005/*T. cruzi* (Tc II) e 5- Controle Negativo). n=3 amostras.



**Figura 4.2** - Parasitemia dos camundongos Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal ou intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC2005, derivadas de cultura de célula. \* representa a diferença de IP e IG. n=16 camundongos/grupo. \*\*  $p=0,01$ ; \*\*\*\*  $p=0,0001$ .



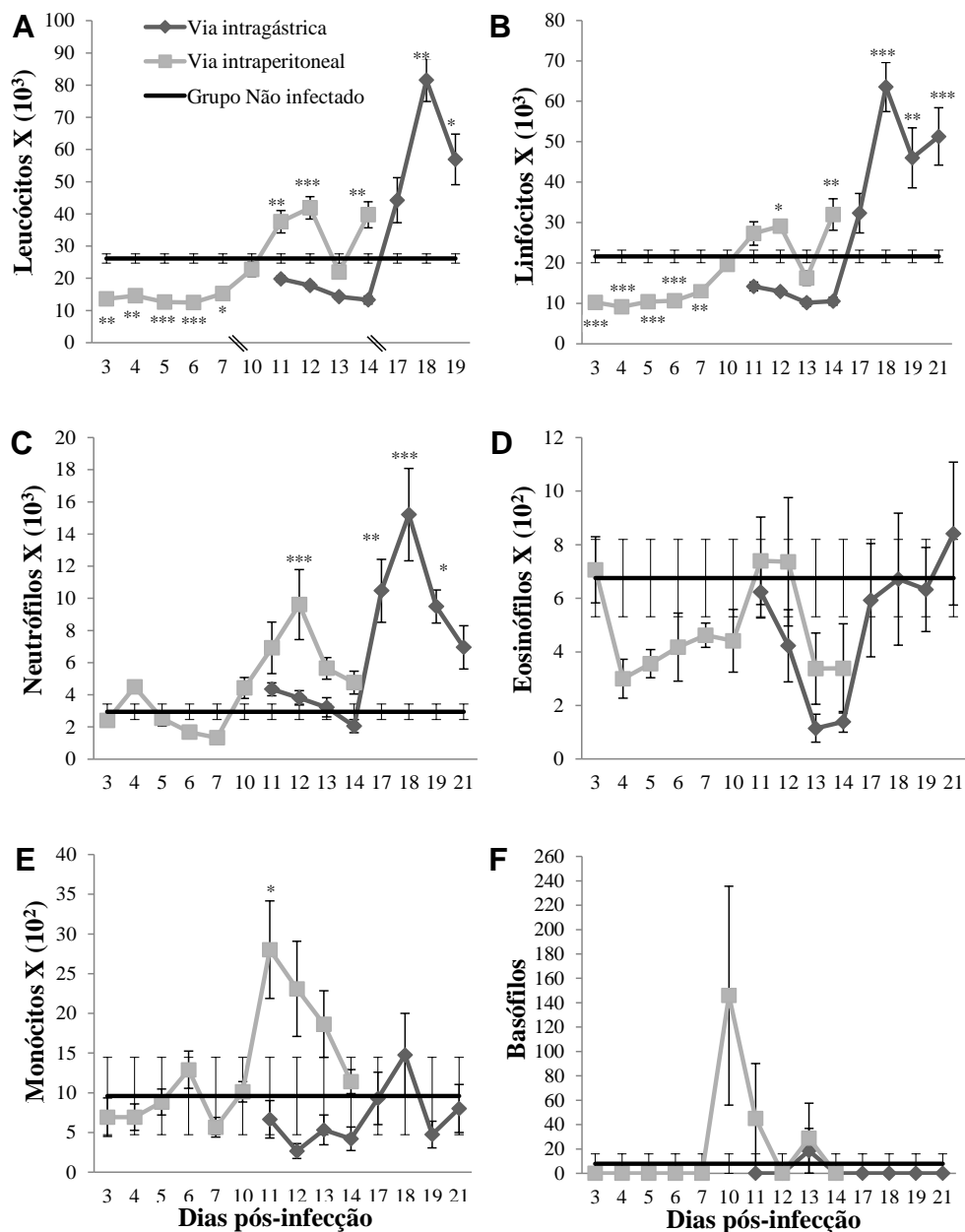
**Figura 4.3** - Curva de sobrevivência dos camundongos Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal ou intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC2005, derivadas de cultura de célula. n= 16 camundongos/grupo.

### **4.1.3 Cinética de leucometria global e diferencial**

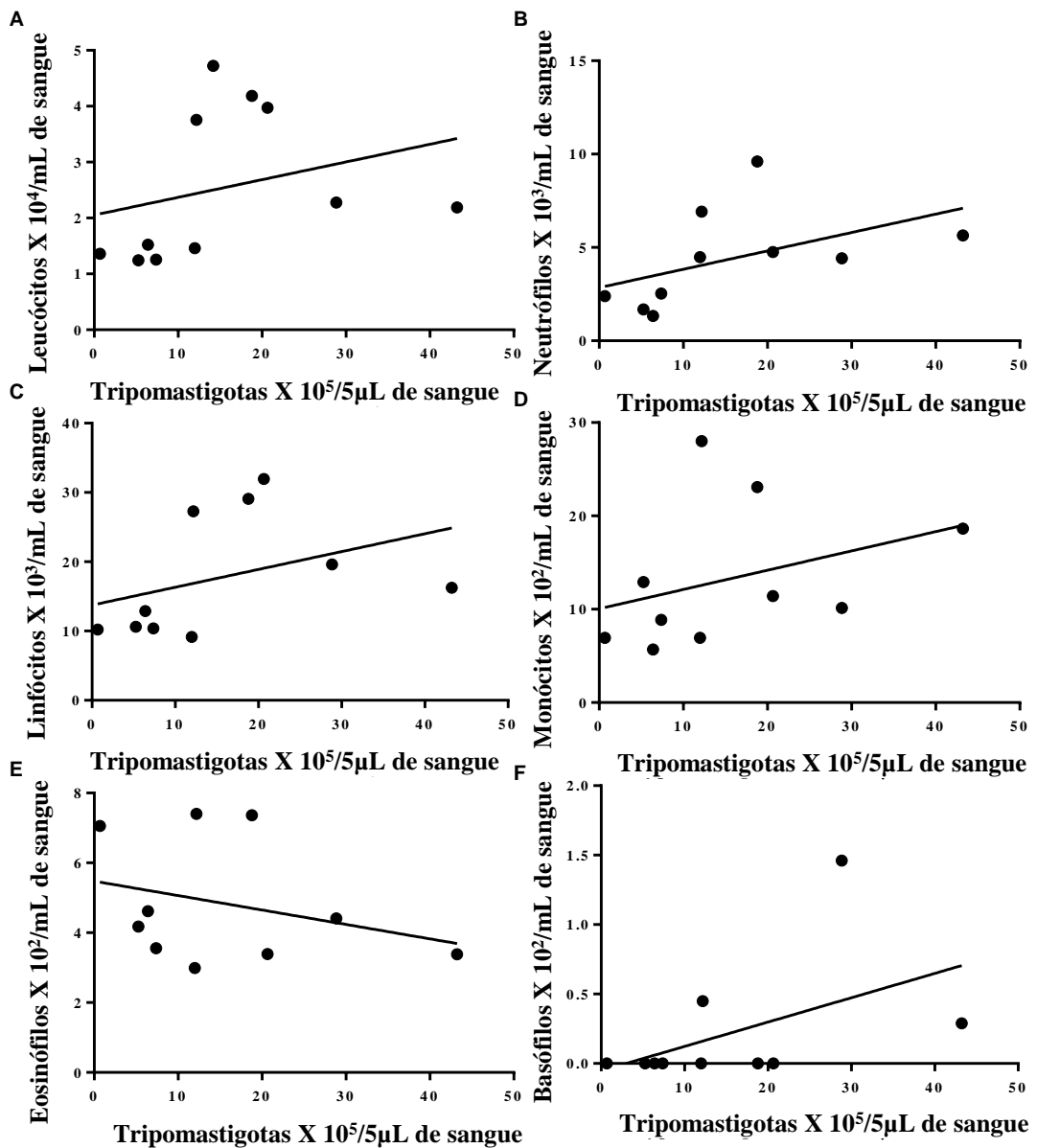
A cinética da contagem dos leucócitos totais e as contagens diferenciais dos esfregaços sanguíneos de camundongos Swiss Webster infectados pelas vias IP e IG demonstraram padrões semelhantes, com quadros alternados de leucopenia e leucocitose. Ambos os grupos de animais infectados (pelas vias IP e IG) apresentaram um quadro de leucopenia anterior ao primeiro pico parasitêmico. Os animais infectados pela via IP apresentaram leucocitose entre os picos parasitêmicos, enquanto nos animais infectados pela via IG, esta leucocitose foi observada no segundo pico parasitêmico (18<sup>o</sup> dpi). A variação no número de leucócitos, em ambos os grupos, foi marcada pela presença de neutrófilos, linfócitos e monócitos (Figura 4.4).

Foi observada uma redução do número de eosinófilos durante quase todo o experimento (Figura 4.4D). Não houve alterações significativas nos níveis de basófilos em ambos os grupos (Figura 4.4F).

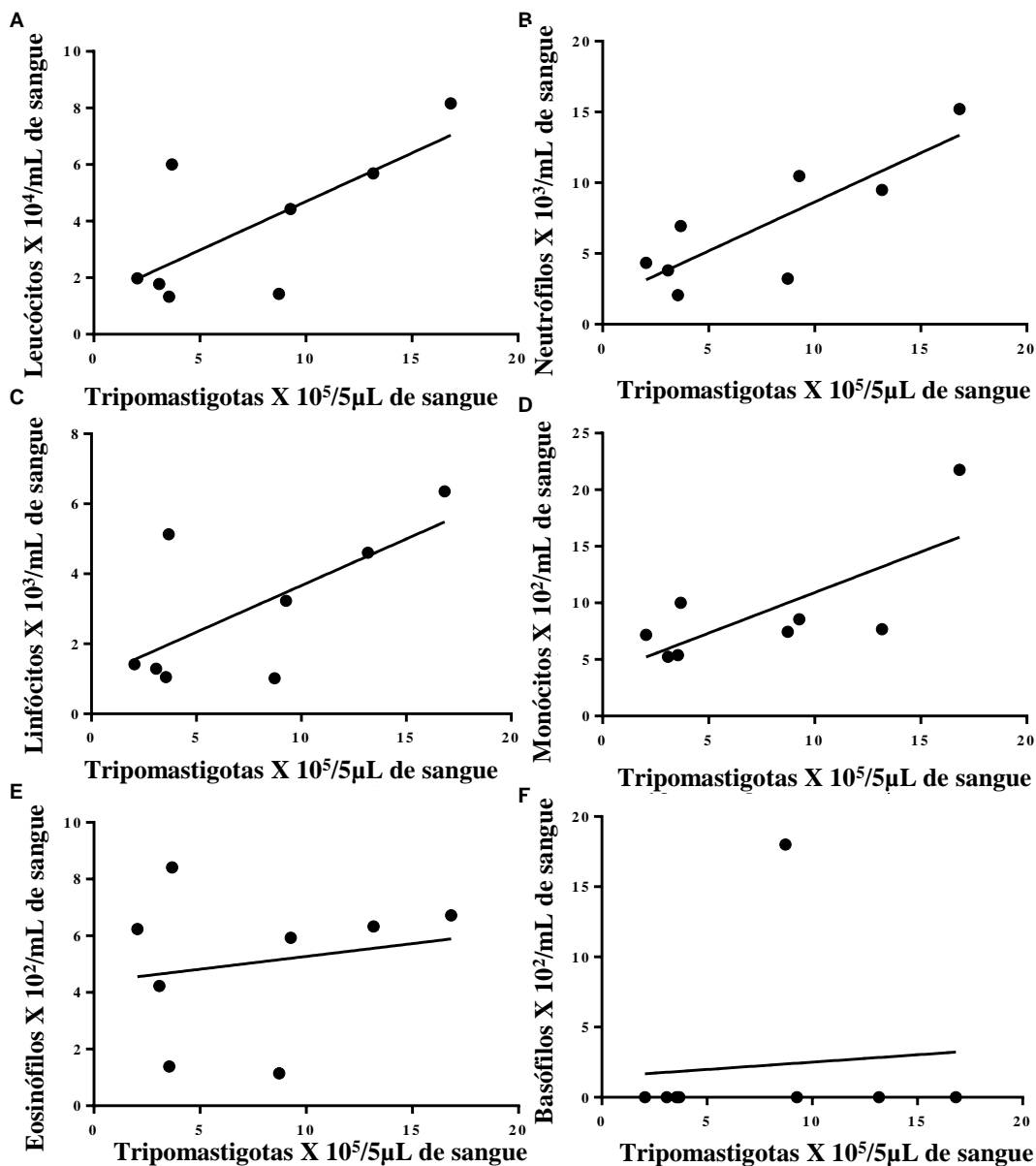
Os animais infectados pela via IP mostraram uma correlação significativa das contagens de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos com a parasitemia. Após uma redução do número de linfócitos, observada até o 7<sup>o</sup> dpi, uma linfocitose foi observada nos 12<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dpi. O número elevado de neutrófilos no 12<sup>o</sup> dpi também foi observado neste grupo (Figura 4.5 A – F). Nos camundongos inoculados pela via IG foi observada uma correlação significativa entre o número de monócitos e a parasitemia, uma vez que no momento do pico parasitêmico, aos 18<sup>o</sup> dpi, um aumento do número de monócitos foi observado (Figura 4.6 A – F).



**Figura 4.4** – Leucometria global e diferencial dos camundongos Swiss Webster controles e infectados pela via intraperitoneal ou intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC2005, derivadas de cultura de célula. n= 16 camundongos/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ . \* $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*\*\*  $p \leq 0,001$



**Figura 4.5** – Teste de Spearman dos camundongos Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal com 10<sup>7</sup> formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC2005, derivadas de cultura de célula. A correlação entre parasitemia e contagem dos leucócitos totais ( $p = 0.023/ r = 0,6727$ ), dos neutrófilos ( $p = 0.021/ r = 0,7091$ ) e dos linfócitos ( $p = 0.042/ r = 0,6485$ ) foram estatisticamente significativas.



**Figura 4.6** – Teste de Spearman dos camundongos Swiss Webster infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC2005, derivadas de cultura de célula. A correlação entre parasitemia e contagem monócitos ( $p = 0.028/ r = 0,7619$ ) foi estatisticamente significativa.

#### **4.1.4 Histopatologia**

As análises histopatológicas dos tecidos ocorreram aos 11 e 18 dpi, nos camundongos Swiss Webster infectados pela via IP, e aos 26 e 33 dpi, nos animais desta mesma linhagem infectados pela via IG. Foram observadas alterações da morfologia tecidual, presença de infiltrados inflamatórios, presença de ninhos de parasitos e alterações das fibras de colágeno.

##### **4.1.4.1 Análise histológica dos órgãos dos animais controle não infectados**

A avaliação histológica dos órgãos dos animais do grupo controle não infectado da linhagem Swiss Webster mostrou o aspecto normal dos tecidos, sem alterações morfológicas visíveis.

##### **4.1.4.2 Análise histopatológica dos órgãos dos camundongos da linhagem Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal (IP)**

Os animais infectados pela via IP apresentaram infiltrados inflamatórios difusos (que variaram de leves a intensos), com a presença principalmente de monócitos e linfócitos no esôfago (Figura 4.7A), estômago (Figura 4.7B), intestino (Figura 4.7C), coração, fígado, pâncreas, glândula adrenal, bexiga, útero e tecido adiposo.

As camadas mucosa e submucosa dos diferentes órgãos raramente demonstraram qualquer presença de células inflamatórias mononucleares, apresentando-se normais na maioria dos casos. No entanto, as camadas musculares se mostraram frequentemente afetadas pela presença de infiltrados inflamatórios.

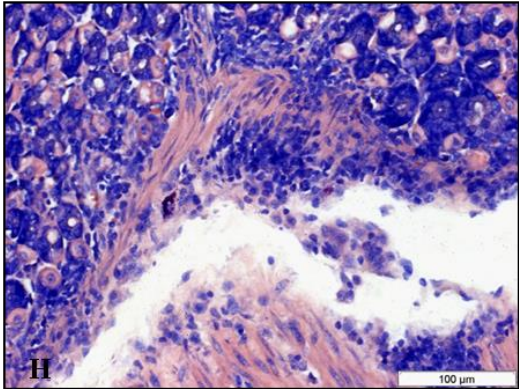
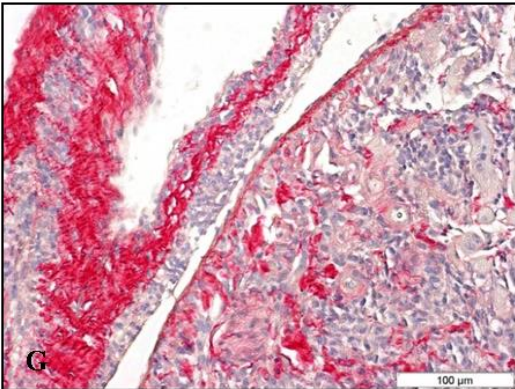
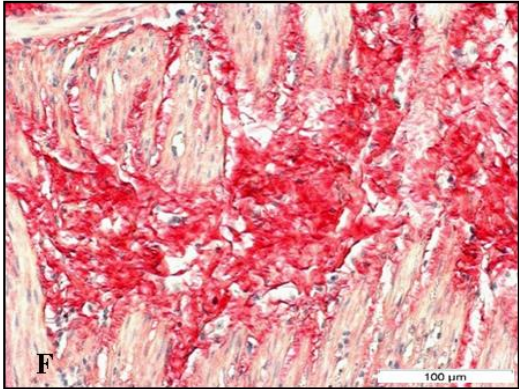
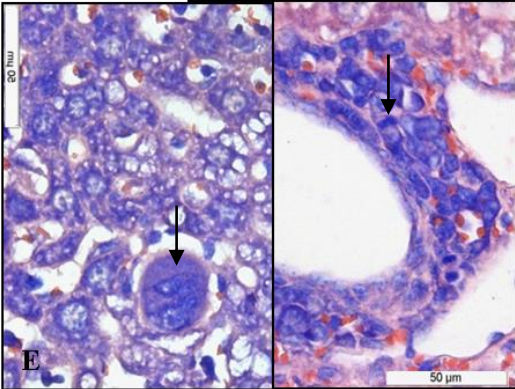
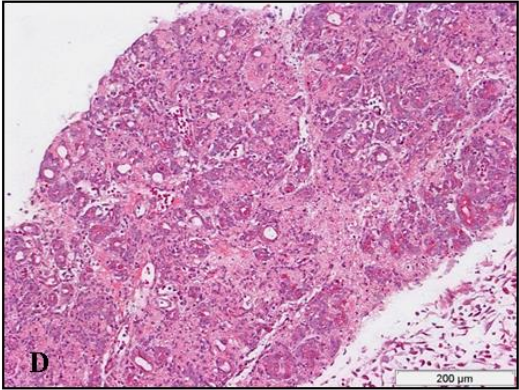
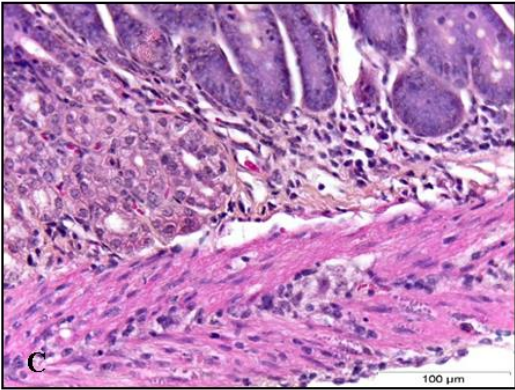
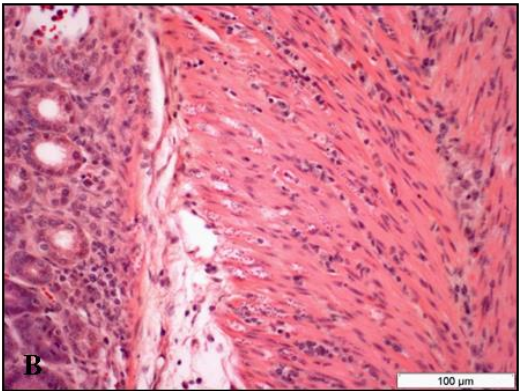
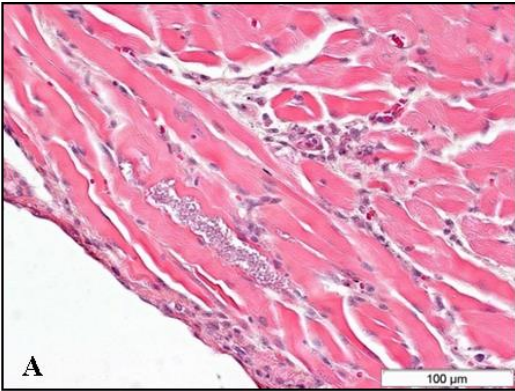
Aos 11 dpi foram observados infiltrados inflamatórios leves (+) no esôfago e intestino com a presença de parasitos, ambos nas camadas musculares do órgão. Estômago e coração apresentaram infiltrados inflamatórios difusos e moderados (++) com a presença de ninhos de amastigotas de *T. cruzi*. O fígado apresentou infiltrado inflamatório focal de média (++) intensidade, com extravasamento celular dos vasos para o tecido e a presença de células imaturas e megacariócitos. O pâncreas se mostrou muito alterado, com pancreatite associada à necrose focal (Figura 4.7D) e ninhos de amastigotas nas ilhotas de Langerhans.



Aos 18 dpi não foram observados ninhos de parasitos no esôfago e intestino. O estômago apresentou infiltrado inflamatório (++) associado a presença de ninhos do parasito. O coração mostrou maior inflamação (+++), com um maior número de células inflamatórias localizadas no átrio, além da presença de inúmeros ninhos de *T. cruzi*. O fígado se apresentou menos inflamado neste momento (+), porém ainda estavam presentes células imaturas, megacariócitos e células mitóticas (Figura 4.7E). O pâncreas apresentou pancreatite moderada com infiltrado inflamatório linfocitário.

Em ambos os pontos, a coloração por Picrosirius Red mostrou uma redistribuição e aumento de depósitos de colágeno, os quais estavam associados aos infiltrados inflamatórios no esôfago, estômago (Figura 4.7F), coração (Figura 4.7G), bexiga e útero. Além disso, observou-se hiperplasia dos centros germinativos do baço e dos gânglios linfáticos. Os mastócitos estavam presentes no tecido adiposo, coração e estômago (Figura 4.7H). Milky-spots ativados, próximos aos estômago, foram observados, com a presença de células mieloides.

**Figura 4.7** – Alterações histopatológicas nos camundongos Swiss Webster infectados pela via intraperitoneal com  $10^7$  formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC2005, derivadas de cultura de célula. (A) esôfago, (B) estômago e (C) intestino mostrando infiltrado inflamatório e ninhos de amastigotas nas camadas musculares aos 11 dpi; (D) Pancreatite com necrose focal aos 11 dpi (HE); (E) Fígado mostrando megacariócitos no lado esquerdo (seta) e células mitóticas no lado direito (seta) aos 18 dpi (Giemsa); (F) Estômago, aos 11 dpi, e (G) coração, aos 18 dpi, com redistribuição e aumento dos depósitos de colágeno nas áreas com infiltrados inflamatórios (Picrosirius red); (H) Presença de mastócitos no estômago aos 18 dpi (Giemsa).



#### **4.1.4.3 Análise histopatológica dos órgãos dos camundongos da linhagem Swiss Webster infectados pela via intragástrica (IG)**

Foram observados, em todos os pontos analisados, infiltrados inflamatórios mononucleares difusos, com intensidade de leve (+) a moderada (++), principalmente nas camadas musculares do estômago, esôfago e intestino, assim como no fígado, rim, bexiga, útero, encéfalo e tecidos adiposos (Figura 4.8A - C).

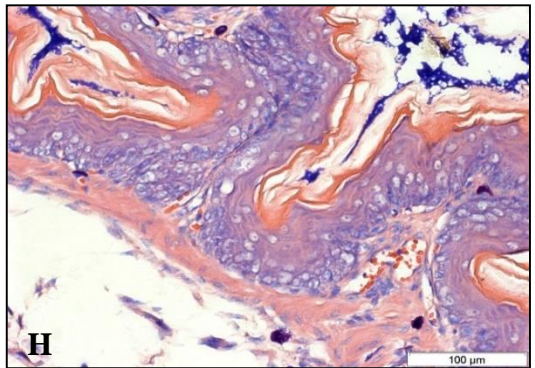
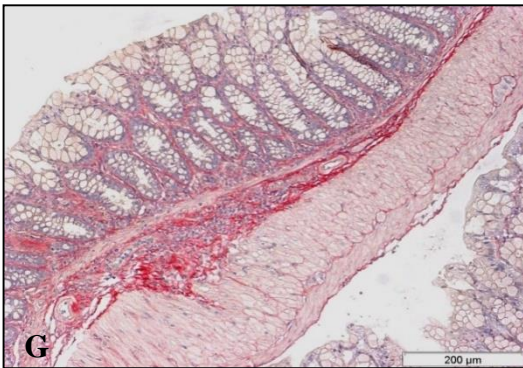
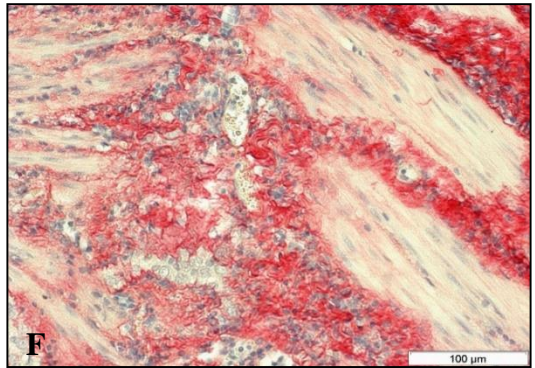
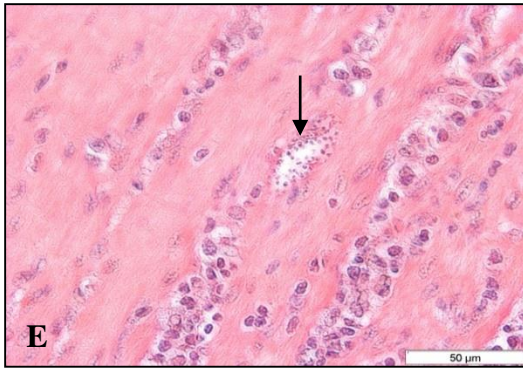
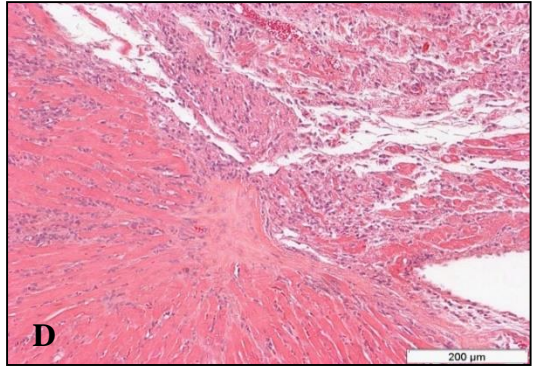
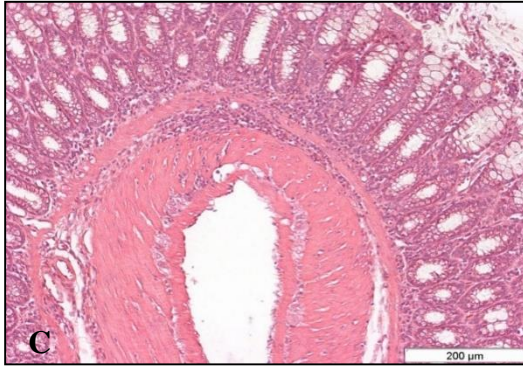
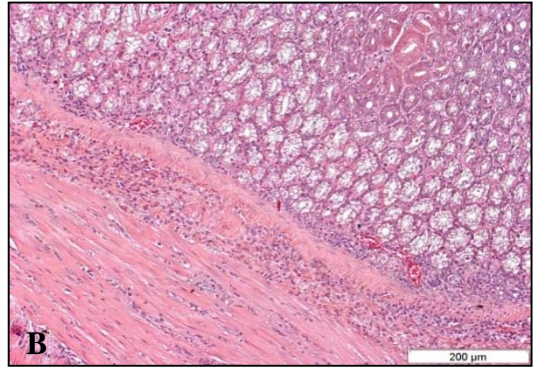
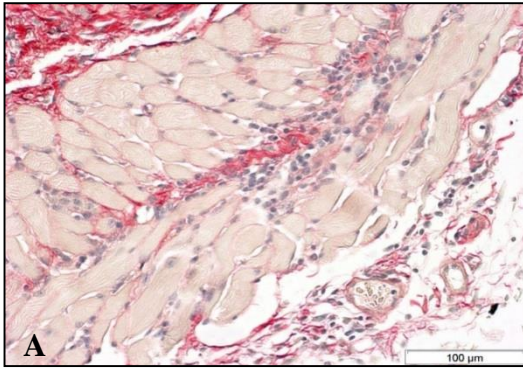
Aos 26 dpi, o coração apresentou infiltrado inflamatório moderado e difuso no endocárdio, pericárdio e de maior intensidade no átrio. A presença de plasmócitos e ninhos de parasitos foram menos frequentes do que o observado nos animais infectados pela via IP.

Aos 33 dias o coração apresentou infiltrado inflamatório muito intenso (+++) com poucos ninhos de parasitos (Figura 4.8D e E).

Em ambos os pontos foi observada hiperplasia dos centros germinativos do baço e dos gânglios linfáticos e pouco acometimento do pâncreas, em relação aos camundongos infectados pela via IP. A coloração por Picrosirius Red mostrou uma redistribuição e aumento de depósitos de colágeno nos focos inflamatórios observados no esôfago (Figura 4.8A), estômago (Figura 4.8F), intestino (Figura 4.8G), coração, baço, fígado, pâncreas, útero e tecido adiposo.

Além disto, mastócitos estavam presentes no tecido adiposo, bexiga e estômago (Figura 4.8H). Os parasitos eram escassos no estômago, na bexiga e no tecido adiposo. Milky-spots ativados também foram observados, com a presença de células mieloides imaturas e maduras. Células imaturas e megacariócitos foram observados no fígado.

**Figura 4.8** – Alterações histopatológicas nos camundongos Swiss Webster infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC2005, derivadas de cultura de célula. (A) Esôfago (Picrosirius red), (B) estômago e (C) intestino com infiltrados inflamatórios na camada muscular aos 26 dpi (HE); (D) Coração com infiltrado inflamatório intenso principalmente no átrio e (E) ninhos de amastigotas (seta) aos 33 dpi (HE); (F) estômago e (G) intestino apresentando redistribuição e aumento de fibras colágenas nas áreas com infiltrados inflamatórios aos 26 dpi (Picrosirius red); (H) Presença de mastócitos no estômago aos 33 dpi (Giemsa).



#### **4.1.5 Quantificação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> por citometria de fluxo**

##### **4.1.5.1 Baço**

A análise do baço de animais infectados pela via IP, aos 11 dpi, mostrou uma diminuição no número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e um ligeiro aumento de CD4<sup>+</sup>. Aos 18 dpi, um aumento de 117% no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi observado, quando comparado com o número deste tipo celular presente em camundongos controles não infectados.

A análise do baço dos camundongos Swiss Webster infectados pela via IG aos 26 dpi mostrou aproximadamente o mesmo número de células T CD4<sup>+</sup> observadas no grupo controle. Neste momento da infecção, o número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi 205% maior nos animais infectados quando comparados com os controles, além de se mostrarem mais elevados do que nos camundongos infectados pela via IP, independente do momento da infecção. As células duplo positivas dos animais infectados pela via IG aumentaram aproximadamente 17 vezes quando comparadas com os animais controles. Esta população celular também esteve mais elevada em relação aos camundongos inoculados pela via IP. Aos 33 dpi os animais infectados pela via IG mostraram perfis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> semelhantes aos observados aos 26 dpi. No entanto, o número de células duplo positivas se mostrou reduzido quando comparado com os observados aos 26 dpi, porém elevado se comparado aos animais controles não infectados (Tabela 4.1).

##### **4.1.5.2 Sangue**

A análise do perfil de linfócitos T no sangue dos animais infectados pela via IP aos 11 dpi não mostrou nenhuma alteração. No 18<sup>o</sup> dpi foi observado apenas um discreto aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e de células duplo positivas.

Os camundongos Swiss Webster infectados pela via IG apresentaram, aos 26 dpi, uma redução de 64% de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e um aumento de 4 vezes no número de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Um aumento do número de células duplo positivas, quando comparadas ao controle, também foi observado neste momento da infecção. Aos 33 dpi, a quantidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e de células duplo positivas também estava aumentada, com valores semelhantes aos observados nos 26 dias de infecção. A quantidade de células T CD4<sup>+</sup> ainda se mostrou reduzida, embora tenha sido observado um pequeno aumento em relação ao tempo anterior. A redução da

população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e o aumento dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram observados em ambos os tempos quando comparados ao grupo controle (Tabela 4.1).

#### **4.1.5.3 Linfonodos mesentéricos**

A análise dos linfonodos mesentéricos, após 11 dias de infecção pela via IP, mostrou uma redução na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em relação ao grupo controle. Aos 18 dias de infecção os números de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> apresentaram valores aproximados aos observados nos camundongos controles. Contudo um discreto aumento das células duplo positivas foi observado.

Nos camundongos infectados pela via IG, aos 26 dpi, uma redução (41%) do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi observada. A quantidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e de células duplo positivas CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foi semelhante à observada nos animais do grupo controle. Aos 33 dpi o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> também se mostrou diminuído em relação ao controle, no entanto, esta redução foi menor do que a apresentada aos 26 dias. Neste momento da infecção, assim como aos 26 dpi não houve variação da quantidade de de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e de células duplo positivas quando comparado ao grupo controle (Tabela 4.1).

#### **4.1.6 PCR**

A avaliação da qualidade e integridade do DNA extraído, realizada através da amplificação do gene endógeno GAPDH, em três amostras escolhidas aleatoriamente, foi satisfatória. As amostras testadas apresentaram uma banda de 171 pares de base, referente ao resultado da amplificação do endogene.

A PCR, para a detecção do DNA do *T. cruzi* no esôfago, estômago e intestino, demonstrou que todas as amostras dos camundongos Swiss Webster infectados pelas vias IP e IG apresentaram uma banda referente a um fragmento de 330 pares de base, correspondente ao DNA do parasito (Figura 4.9).

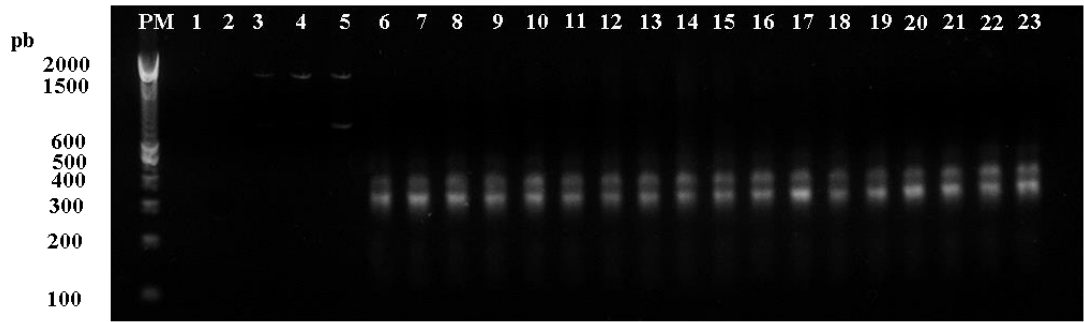


**Tabela 4.1** – Análise dos perfis de linfócitos T no baço, sangue e linfonodos mesentéricos de camundongos inoculados pelas vias intraperitoneal ou intragástrica com o  $10^7$  formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolado SC2005, derivadas de cultura de célula. n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos os valores com o  $p < 0,05$ . \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

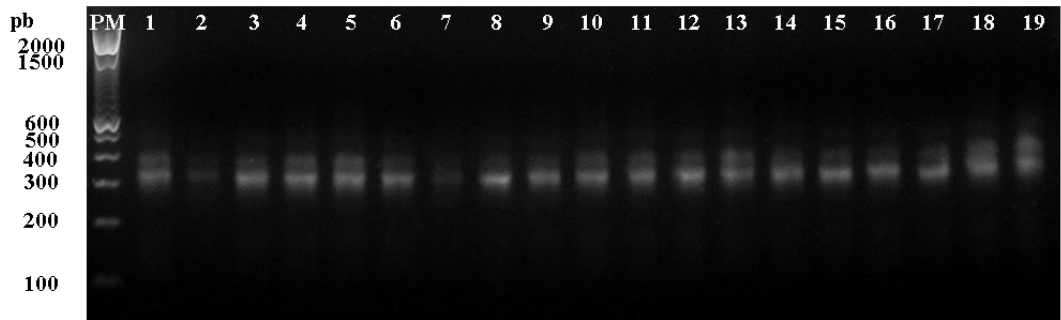
		Subpopulações de Linfócitos			
		CD4+	CD8+	CD4+;CD8+	
<b>BAÇO</b>	<b>Grupo controle</b>	14,97% ± 2%	6,38% ± 1%	0,18% ± 0	
	<b>Via IP</b>				
	11°	17,22% ± 2%	4,08% ± 0	0,20% ± 0	
	18°	32,61% ± 0**	12,43% ± 0	1,10% ± 0	
	26°	12,51% ± 1%	19,51% ± 1%**	3,05% ± 1%	
	33°	12,29% ± 0%	20,92% ± 5%**	1,49% ± 0	
<b>SANGUE</b>	<b>Grupo controle</b>	29,40% ± 3%	11,43% ± 2%	1,92% ± 1%	
	<b>Via IP</b>				
	11°	33,62% ± 3%	13,30% ± 5%	3,55% ± 2%	
	18°	27,76% ± 0	19,65% ± 0	2,40% ± 0	
	26°	10,38% ± 0*	44,69% ± 0**	3,63% ± 0	
	33°	18,92% ± 5%	48,11% ± 9%**	2,70% ± 0	
<b>LINFONODOS MESENTÉRICOS</b>	<b>Grupo controle</b>	34,39% ± 3%	15,13% ± 2%	0,58% ± 0	
	<b>Via IP</b>				
	11°	25,25% ± 0*	10,65% ± 1%	0,37% ± 0	
	18°	38,05% ± 0	15,62% ± 0	0,97% ± 0	
	26°	20,51% ± 4%**	14,01% ± 2%	1,66% ± 1%	
	33°	26,45% ± 1%*	15,77% ± 2%	0,62% ± 0	

**Figura 4.9** – Eletroforese em gel de agarose a 2%, mostrando os produtos de 330 pb da PCR utilizando os primers 121 e 122. (A) Camundongos Swiss Webster controle e infectados pela via intraperitoneal com *T. cruzi*. Colunas 1 e 2: controle negativo; 3 a 5: camundongos não infectados (grupo controle) (3- esôfago, 4- estômago, 5- intestino); 6 a 14: animais infectados - 11 dpi (6- esôfago do camundongo número 1 (c1); 7- estômago (c1); 8 intestino (c1); 9-esôfago (c2); 10- estômago (c2); 11- intestino (c2), 12-esôfago (c3), 13- estômago (c3), 14 intestino (c3)); 15 a 23: camundongos infectados - 18 dpi. (15- esôfago (c1); 16- estômago (c1); 17-intestino (c1); 18-esôfago (c2); 19- estômago (c2); 20 intestino (c2); 21-esôfago (c3); 22- estômago (c3), 23- intestino (c3)). (B) Camundongos Swiss Webster infectados pela via intragástrica com *T. cruzi*. Colunas 1 a 9: animais infectados - 26 dpi (1 esôfago (c1), 2- estômago (c1), 3- intestino (c1), 4- esofágico (c2), 5- estômago (c2), 6- intestino (c2); 7- esôfago (c3); 8- estômago (c3); 9- intestino (c3)); 10 a 18: camundongos infectados - 33 dpi. (10-esôfago (c1); 11- estômago (c1); 12 intestino (c1); 13- esôfago (c2); 14- estômago (c2); 15 intestino (c2); 16-esôfago (c3); 17- estômago (c3); 18-intestino (c3)); 19: controle positivo. PM: marcador de DNA de 100 pb.  
n=6 camundongos/dpi/grupo.

**A**



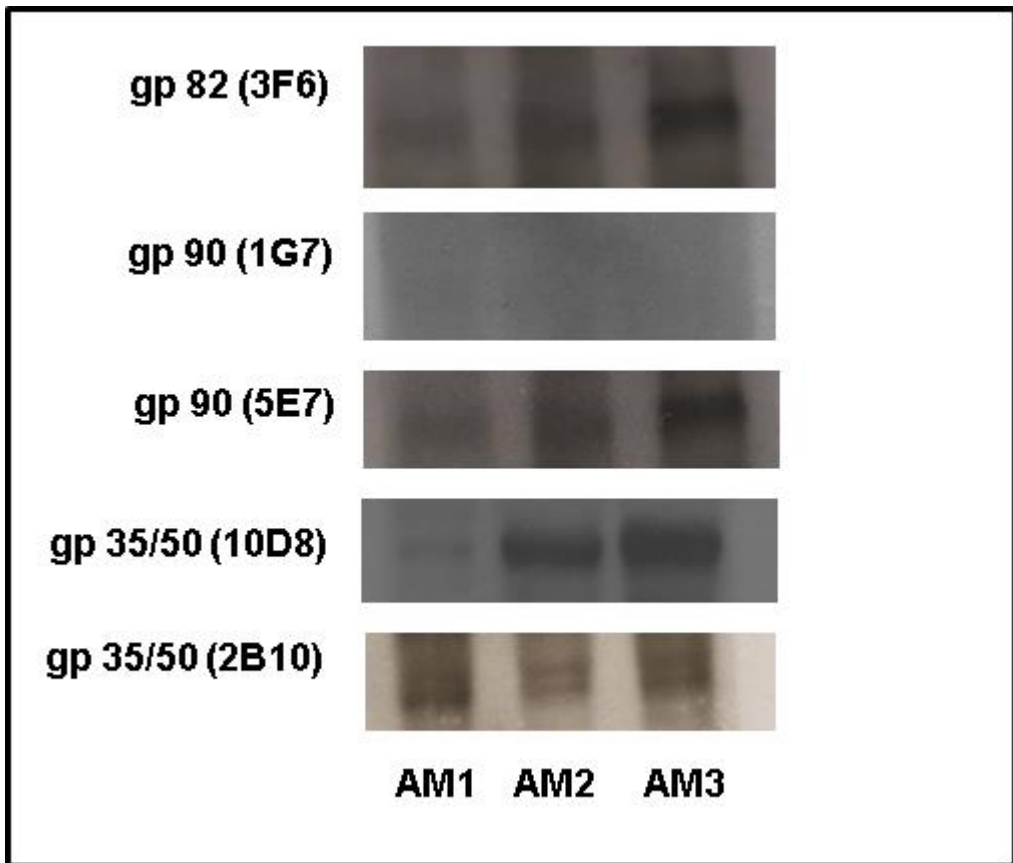
**B**



## **4.2 Parte II – Infecção de camundongos A e BALB/c com o isolado SC 2005 de *T. cruzi*, pela via IG**

### **4.2.1 Avaliação de proteínas de superfície das formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi***

A avaliação das glicoproteínas de superfície: gp82, gp90 e gp35/50 do *T. cruzi*, por western blotting utilizando amostras de parasitos de cultura axênica com 7 (AM1), 15 (AM2) e 22 (AM3) dias, mostrou diferenças nas expressões das mesmas conforme o tempo de cultivo. Utilizando o anticorpo monoclonal (mAb) 3F6A, podemos observar a expressão da glicoproteína gp82 de forma crescente com o passar do tempo de cultivo, estando mais expressa aos 22 dias. Utilizando o mAb 1G7 não foi observada a expressão da glicoproteína gp90 em nenhum dos tempos de cultivo do parasito, porém, a expressão de gp90 aparece aumentada aos 22 dias de infecção, quando utilizamos o mAb 5E7 para o seu reconhecimento. A glicoproteína gp35/50 também se apresentou mais evidente aos 22 dias sendo identificada tanto pelo mAb 2B10, que reconhece estas glicoproteínas em todas as cepas de *T. cruzi*, quanto pelo mAb 10D8. Portanto, a presença aumentada das glicoproteínas de superfície aos 22 dias de cultivo do *T. cruzi* confirmam a presença de formas tripomastigotas metacíclicas neste tempo, sendo essas formas utilizadas para a realização dos experimentos (Figura 4.10).

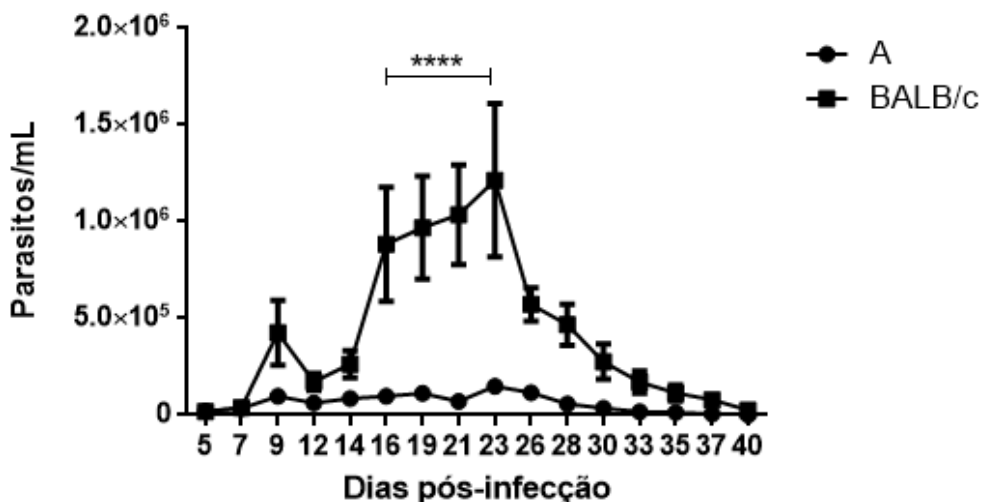


**Figura 4.10** – Avaliação, por Western blotting, das glicoproteínas de superfície gp82, gp90 e gp35/50 de culturas axênicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, com 7 (AM1), 15 (AM2) e 22 (AM3) dias. n=3 amostras/dia.

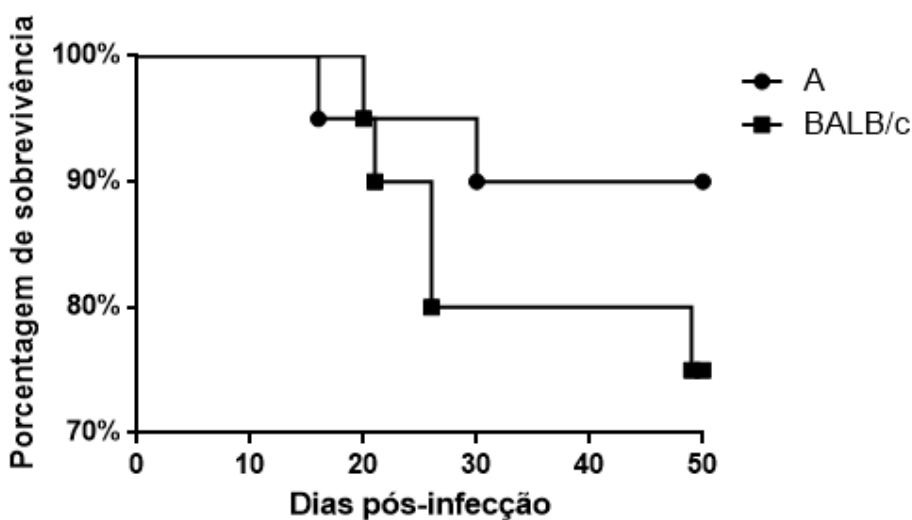
#### **4.2.2 Parasitemia e mortalidade**

A porcentagem de infecção de ambas as linhagens de camundongos foi de 100% e a figura 4.11 mostra os níveis de parasitemia dos camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica (IG). Ambas as linhagens de camundongo apresentaram parasitemia presente a partir do 5º dia pós-infecção (dpi), porém, a parasitemia dos camundongos BALB/c foi mais elevada que a observada nos camundongos da linhagem A, com diferença significativa nos dias 16,19, 21 e 23 após a infecção. Apesar da diferença no número de parasitos no sangue, ambas as linhagens apresentaram um pico mais evidente aos 23 dpi. Os animais da linhagem BALB/c apresentaram carga parasitária de  $1,2 \times 10^6$  parasitos/mL, ao passo que os camundongos da linhagem A apresentaram  $1,4 \times 10^5$  parasitos/mL no mesmo período. A linhagem A apresentou uma curva parasitêmica irregular, com oscilações no número de parasitos no decorrer da infecção, e redução do número de parasitos a partir do 28º, até o 40º dpi. A linhagem BALB/c também apresentou irregularidade na parasitemia do 5º ao 14º dpi, porém, do 14º ao 16º dpi ocorreu aumento significativo e constante do número de parasitos no sangue desses animais. Este número se manteve elevado e significativamente maior que o da linhagem A até o 23º dpi. Após este período ocorreu uma diminuição significativa da parasitemia que se manteve até o 40º dpi (Figura 4.11).

Camundongos A foram os primeiros a morrer, aos 16 dpi, antes do pico parasitêmico observado no 23º dpi, porém, o percentual de sobrevivência desta linhagem foi maior, em torno de 90%, quando comparado com os animais da linhagem BALB/c, que apresentaram um percentual de sobrevivência de 75% aos 50º dpi. O tempo médio de mortalidade dos camundongos A foi de  $23 \pm 7,0$  dias enquanto dos animais da linhagem BALB/c infectados foi posterior, em torno dos  $28 \pm 8,0$  dias. Portanto, a mortalidade dos camundongos da linhagem BALB/c foi maior, contudo mais tardia que a dos camundongos da linhagem A (Figura 4.12).



**Figura 4.11** - Parasitemia dos camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005. n=20 camundongos por grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ . \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .



**Figura 4.12** - Curva de sobrevida dos camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005. n=20 camundongos por grupo.

### **4.2.3 Avaliação do Hemograma**

A avaliação do hemograma de ambas as linhagens estudadas indicou uma significativa redução nos valores da contagem de hemácias (CH), dosagem de hemoglobina (Hgb) e no hematócrito (Hct) aos 14 e 21 dpi, quando comparados aos valores apresentados pelos camundongos controle não infectados (Figura 4.13 A - F).

O acompanhamento destes parâmetros durante a infecção demonstrou um perfil diferente entre as linhagens. Embora a cinética da contagem de hemácias, de ambas as linhagens, tenha apontado uma redução significativa deste parâmetro durante a evolução da infecção, principalmente entre o 7º e o 14º dpi, entre o 14º e o 21º dpi os animais infectados da linhagem A permaneceram mostrando uma diminuição significativa do número de hemácias. Os animais BALB/c, neste mesmo período, demonstraram um significativo aumento, apesar dos valores observados ainda estarem abaixo dos apresentados pelos camundongos não infectados. Esta variação não foi observada nos camundongos controle, que permaneceram com valores semelhantes durante todo o período (Figura 4.13 A e B). A cinética da dosagem de hemoglobina também apontou o mesmo padrão apresentado na contagem de hemácias. Porém, a expressão desta proteína apresentou um significativo aumento entre o 21º e 40º dpi, retornando a valores semelhantes aos apresentados pelos camundongos não infectados em ambas as linhagens estudadas (Figura 4.13 C e D). O acompanhamento do hematócrito mostrou significativa redução entre o 7º e o 14º dpi com constantes e significativos aumentos entre o 14º e o 21º, 21º e 40º dpi, nos camundongos infectados da linhagem BALB/c (Figura 4.13 E e F).

De acordo com o exposto, foi possível observar que a queda nos valores da contagem de hemácias, da dosagem de hemoglobina e do hematócrito foi mais acentuada nos camundongos A aos 21 dias e nos BALB/c aos 14. Após este acentuado declínio observou-se uma tendência de normalização dos parâmetros avaliados (Figura 4.13 A – F).

A análise do volume corpuscular médio (VCM) também mostrou uma diminuição deste, quando comparou-se os camundongos da linhagem BALB/c infectados aos não infectados, aos 21 dpi. A cinética de avaliação deste parâmetro mostrou uma diminuição significativa entre o 14º e 21º dpi, com posterior retorno do VCM ao valor semelhante apresentado pelos animais controle não infectados no 40º



dpi (Figura 4.13 G e H). Nenhuma alteração nesse parâmetro foi observada nos animais da linhagem A.

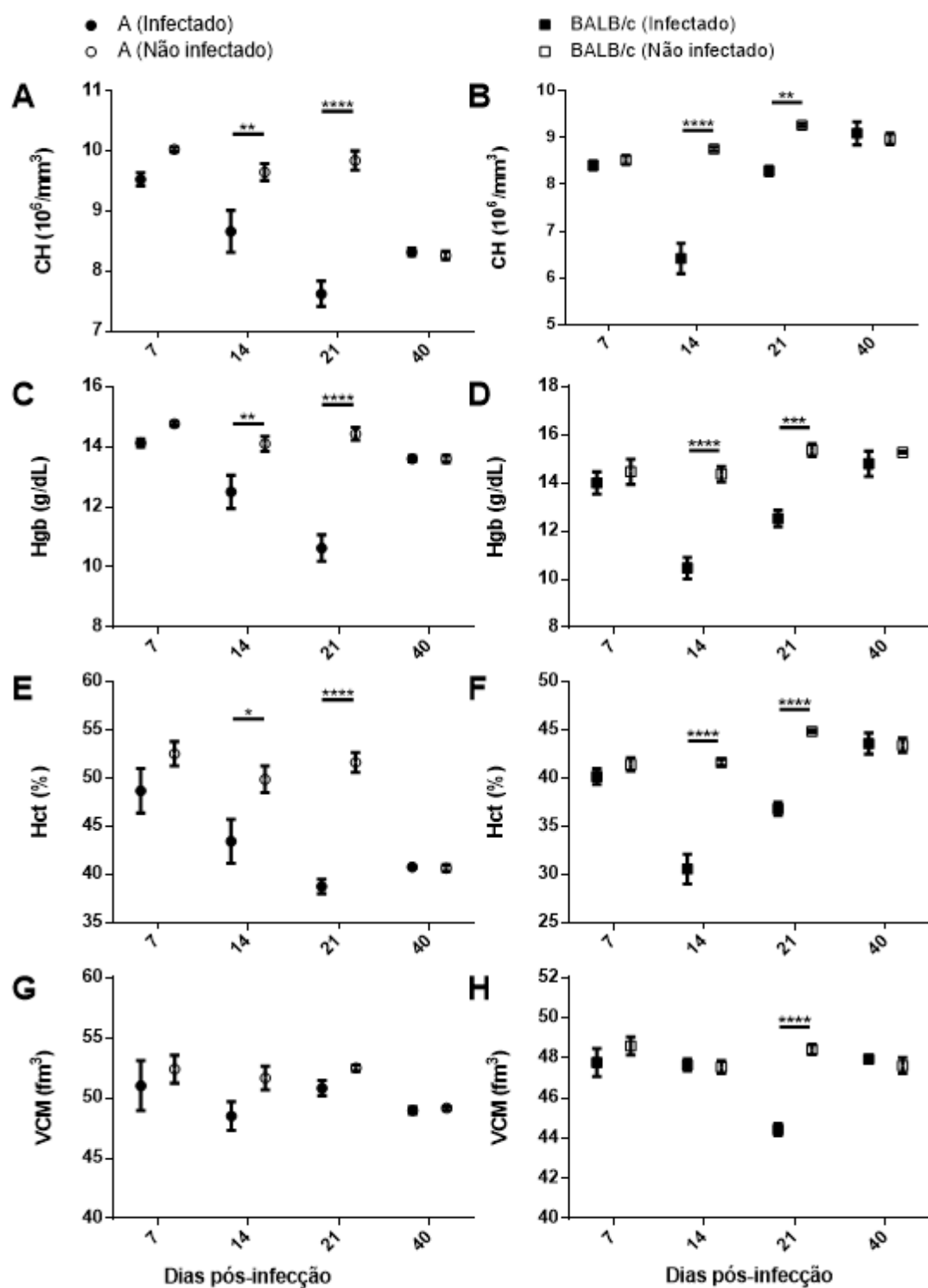
Alterações também foram observadas na quantidade de hemoglobina corpuscular média (HCM) dos animais infectados. Aos 21 dpi, camundongos A e BALB/c infectados apresentaram uma redução deste parâmetro no sangue (Figura 4.14A e B). No entanto, a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) se manteve estável durante todo o período estudado (Figura 4.14C e D).

A contagem global de leucócitos (CL) mostrou uma grande elevação do número destas células no sangue de ambas as linhagens infectadas, aos 21 e aos 40 dpi. O acompanhamento deste parâmetro indicou um aumento de leucócitos entre o 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dpi, e a manutenção destes valores elevados até o final do experimento (Figura 4.14E e F). A alteração deste parâmetro foi caracterizada pelo aumento das populações de monócitos e linfócitos, caracterizando-se uma monocitose e uma linfocitose respectivamente, além da observação de uma atipia linfocitária, descrita no laudo do hemograma, em ambas as linhagens de camundongos.

A contagem de plaquetas (PLT) mostrou valores elevados aos 21 dpi somente nos camundongos BALB/c infectados (Figura 4.14G e H).

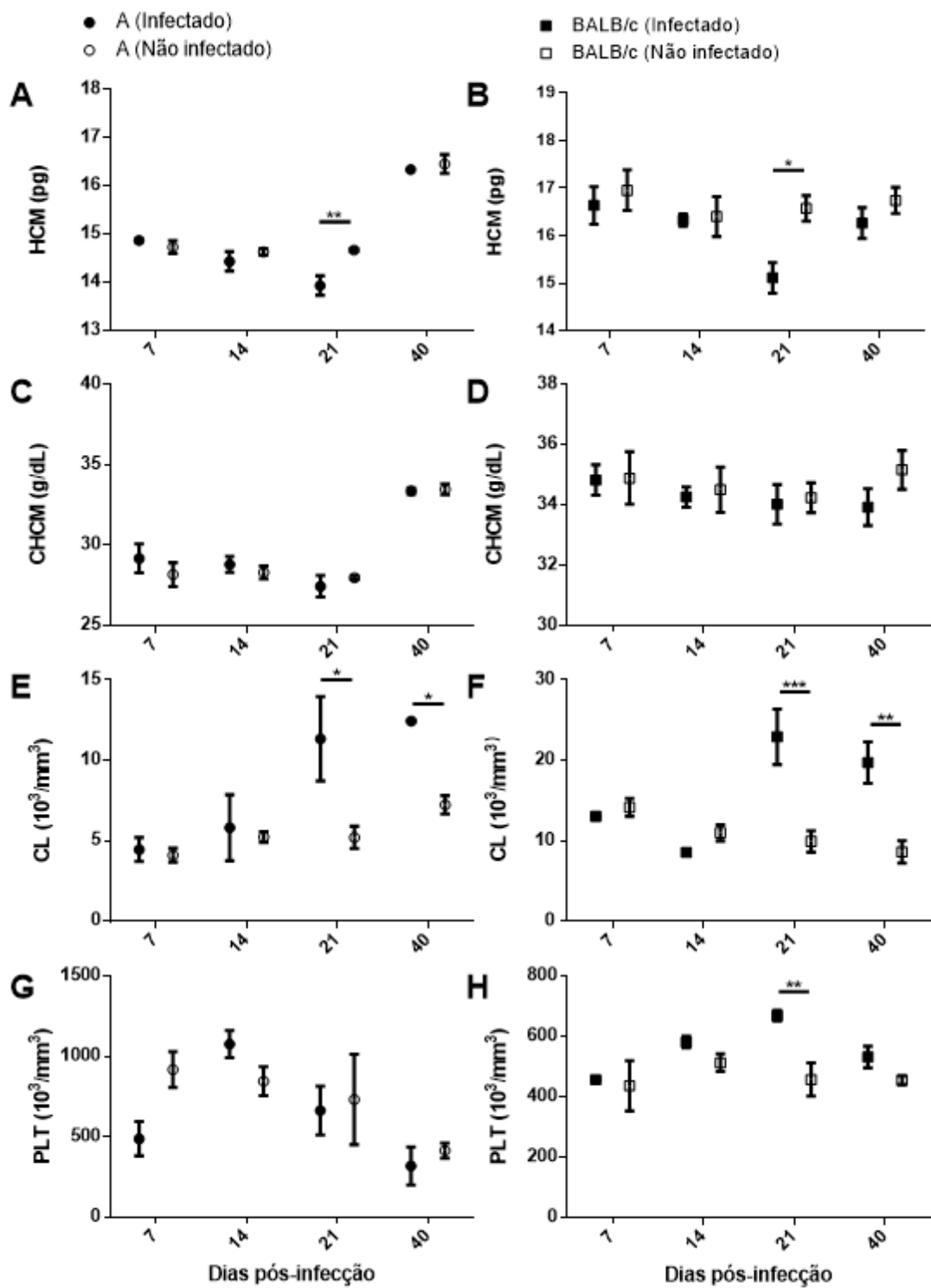
**Figura 4.13** – Eritrograma dos camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ . n=6 camundongos/dpi/grupo.

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .



**Figura 4.14** – Hemograma dos camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005. n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ .

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

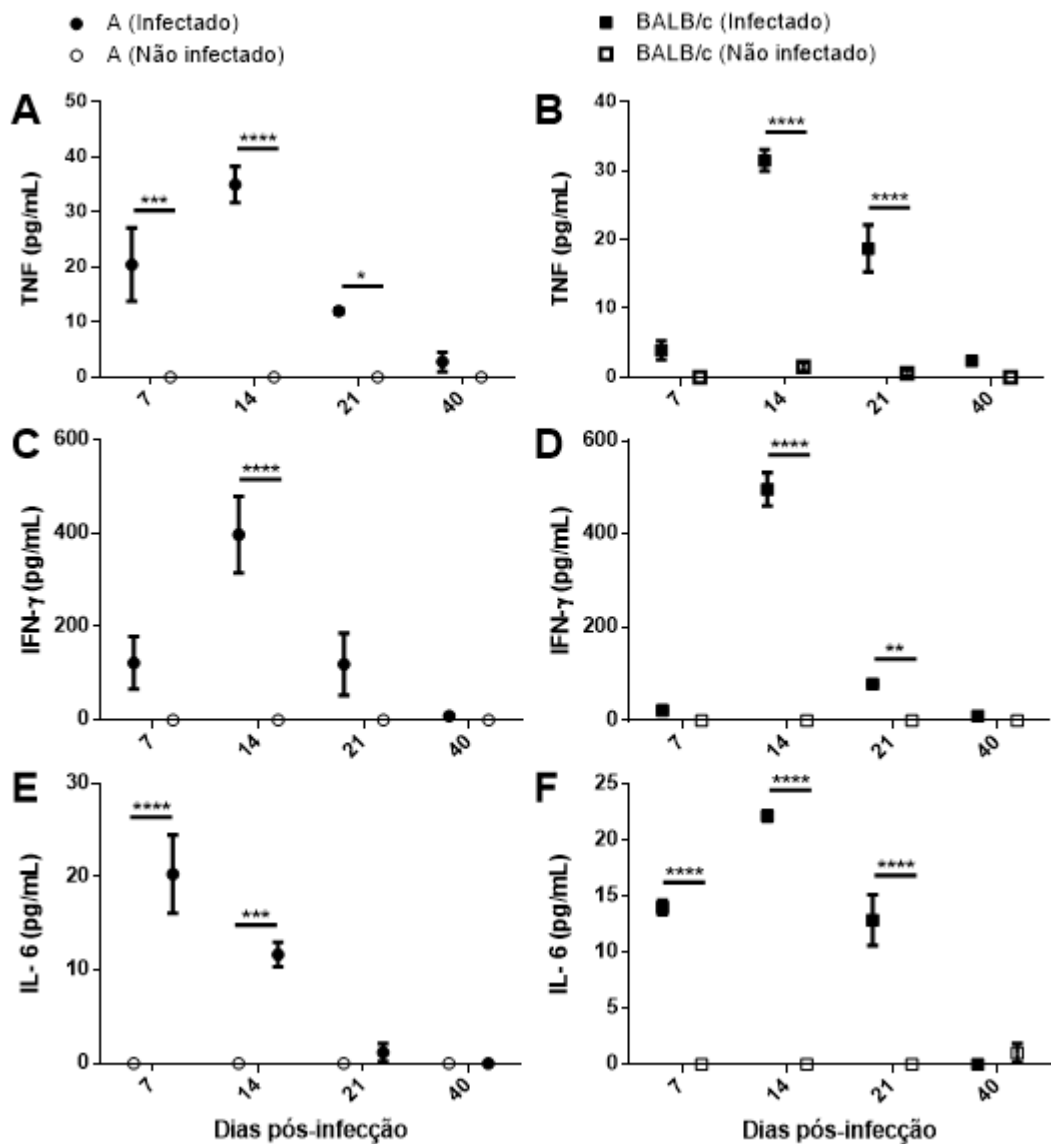


#### 4.2.4 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas, utilizando o kit CBA, não evidenciou alterações nas citocinas IL-10, IL-4, IL-2 e IL-17A. No entanto, as citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 apresentaram alterações significativas nos animais das linhagens A e BALB/c infectados com *T. cruzi* (Figura 4.15).

A dosagem de TNF- $\alpha$  no soro dos camundongos A mostrou elevação desta citocina a partir do 7<sup>o</sup> dpi atingindo níveis mais altos aos 14 dpi, em torno de 35 pg/mL. A partir deste momento ocorreu uma redução dos níveis desta citocina, porém, estes ainda permaneceram elevados aos 21 dpi, alcançando níveis semelhantes aos dos animais controle não infectados no 40<sup>o</sup> dpi (Figura 4.15A). A dosagem de IFN- $\gamma$  nesta mesma linhagem apresentou uma cinética semelhante à apresentada pelo TNF- $\alpha$ . Porém, o aumento significativo do IFN- $\gamma$  em camundongos infectados só foi observado mais tardiamente, a partir do 14<sup>o</sup> dpi, onde a dosagem desta citocina alcançou 397pg/mL (Figura 4.15C). Os animais BALB/c apresentaram níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dpi. O monitoramento destas citocinas apontou para um aumento de suas concentrações entre o 7<sup>o</sup> e o 14<sup>o</sup> dia, alcançando níveis mais elevados neste momento, com valores de 31pg/mL e 496pg/mL respectivamente. Após alcançarem os níveis mais elevados da cinética, as concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  apresentaram sucessivas reduções, atingindo valores semelhantes aos observados nos camundongos controles não infectados, aos 40 dpi (Figura 4.15B e D).

A dosagem de IL-6 nos camundongos A mostrou uma elevação desta citocina desde o 7<sup>o</sup> dpi, no qual foi observada a maior concentração desta citocina, 20,31pg/mL, que ainda se mostrou elevada no 14<sup>o</sup> dpi, apesar de ter seu nível reduzido em relação ao 7<sup>o</sup> dpi. Uma redução na concentração de IL6 foi observada no 21<sup>o</sup> dpi, que se manteve aos 40 dpi (Figura 4.15E). Na linhagem BALB/c altos níveis de IL-6 foram detectados nos dias 7, 14 e 21 dpi, com um pico mais elevado aos 14 dpi, atingindo 22,2pg/mL e queda destes níveis aos 40 dpi (Figura 4.15F).



**Figura 4.15** – Dosagem de citocinas no soro dos camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005.

n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ .

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

#### **4.2.5 Histopatologia**

As análises histopatológicas dos tecidos de camundongos dos diferentes grupos foram realizadas no 7º, 14º, 21º e 40º dias após a infecção. Foram avaliadas alterações da morfologia tecidual, presença de infiltrados inflamatórios, presença de ninhos de parasitos, além de alterações no colágeno, no sistema digestório, no coração e no fígado.

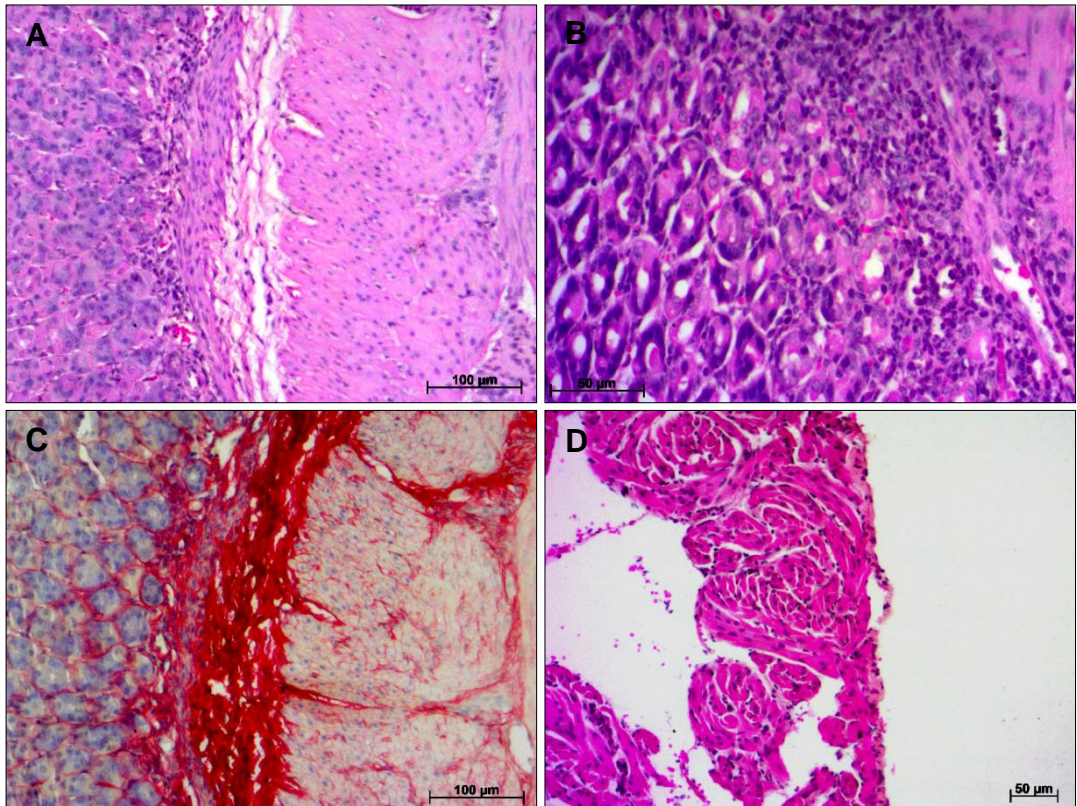
##### **4.2.5.1 Análise histológica dos órgãos dos animais controle não infectados**

A avaliação histológica dos órgãos dos animais dos grupos controles não infectados das linhagens A e BALB/c mostrou o aspecto normal dos tecidos, nos quais alterações morfológicas não foram observadas.

##### **4.2.5.2 Análise histopatológica os órgãos dos camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica (IG) com formas tripomastigotas metacíclicas de *T.cruzi*.**

Aos sete dias após a infecção foram observados pequenos focos de infiltrados inflamatórios difusos no estômago e no coração. Na camada mucosa e submucosa da região glandular do estômago foi observada a presença de numerosos linfócitos, além de eosinófilos e neutrófilos. Nas camadas musculares deste órgão foi notado o intumescimento das fibras musculares com pequenos focos de infiltrado inflamatório linfomonocitário (Figura 4.16A e B). A coloração de Picrosirius Red mostrou a associação dos infiltrados inflamatórios com a distribuição do colágeno, indicando uma reorganização destas fibras no tecido (Figura 4.16C). O coração apresentou infiltrados leves (+) compostos essencialmente por linfócitos localizados no átrio (Figura 4.16D).



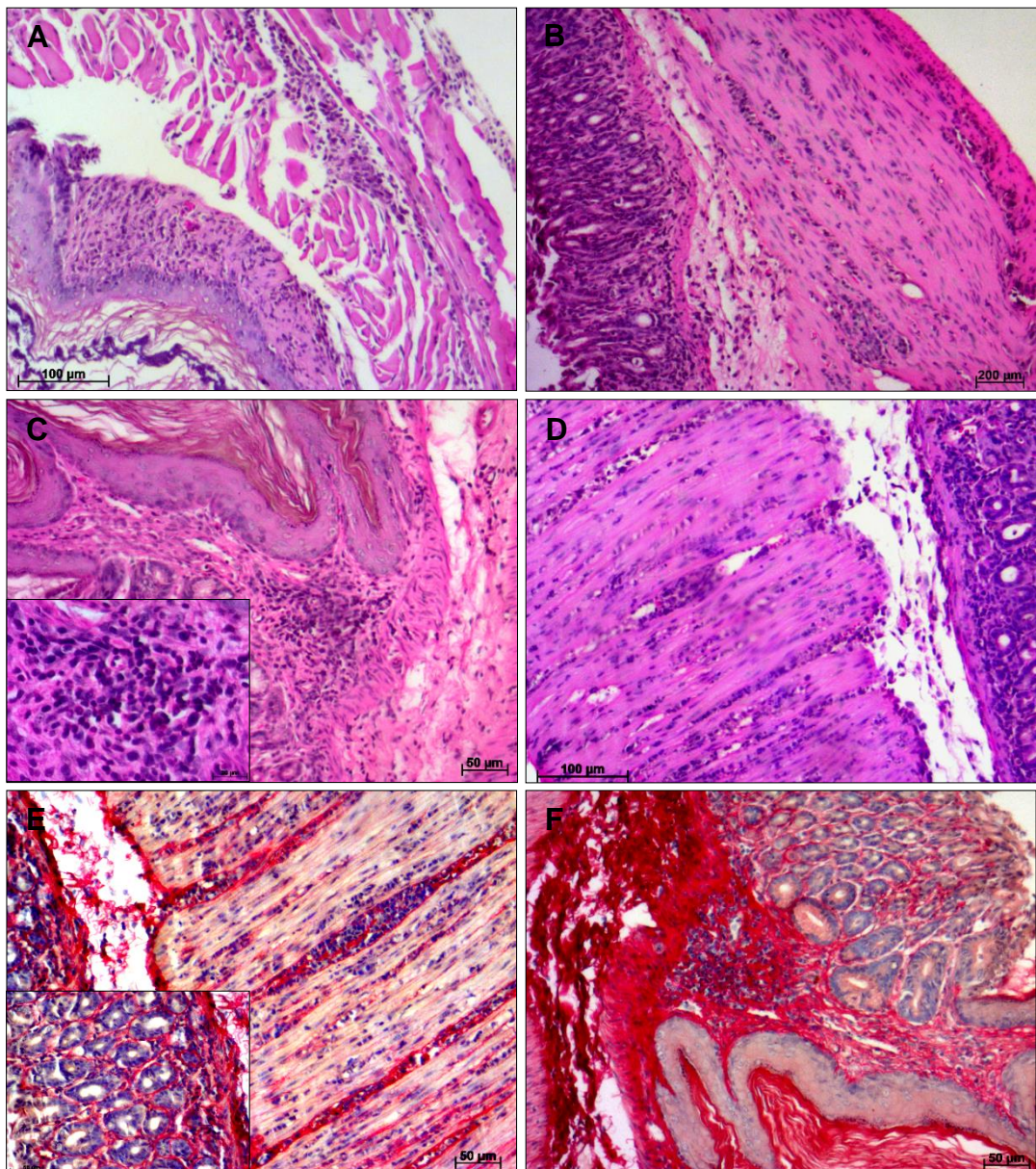


**Figura 4.16** - Histopatologia do estômago e coração de camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 7 dpi. (A, B e C) - Estômago. (A) infiltrados inflamatórios (HE); (B) Infiltrado inflamatório difuso na mucosa e submucosa (HE); (C) Associação dos infiltrados inflamatórios com a distribuição do colágeno (Picrosirius Red); (D) Coração, região atrial, com infiltrado inflamatório leve (HE).

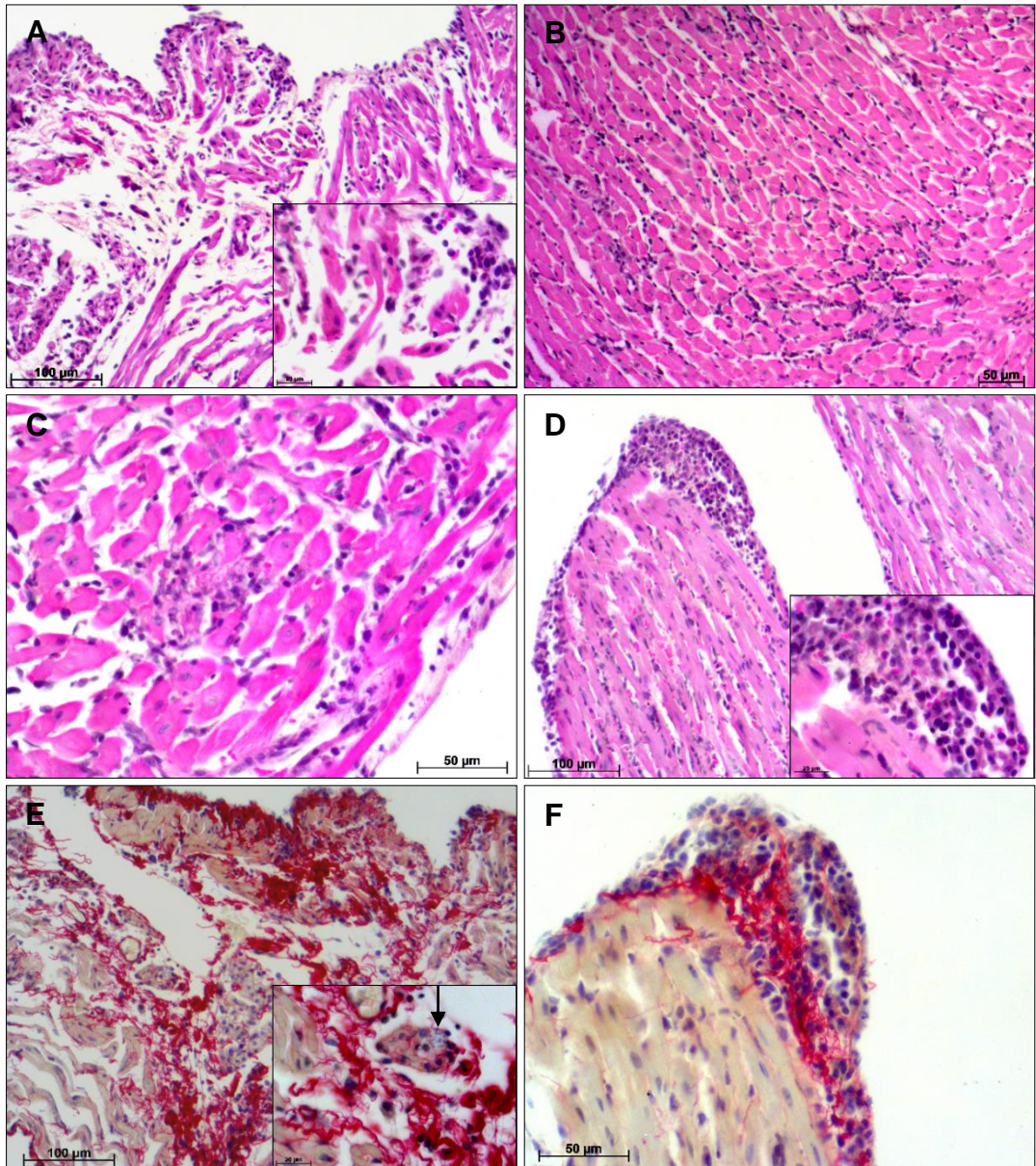
Aos 14 dias de infecção foram observados infiltrados inflamatórios de diferentes intensidades e distribuição no esôfago, estômago, coração e fígado dos animais infectados. A presença de células inflamatórias esparsas foi observada nas camadas musculares do esôfago (Figura 4.17A). O estômago apresentou uma grande circulação de células inflamatórias, com infiltrados inflamatórios difusos e intensos (+++) que se estenderam da camada mucosa à muscular (Figura 4.17B). Na mucosa e submucosa da região glandular, o infiltrado era composto essencialmente por linfócitos. Infiltrados inflamatórios foram frequentemente observados no local de transição entre as regiões glandular e aglandular na camada submucosa, sendo compostos por linfócitos, macrófagos e plasmócitos (Figura 4.17C). Nas camadas musculares deste órgão, o infiltrado encontrava-se entre as fibras musculares, causando o divulsionamento das mesmas. A distribuição das células inflamatórias, nesta região, estava associada ao tecido conjuntivo que reveste as fibras musculares (Figura 4.17D). Neste momento da infecção, também pode ser constatada a co-localização entre fibras de colágeno e células inflamatórias (Figura 4.17E e F).

No coração, o átrio se apresentou muito mais inflamado que o ventrículo, com divulsionamento das fibras musculares (Figura 4.18A), além de um discreto aumento no número de células inflamatórias, quando comparado ao observado no 7º dpi. Contudo, os infiltrados, compostos por linfócitos, macrófagos e alguns plasmócitos, eram localizados, principalmente, no pericárdio e endocárdio (Figura 4.18B - D). Em ambas as regiões, átrio e ventrículo, foi observada a redistribuição de fibras de colágeno, a qual estava associada à presença de infiltrados inflamatórios e poucos ninhos de *T. cruzi* (Figura 4.18E e F).

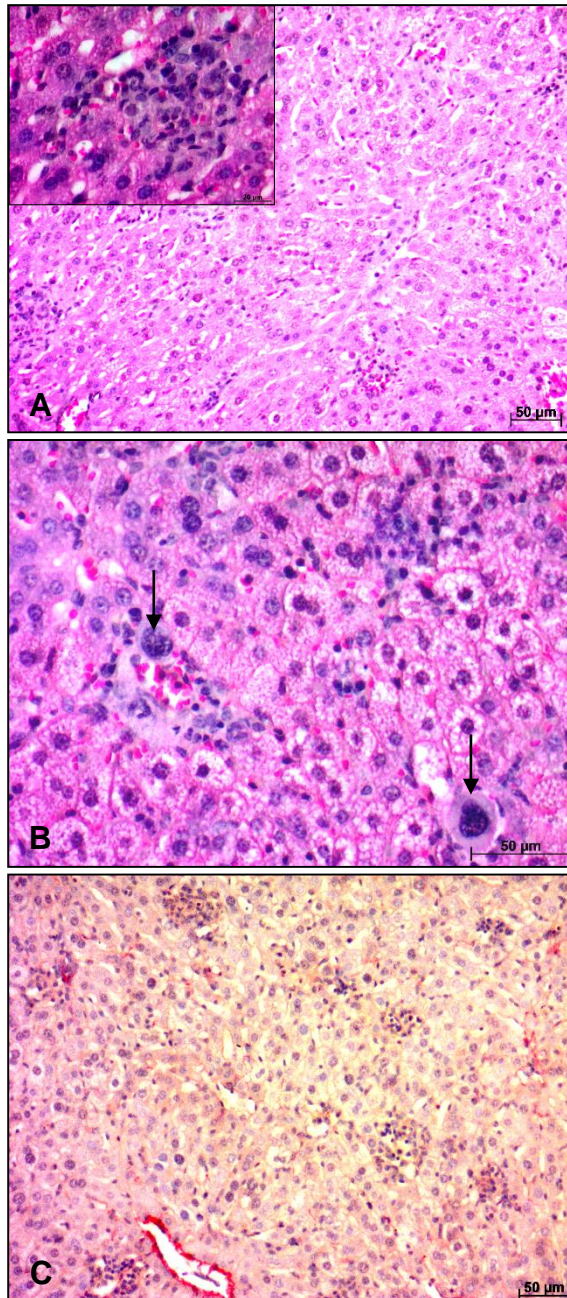
A partir do 14º dpi o fígado dos animais infectados apresentou pequenos focos de células inflamatórias, essencialmente linfócitos e macrófagos, além da presença de megacariócitos e precursores eritróides (Figura 4.19A e B). A distribuição de colágeno se mostrou pouco alterada neste órgão (Figura 4.19C).



**Figura 4.17** - Histopatologia do esôfago e estômago de camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 14 dpi. (A) Esôfago com infiltrados inflamatórios (HE); (B, C D e E) – Estômago. (B) Infiltrado inflamatório difuso (HE); (C) Infiltrado inflamatório no local de transição entre as regiões glandular e aglandular (HE); (D) Células inflamatórias associadas ao tecido conjuntivo denso (HE); (E, F) Associação dos infiltrados inflamatórios com a distribuição do colágeno (Picrosirius Red).



**Figura 4.18** - Histopatologia do coração de camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 14 dpi. (A) Átrio com infiltrados inflamatórios (HE); (B) Ventrículo com infiltrado inflamatório difuso (HE); (C) Ventrículo com infiltrado inflamatório próximo ao pericárdio (HE); (D) Ventrículo com infiltrado no endocárdio (HE); (E) átrio com infiltrados inflamatórios associados à distribuição do colágeno presença de ninhos do parasito (seta) (Picrosirius Red); (F) Ventrículo com infiltrados inflamatórios associados à distribuição do colágeno (Picrosirius Red).



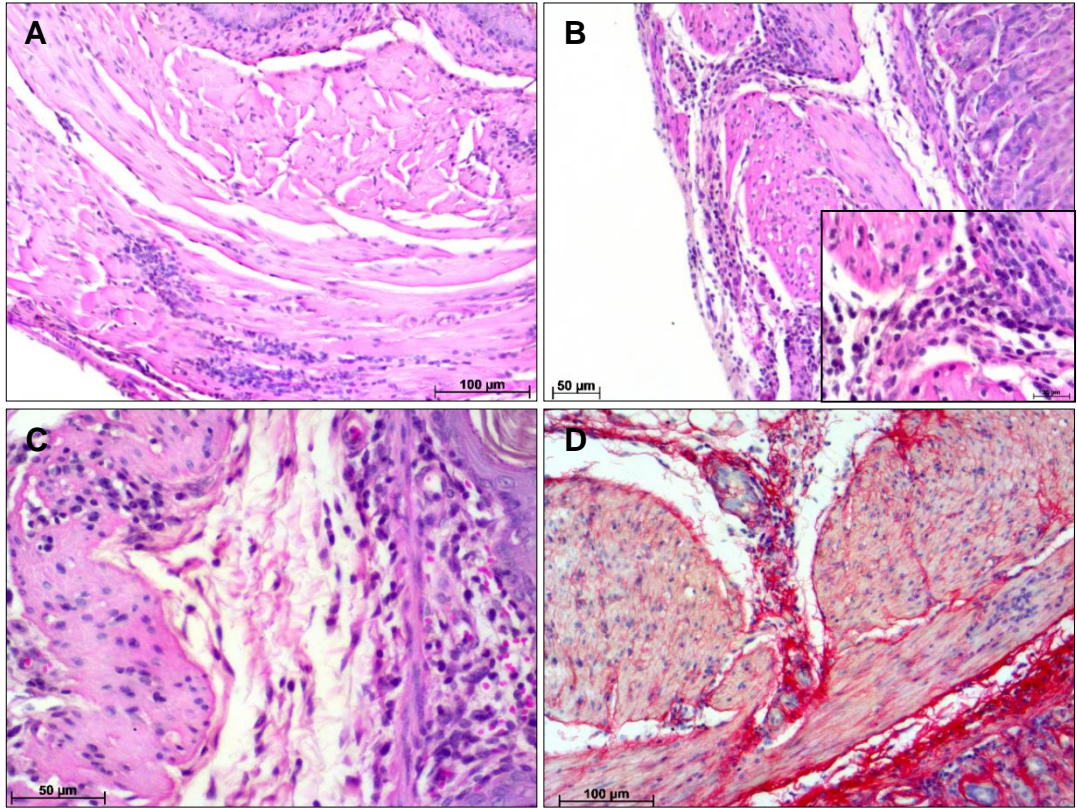
**Figura 4.19** - Histopatologia do fígado de camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 14 dpi. (A) Infiltrados inflamatórios focais (HE); (B) Linfócitos, macrófagos e megacariócitos (seta) (HE); (C) Associação dos infiltrados inflamatórios com o colágeno (Picrosirius Red).

Aos 21 dpi a intensidade dos infiltrados inflamatórios foi maior. Nas camadas musculares do esôfago foram observados infiltrados inflamatórios difusos de moderada intensidade (++) (Figura 4.20A). No estômago, as mesmas regiões afetadas aos 14 dpi, também sofreram alterações aos 21 dias, porém, as lesões teciduais entre as fibras musculares foram maiores tanto na região glandular quanto na aglandular (Figura 4.20B e C). Nas camadas musculares foram observadas pelo Picrosirius Red alterações na quantidade e na distribuição das fibras colágenas, as quais estavam associadas aos infiltrados inflamatórios (Figura 4.20D).

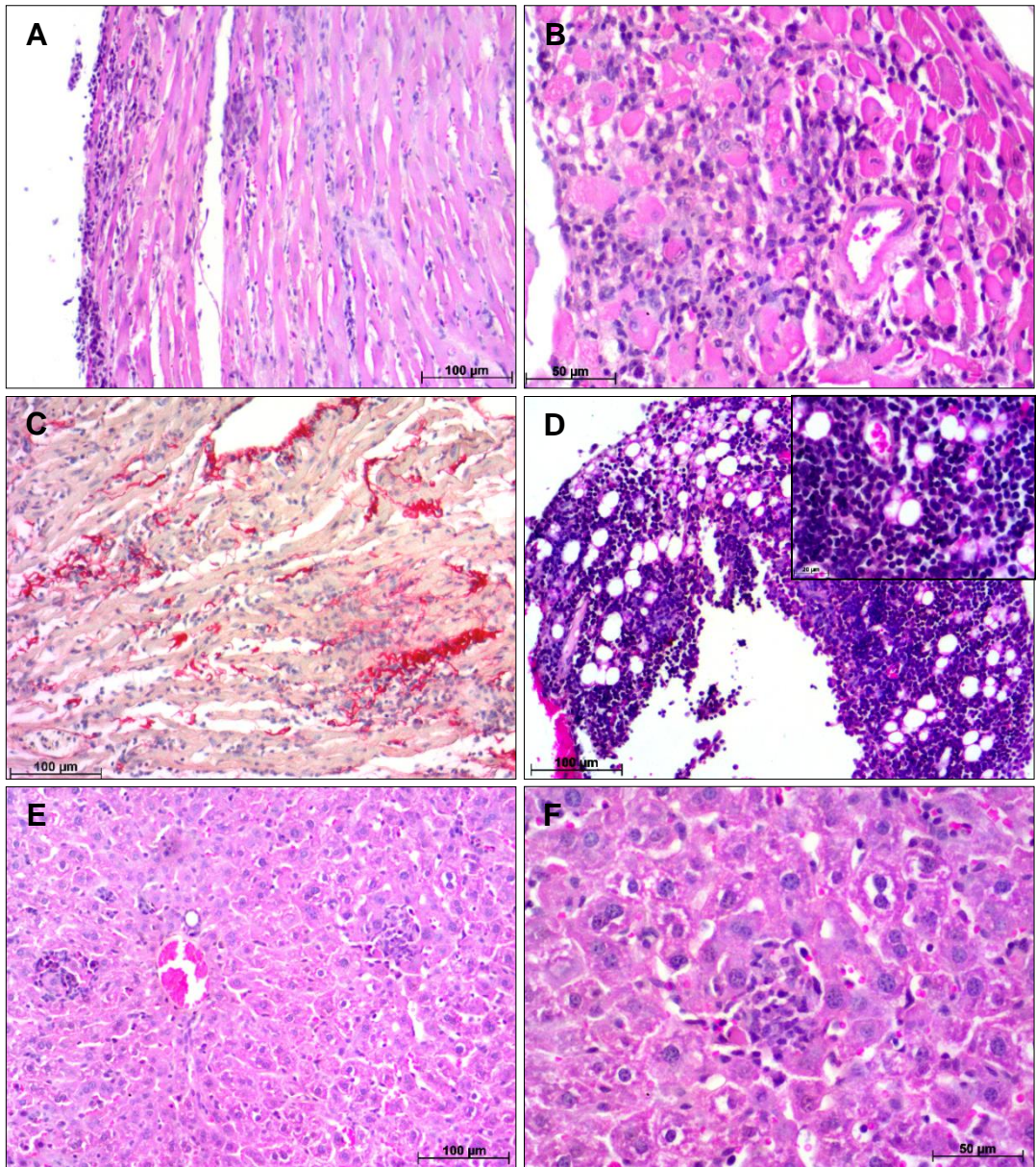
Neste momento da infecção o coração apresentou infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos maiores, com nucléolo evidente e plasmócitos, divulsionando fibras musculares. O átrio ainda se apresentou mais acometido que o ventrículo, sendo o pericárdio e endocárdio as regiões mais inflamadas (Figura 4.21A). Apesar do número de células inflamatórias ser menor no ventrículo, somente nesta região foram observados ninhos de parasitos, os quais estavam associados a um infiltrado inflamatório linfomonocitário, disposto ao longo da fibra muscular (Figura 4.21B). A coloração por Picrosirius Red revelou um possível aumento na quantidade e uma redistribuição de colágeno, presentes principalmente nas regiões inflamadas (Figura 4.21C). Notou-se ainda a presença de “milky spot” ativado, próximo ao órgão (Figura 4.21D).

O exame do fígado, aos 21 dias de infecção, mostrou infiltrado inflamatório heterogêneo e focal leve (+) com a presença de células eritróides. Observou-se também a presença de mitose e megacariócitos circulantes. A análise da coloração por Picrosirius Red indicou a ocorrência de biogênese e redistribuição das fibras de colágeno (Figura 4.21E e F).

No momento final do estudo, aos 40 dpi, ocorreu uma redução da inflamação no esôfago e estômago, embora os padrões de localização e distribuição tenham se mantido (Figura 4.22A e B). No coração, foi observada lesão tecidual acompanhada de uma grande circulação de linfócitos e plasmócitos, principalmente no átrio, pericárdio e endocárdio (Figura 4.22C e D). Intenso infiltrado linfomonocitário foi observado no tecido adiposo próximo a região do átrio (Figura 4.22E). O fígado apresentou as mesmas alterações observadas aos 21 dias de infecção (Figura 4.22F).

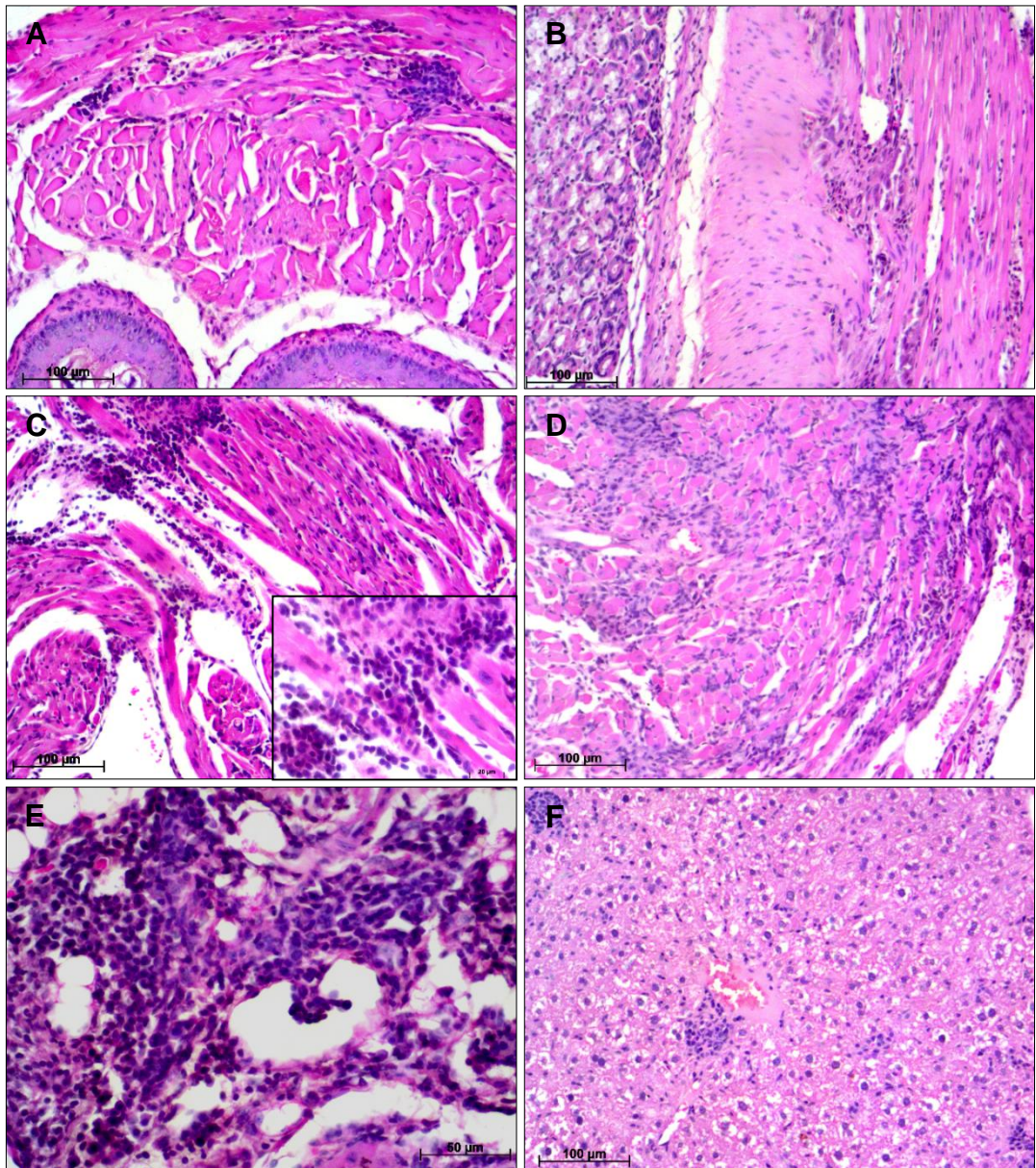


**Figura 4.20** - Histopatologia do esôfago e estômago de camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 21 dpi. (A) Esôfago com infiltrados inflamatórios difuso moderado (HE); (B, C, D) - Estômago. (B) infiltrado inflamatório difuso na região glandular (HE); (C) Infiltrado inflamatório na submucosa e camadas musculares da região aglandular (HE); (D) Associação dos infiltrados inflamatórios com a distribuição do colágeno (Picrosirius Red).



**Figura 4.21** - Histopatologia do coração, tecido adiposo adjacente e fígado de camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 21 dpi. (A, B, C e D) Coração. (A) Endocárdio com infiltrado inflamatório difuso (HE); (B) Região do ventrículo, próxima ao átrio, com infiltrado e ninho de parasito (HE); (C) Associação dos infiltrados inflamatórios com a distribuição do colágeno (Picrosirius Red); (D) Tecido adiposo com “Milky-spot” ativado próximo ao coração (HE); (E) Fígado com infiltrados inflamatórios focais, detalhe em F (HE).





**Figura 4.22** - Histopatologia do esôfago, estômago, coração, tecido adiposo adjacente e fígado de camundongos da linhagem A infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 40 dpi. (A) Esôfago com infiltrados inflamatórios (HE); (B) Estômago com infiltrado inflamatório difuso na região glandular (HE); (C e D) Coração. (C) Átrio com infiltrado inflamatório difuso moderado (HE); (D) Ventrículo com infiltrado inflamatório difuso moderado (HE); (E) Tecido adiposo próximo ao átrio com grande presença de células inflamatórias (HE); (F) Fígado com infiltrados inflamatórios focais (HE).

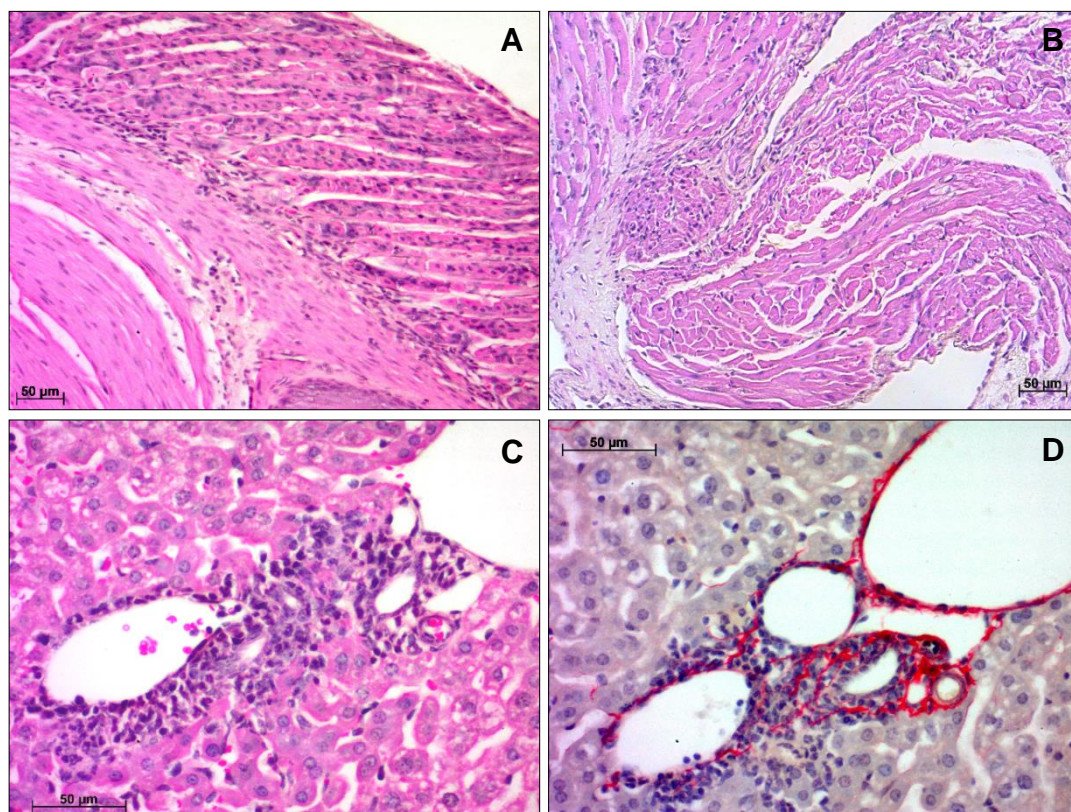
#### **4.2.5.3 Análise histopatológica dos órgãos dos camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragástrica (IG) com formas tripomastigotas metacíclicas de *T.cruzi*.**

Ao contrário do observado nos camundongos infectados da linhagem A, os animais da linhagem BALB/c não apresentaram nenhuma alteração histopatológica no esôfago, em nenhum momento da infecção.

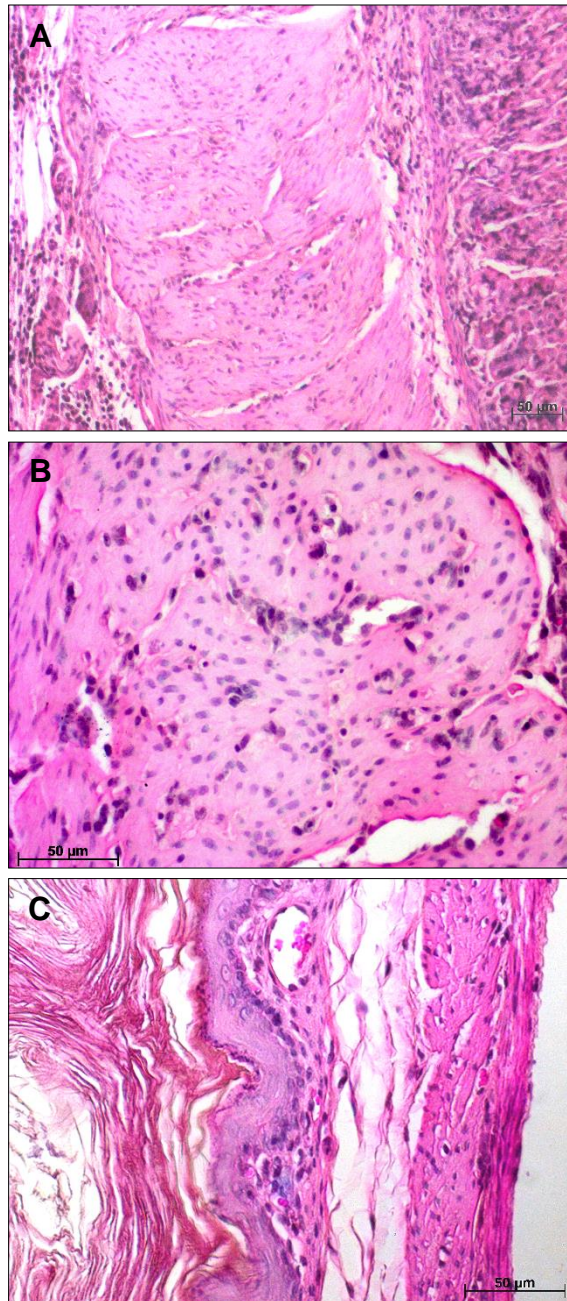
Aos sete dias de infecção, o estômago apresentou infiltrado inflamatório heterogêneo e focal leve (+) na camada mucosa, principalmente na região da lâmina própria (Figura 4.23A). Pouca alteração do colágeno foi notada neste período. O coração apresentou infiltrado inflamatório leve (+) e difuso, principalmente no átrio (Figura 4.23B). O fígado também apresentou infiltrado inflamatório focal e leve (+), próximo aos vasos, com rearranjo de colágeno ocasionado pelo extravasamento celular em direção ao tecido (Figura 4.23C e D).

Com a evolução da infecção foi observado um aumento da intensidade e da extensão dos infiltrados inflamatórios nos diferentes órgãos analisados. Aos 14 dpi foram observados infiltrados inflamatórios tanto na lâmina própria da região glandular e aglandular, como na camada serosa, ocasionando o divulsionamento de fibras e edema (Figura 4.24A - C). Pouca reestruturação do colágeno foi evidenciada neste momento do experimento,

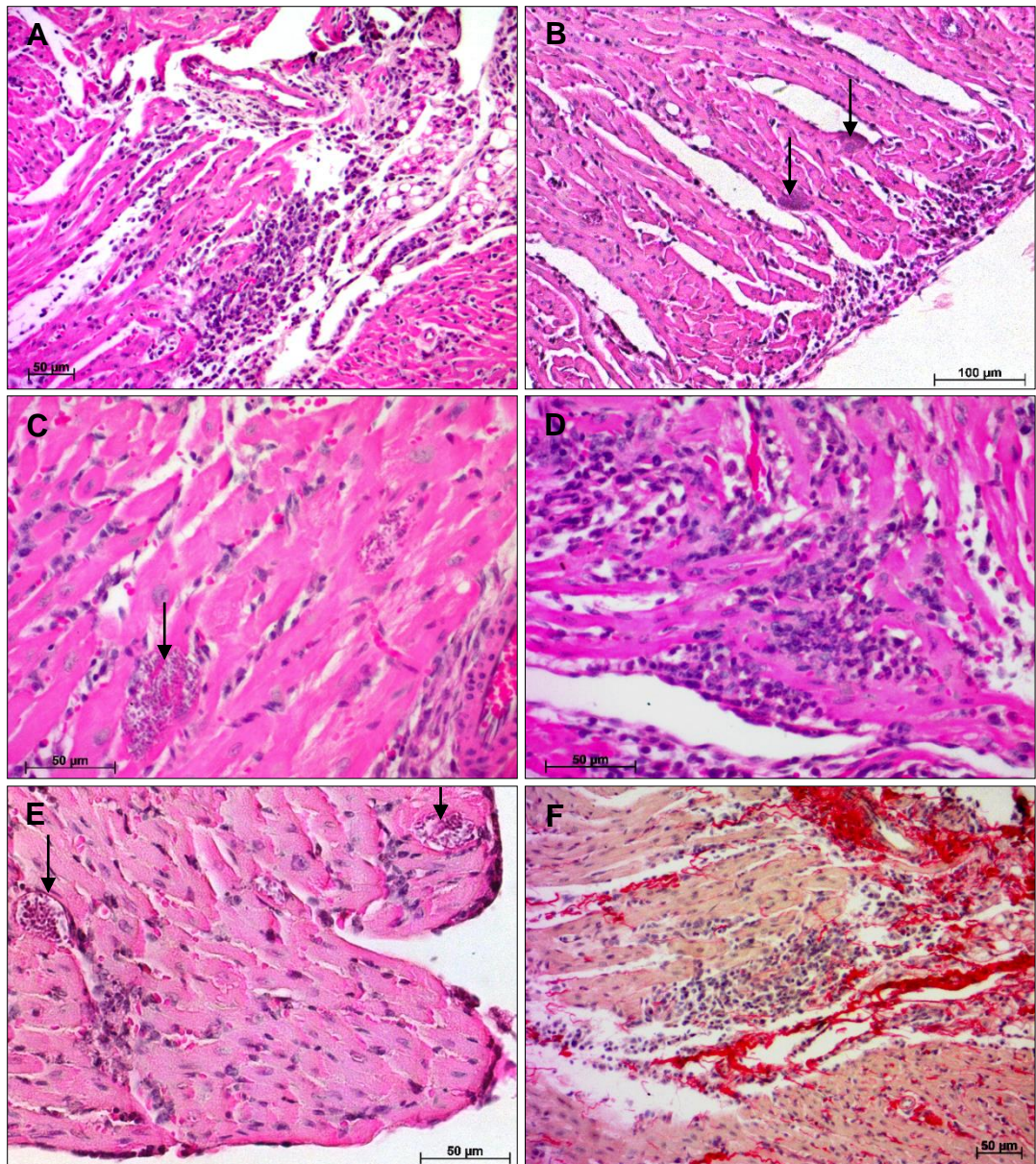
No coração, aos 14 dpi, foi observado moderado infiltrado inflamatório (++) , sendo o átrio a região mais acometida (Figura 4.25A). No ventrículo, pericardite intensa foi notada, além de células de natureza predominantemente linfoide, as quais estavam presentes no endocárdio e pequenos infiltrados localizados no miocárdio. Núcleos apoptóticos e inúmeros ninhos de parasitos puderam ser visualizados, também associados a granulócitos (Figura 4.25B – E). Aparente collagenogênese e redistribuição de fibras do sistema colágeno foram observadas entre as fibras musculares, e estavam associadas ao infiltrado inflamatório (Figura 4.25F).



**Figura 4.23** - Histopatologia do estômago, coração e fígado de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragastrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 7 dpi. (A) Estômago com infiltrados inflamatórios (HE); (B) Coração com infiltrado inflamatório difuso no átrio (HE); (C e D) Fígado. (C) Infiltrado inflamatório ao redor dos vasos (HE); (D) Associação dos infiltrados inflamatórios com a distribuição do colágeno (Picosirius Red).



**Figura 4.24** - Histopatologia do estômago de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 14 dpi. (A) Infiltrados inflamatórios da camada mucosa até a serosa (HE); (B) Infiltrados inflamatórios com divulsionamento de fibras e edema na camada glandular (HE); (C) Infiltrado inflamatório na lâmina própria da camada glandular (HE).



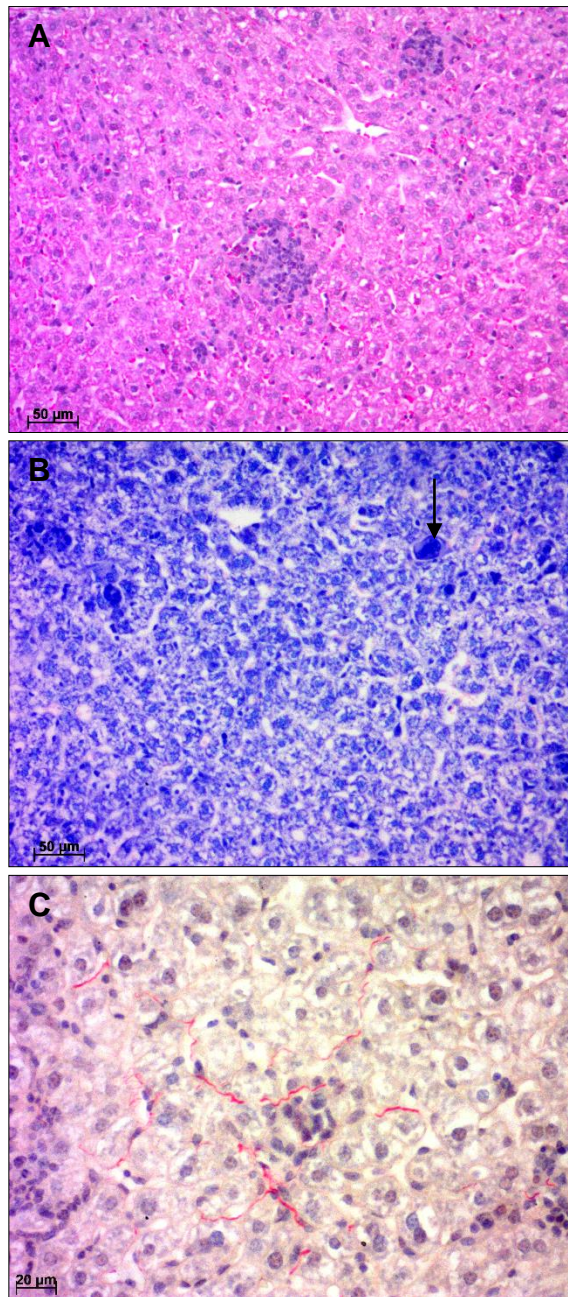
**Figura 4.25** - Histopatologia do coração de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 14 dpi. (A) Átrio com infiltrado inflamatório difuso (HE); (B) Pericárdio com infiltrado e ninho de parasitos (setas) (HE); (C) Ninho de *T. cruzi* (seta) em ventrículo (HE); (D) Células inflamatórias em ventrículo (HE); (E) Endocárdio com infiltrados inflamatórios e ninhos (setas) (HE); (F) Associação dos infiltrados inflamatórios com a distribuição do colágeno (Picrosirius Red).

Neste mesmo tempo de infecção, o fígado destes animais apresentou infiltrados inflamatórios, essencialmente mononucleares, leves (+) e focais distribuídos regularmente por todo o órgão (Figura 4.26A). Foram observados granulócitos, plasmócitos e megacariócitos circulando no tecido (Figura 4.26B). Além disso, foram observados pequenos focos de reorganização de colágeno no parênquima do órgão e próximo aos vasos hepáticos, com extravasamento celular em direção ao tecido (Figura 4.26C).

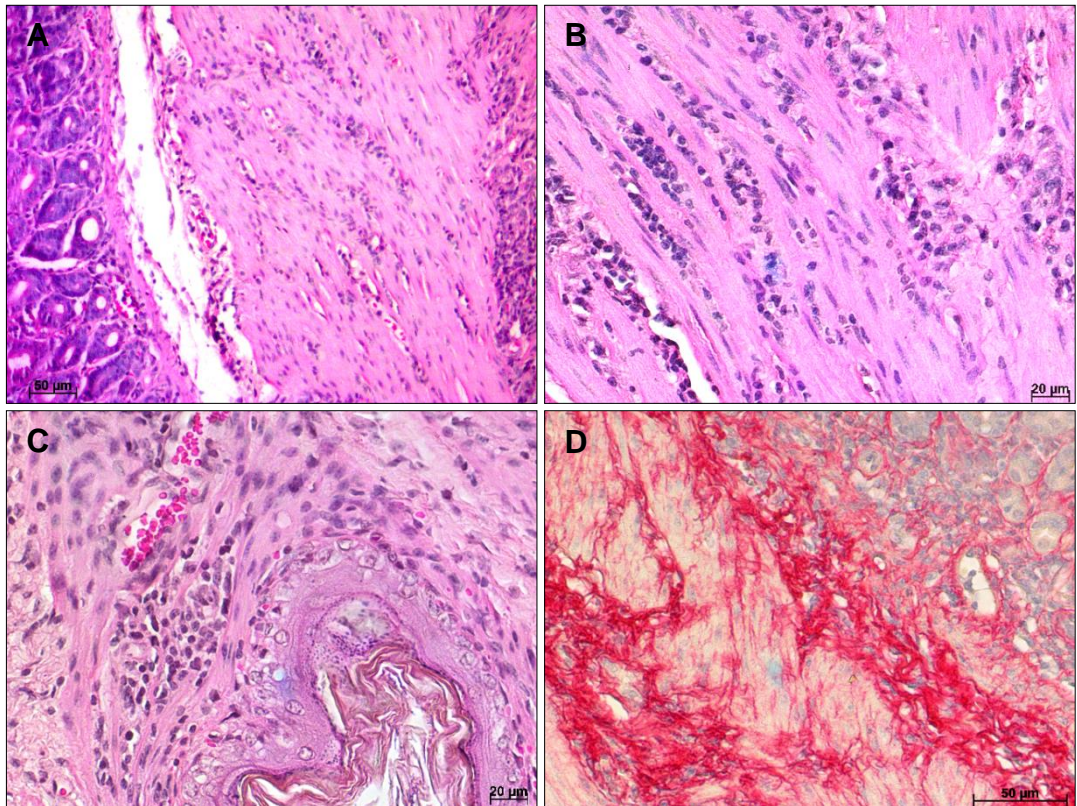
Aos 21 dpi o estômago apresentou um maior acometimento tecidual, com infiltrados inflamatórios intensos (+++) e difusos, principalmente localizados na área de transição entre as regiões glandular e aglandular. Foi notada a presença de edema, fibrose e o divulsionamento de fibras das camadas musculares, causada pela presença de infiltrados inflamatórios mononucleares, com linfócitos pequenos e células linfoblastóides (Figura 4.27A – C). Além disso, uma alteração na distribuição, organização e sugestivo aumento de fibras do sistema colágeno foi observado nas camadas muscular e lâmina própria deste órgão, estando associadas a presença de células inflamatórias (Figura 4.27D).

O coração aos 21 dpi, assim como o estômago, apresentou alterações mais severas. Infiltrados mononucleares, com linfócitos ativados e células linfoblastóides, plasmócitos e pontos apoptóticos foram observados no átrio e ventrículo, levando a uma lesão de fibras musculares com necrose, além de edema. Ninhos de parasitos também foram visualizados neste momento da infecção, associados ou não aos ambientes inflamatórios (Figura 4.28A – C). Reorganização e redistribuição de fibras colágenas foram observadas pela coloração por Picrosirius Red nos mesmos locais onde estavam presentes infiltrados inflamatórios (Figura 4.28D).

Neste momento da infecção o fígado apresentou infiltrados inflamatórios semelhantes aos observados no 14º dpi, porém menos intensos. A presença de megacariócitos também foi observada aos 21 dpi (Figura 4.28E e F).

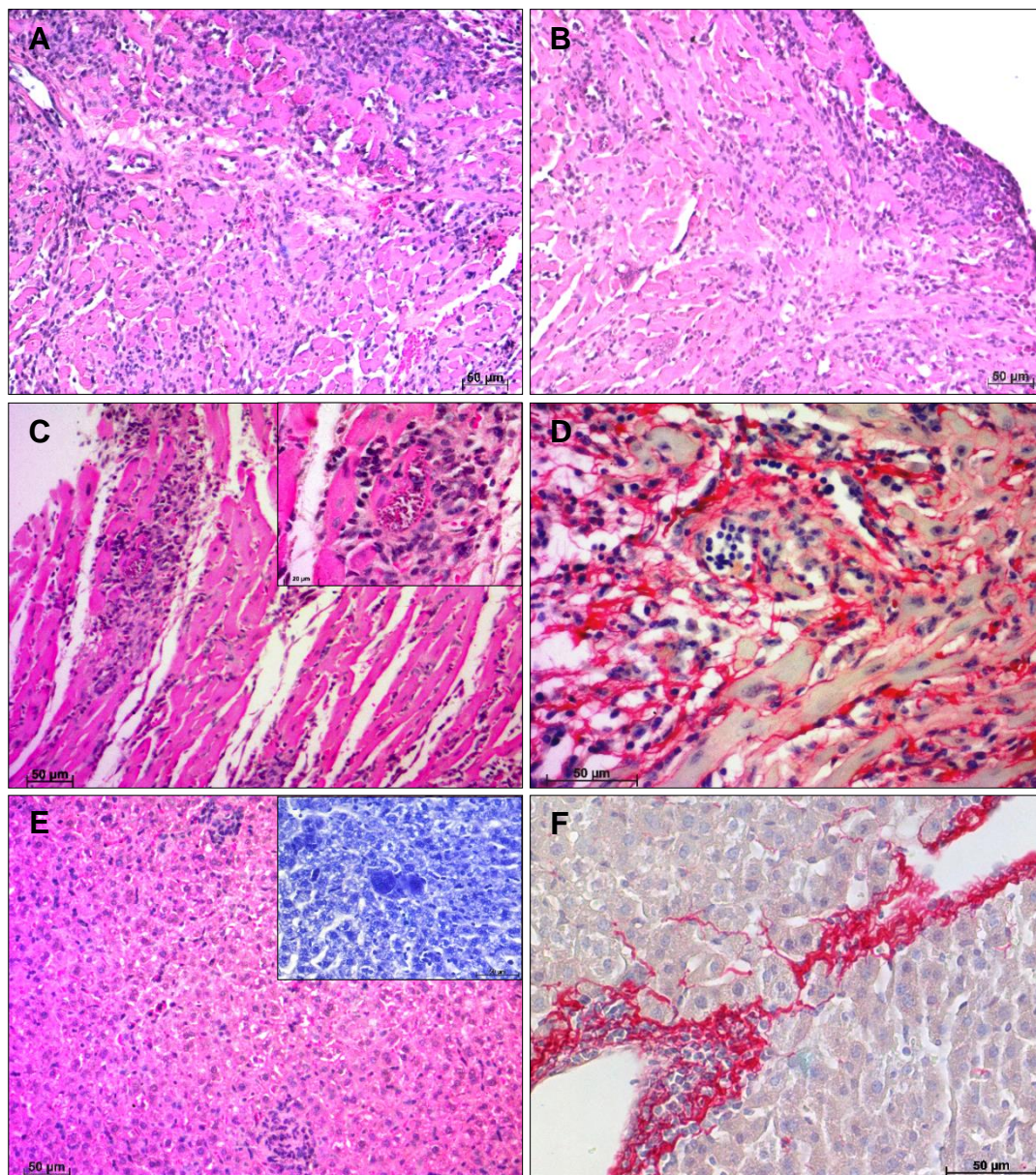


**Figura 4.26** - Histopatologia do fígado de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 14 dpi. (A) Infiltrados inflamatórios focais (HE); (B) Infiltrados inflamatórios com megacariócitos (seta) (Giemsa); (C) Reorganização de colágeno associado ao infiltrado inflamatório (Picrosirius Red).



**Figura 4.27** - Histopatologia do estômago de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 21 dpi. (A) Infiltrados inflamatórios (HE); (B) Camadas musculares com divulsionamento de fibras (HE); (C) Região aglandular com infiltrado inflamatório difuso (HE); (D) Associação dos infiltrados inflamatórios com produção e redistribuição do colágeno (Picrosirius Red).

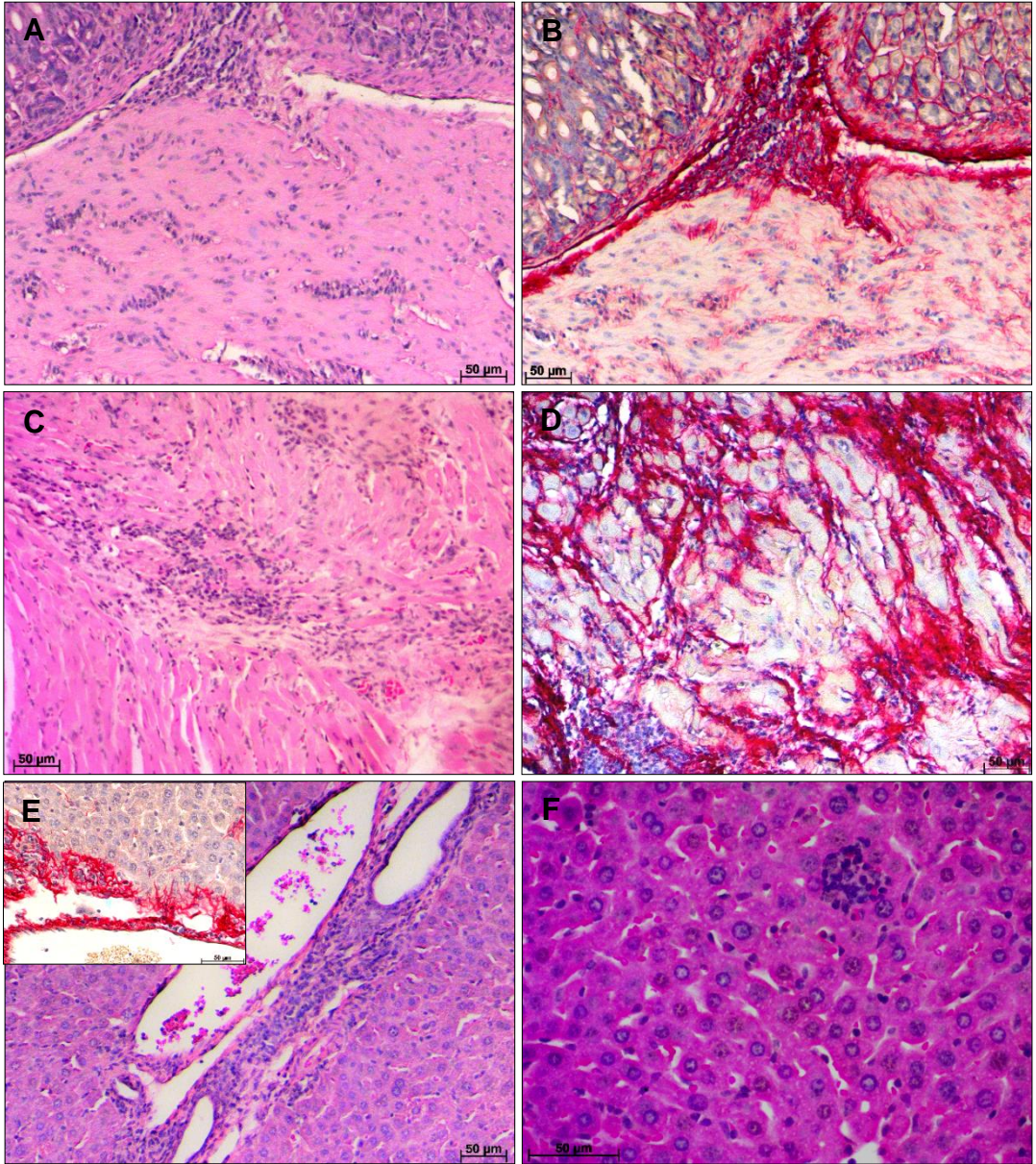




**Figura 4.28** - Histopatologia do coração e fígado de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 21 dpi. (A, B, C e D) Coração. (A) Átrio com intensos infiltrados inflamatórios difusos (HE); (B) Ventrículo com infiltrado inflamatório difuso e ninhos de parasito (HE); (C) Ventrículo com infiltrado inflamatório associado ao ninho de parasito (HE); (D) Associação dos infiltrados inflamatórios com a distribuição do colágeno (Picrosirius Red); (E e F) Fígado. (E) Infiltrados inflamatórios focais com megacariócitos circulantes (HE; Giemsa); (F) Reorganização de colágeno próximo aos vasos hepáticos e associado ao extravasamento celular (Picrosirius Red).

Com o decorrer da infecção, as alterações histopatológicas observadas foram menos intensas. Ninhos de parasitos não foram mais observados em nenhum dos órgãos estudados e os infiltrados inflamatórios observados nos diferentes órgãos, foram mais brandos apesar de atingirem as mesmas regiões já descritas anteriormente. Aos 40 dpi o estômago apresentou um espessamento da lâmina própria, além da presença de infiltrados inflamatórios nas camadas musculares das regiões glandular e aglandular do órgão (Figura 4.29A e B). No coração, um infiltrado linfoblastóide difuso, de média intensidade, foi identificado. Um maior acometimento do átrio, com elevado número de células inflamatórias, edema e destruição de fibras, em relação ao ventrículo, também pode ser observado neste momento da infecção (Figura 4.29C e D). O fígado apresentou infiltrado inflamatório focal no parênquima do órgão e ao redor dos vasos hepáticos, com alteração na distribuição do colágeno (Figura 4.29E e F).

**Figura 4.29** - Histopatologia do estômago, coração e fígado de camundongos da linhagem BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005, aos 40 dpi. (A e B) Estômago. (A) Infiltrados inflamatórios na transição entre a região glandular e aglandular e nas camadas musculares (HE); (B) Alteração na distribuição das fibras de colágeno (Picrosirius Red); (C e D) Coração. (C) Infiltrado inflamatório difuso e moderado na região entre átrio e ventrículo (HE); (D) Ventrículo com infiltrado inflamatório e reorganização do colágeno (Picrosirius Red); (E e F) Fígado. (E) Presença de células inflamatórias ao redor dos vasos hepáticos causando alteração das fibras colágenas (janela); (HE; Picrosirius Red); (F) Infiltrados inflamatórios focais (HE).



## **4.2.6 Citometria de Fluxo**

### **4.2.6.1 Coração**

A população de linfócitos T CD3<sup>+</sup> no coração se mostrou pouco alterada entre os camundongos infectados e os controles não infectados. Um pequeno aumento, desta população pode ser observado, aos 7 dpi, nos animais da linhagem A infectados (Figura 4.30A e B).

A subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> se manteve estável durante todo o estudo, não apresentando alteração em nenhum momento da infecção nos camundongos da linhagem A e BALB/c (Figura 4.30C e D).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentaram um grande aumento em sua população em ambas as linhagens de camundongos infectados. Na linhagem A, um aumento no número desta subpopulação de linfócitos foi observado a partir do 14<sup>o</sup> dpi até os 40<sup>o</sup> dpi, alcançando um número de células oito vezes maior, em relação aos controles não infectados, no 21<sup>o</sup> dpi (Figura 4.30E). Na linhagem BALB/c, o aumento no número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi notado no 21<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup> dpi, chegando a representar 36% da população de linfócitos totais no 21<sup>o</sup> dpi (Figura 4.30F).

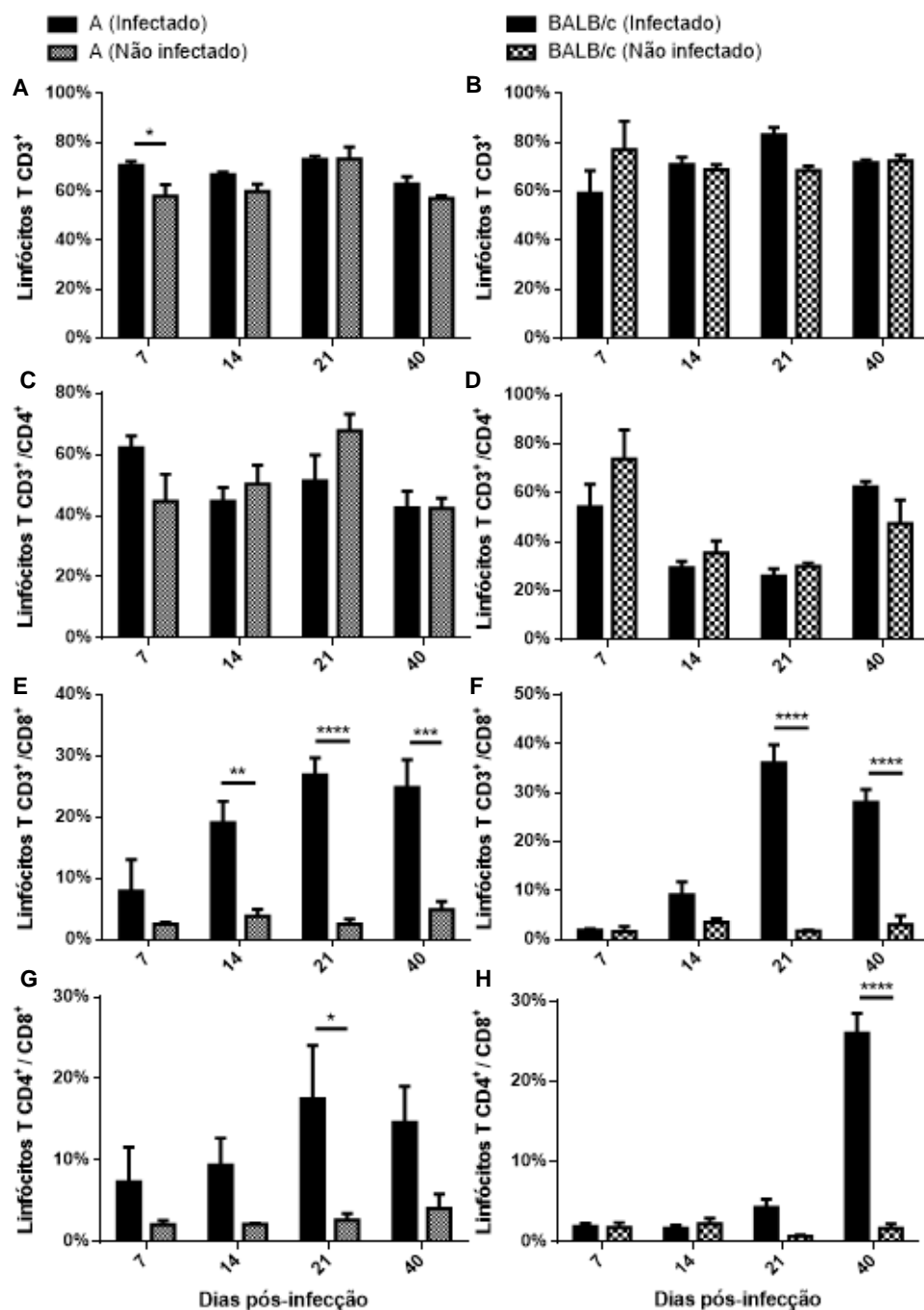
Apesar de se observar elevação do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos animais infectados de ambas as linhagens, a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi significativamente maior durante quase todo o estudo, embora não tenha se observado diferença significativa quando se comparou o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos animais infectados com o dos animais controles não infectados.

Um aumento na subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/T CD8<sup>+</sup> foi observado em ambas as linhagens de camundongos infectados. Este aumento foi expressivo aos 21 dpi entre os animais da linhagem A, abrangendo 17% da população de linfócitos, e aos 40 dpi entre os da linhagem BALB/c, representando 26% desta população (Figura 4.30G e H).

**Figura 4.30** – Análise da dinâmica de subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup> no coração de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com 10<sup>7</sup> formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005.

n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ .

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

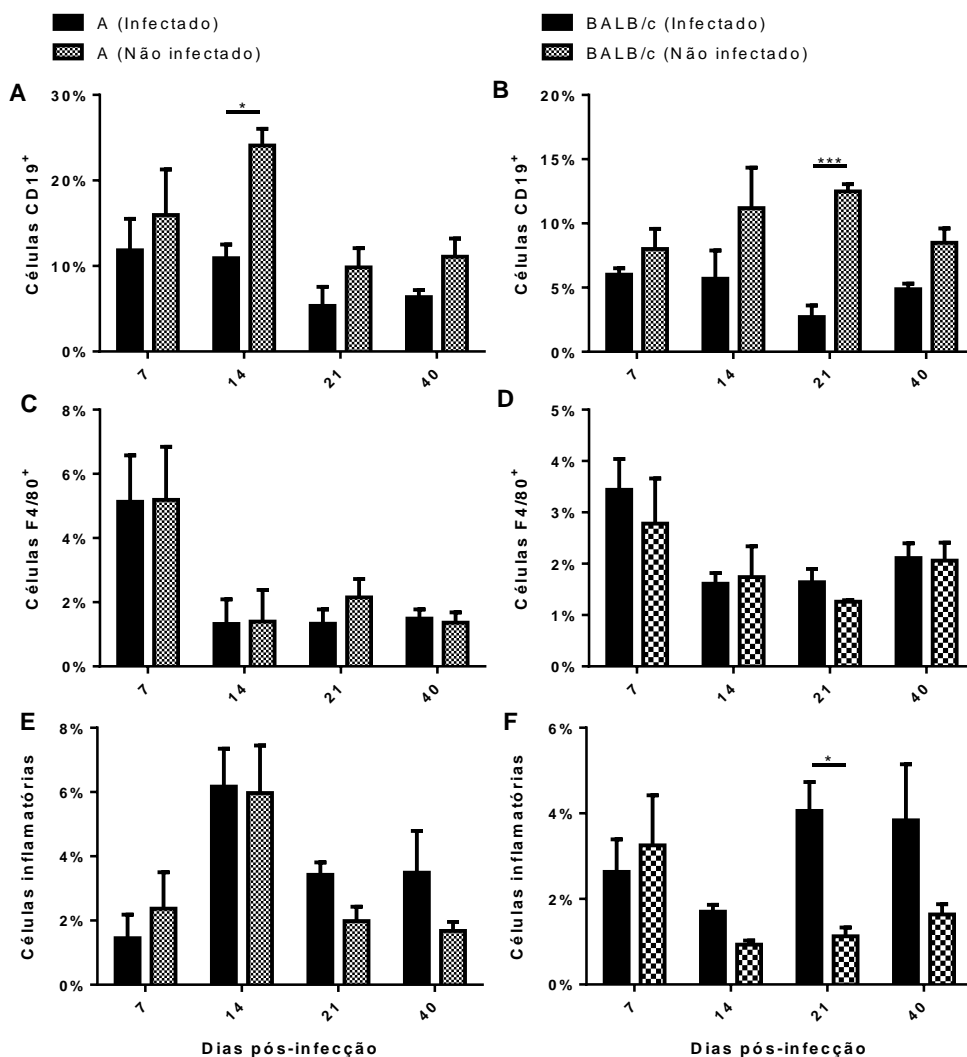


Assim como o perfil semelhante apresentado pelos animais de ambas as linhagens quanto a distribuição de linfócitos T, a quantificação de linfócitos B CD19<sup>+</sup> foi similar entre os animais infectados. Camundongos A infectados apresentaram uma redução do número de linfócitos B CD19<sup>+</sup> quando comparados aos controles não infectados, sendo mais expressiva aos 14 dpi. Neste ponto, a população de linfócitos B CD19<sup>+</sup> estava em torno de 24% nos camundongos controle e próximo a 11% nos infectados (Figura 4.31A). Animais infectados da linhagem BALB/c exibiram uma menor porcentagem de linfócitos B CD19<sup>+</sup> durante todo o estudo. Esta redução, em relação ao grupo controle foi significativa no 21<sup>o</sup> dpi, quando a população de linfócitos B CD19<sup>+</sup> correspondia a menos de 3% nos camundongos infectados e a 13% nos não infectados (Figura 4.31B).

Assim como as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a porcentagem de macrófagos F4/80<sup>+</sup> foi semelhante aos respectivos grupos controles em ambas as linhagens estudadas (Figura 4.31C e D).

Os aumentos observados nas diferentes populações celulares nos grupos de animais infectados corroboram com os resultados que mostraram a elevação da porcentagem de células inflamatórias encontradas no coração destes animais. Na linhagem BALB/c foi observado um aumento de células localizadas na região de linfócitos e macrófagos, a partir do 14<sup>o</sup> dpi, quando comparou-se animais infectados com os controles não infectados. Este aumento foi mais expressivo aos 21 dpi, quando o número destes tipos celulares quase quadruplicou (Figura 4.31E e F).





**Figura 4.31** – Análise da dinâmica de populações de linfócitos B CD19<sup>+</sup>, macrófagos F4/80<sup>+</sup> e células inflamatórias no coração de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com 10<sup>7</sup> formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005.

n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ .

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

#### 4.2.6.2 Fígado

No fígado dos animais estudados o perfil da distribuição das subpopulações T CD3<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> foi semelhante, mostrando uma pequena redução destas células nos camundongos infectados quando comparadas ao grupo controle, no 14<sup>o</sup> dpi (Figura 4.32A – D). Camundongos da linhagem A apresentaram uma redução de linfócitos T CD3<sup>+</sup> mais significativa aos 14 dpi (Figura 4.32A). Linfócitos T CD4<sup>+</sup> corresponderam a uma porcentagem significativamente menor, aos 14 dpi, nos animais infectados da linhagem A (59%) e da linhagem BALB/c (48%) em relação aos seus respectivos controles (Figura 4.32C e D).

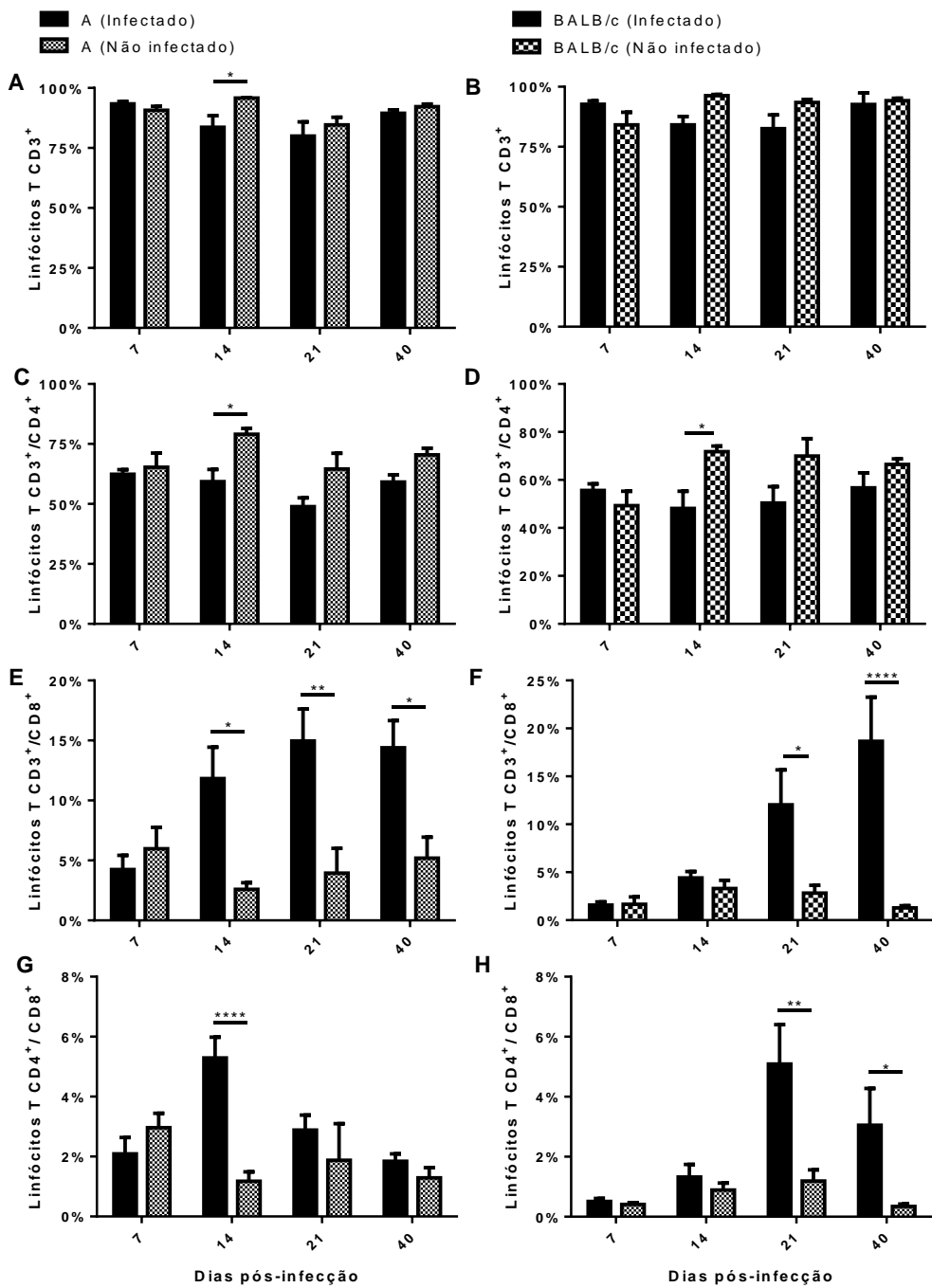
Contrariamente, a subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentou um aumento, a partir do 14<sup>o</sup> dia, nos animais infectados pelo *T. cruzi*. Um aumento expressivo deste tipo celular foi observado no 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup> dpi nos animais infectados da linhagem A, representando entre 11% e 15% da população de linfócitos T CD3<sup>+</sup> (Figura 4.32E). Nos camundongos BALB/c este aumento foi mais significativo nos 21 e 40 dpi, chegando a quase 20% neste último tempo (Figura 4.32F).

A subpopulação de células duplo positivas CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> apresentou um perfil de distribuição semelhante ao dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. O aumento desta subpopulação de linfócitos foi observado em ambas as linhagens de camundongos infectados. Este aumento foi expressivo aos 14 dpi entre os animais da linhagem A, abrangendo 5% da população de linfócitos, e aos 21 e 40 dpi entre os da linhagem BALB/c, representando 5% e 3% desta população, respectivamente (Figura 4.32G e H).

Embora tenha sido observada uma elevação da porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos animais infectados e tenha ocorrido uma diminuição na subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em ambas as linhagens, a porcentagem desta última foi significativamente maior durante todo o estudo.

**Figura 4.32** – Análise da dinâmica de subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup> no fígado de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com 10<sup>7</sup> formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005. n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ .

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .



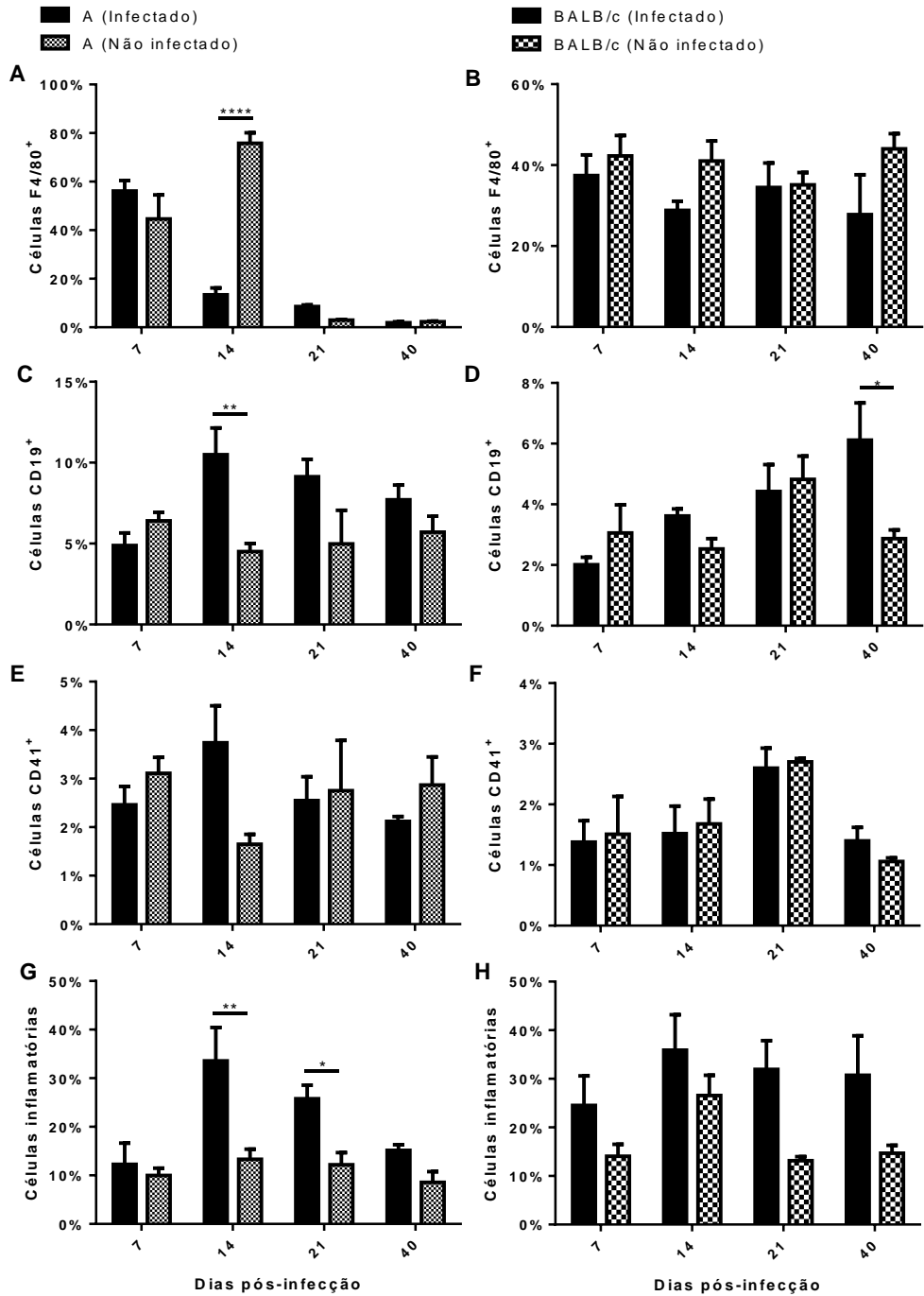
Assim como as populações de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a porcentagem de macrófagos F4/80<sup>+</sup> apresentou uma redução em ambas as linhagens de animais infectados. Sendo discreta nos camundongos BALB/c, em todos os tempos, e significativa aos 14 dpi no grupo de camundongos da linhagem A infectados (Figura 4.33A e B).

A quantificação de linfócitos B CD19<sup>+</sup> demonstrou um aumento desta população celular nas duas linhagens de camundongos submetidas à infecção, a partir do 14<sup>o</sup> dpi. Animais A infectados apresentaram uma elevação do número deste tipo celular entre o 7<sup>o</sup> e o 14<sup>o</sup> dpi, sendo que neste último tempo a porcentagem de linfócitos B CD19<sup>+</sup> foi duas vezes maior que a observada nos controles (Figura 4.33C). Nos camundongos BALB/c infectados ocorreu um aumento de três vezes desta população de linfócitos entre o início (7 dpi) e o final do experimento (40 dpi). Aos 40 dias de infecção foi observado uma porcentagem média de 6% de linfócitos B CD19<sup>+</sup> entre os animais BALB/c infectados, enquanto os camundongos BALB/c não infectados apresentaram uma população em torno de 3%, sendo esta diferença significativa (Figura 4.33D). Pouca variação foi observada na porcentagem de megacariócitos CD41<sup>+</sup> entre os grupos estudados (Figura 4.33E e F).

As flutuações quantitativas observadas nas diferentes populações celulares nos grupos de animais infectados resultaram no aumento total da porcentagem de células inflamatórias encontradas no fígado desses animais. Durante todo o experimento foi observada, em ambas as linhagens de camundongos infectados, uma elevação na porcentagem de células localizadas na região de linfócitos e macrófagos (Figura 4.33G e H). Este aumento foi mais expressivo na linhagem A aos 14 e 21 dpi, quando o número destes tipos celulares se apresentou em torno de 33% e 26% respectivamente (Figura 4.33G).

**Figura 4.33** – Análise da dinâmica de populações de linfócitos B CD19<sup>+</sup>, macrófagos F4/80<sup>+</sup>, megacariócitos CD41<sup>+</sup> e células inflamatórias no fígado de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com 10<sup>7</sup> formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005. n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ .

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .



### 4.2.6.3 Sangue

A análise do perfil de linfócitos T CD3<sup>+</sup> no sangue dos animais inoculados com *T. cruzi*, pela via IG, mostrou pouca variação em relação aos camundongos controle não infectados (Figura 4.34A e B). Somente aos 7 dpi foi observado um aumento desta população nos camundongos BALB/c infectados (Figura 4.34B).

A porcentagem da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> apresentou uma tendência a redução a partir do 14<sup>o</sup> dpi na linhagem A e a partir do 7<sup>o</sup> dpi na linhagem BALB/c, em relação às respectivas linhagens controle não infectadas. Esta redução foi expressiva aos 21 e 40 dpi, de aproximadamente 25% nos animais da linhagem A e aos 21 dpi, chegando a 30% nos BALB/c (Figura 4.34C e D). Além disso, a avaliação da cinética de linfócitos T CD4<sup>+</sup> apontou uma redução desta subpopulação ao longo da infecção na linhagem A. Inversamente à diminuição apresentada pela população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, a subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentou um aumento, a partir do 7<sup>o</sup> dpi, nos animais da linhagem A infectados, e a partir do 14<sup>o</sup> dpi nos camundongos BALB/c infectados. Um aumento expressivo deste tipo celular foi observado no 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 40<sup>o</sup> dpi nos animais infectados da linhagem A, representando entre 35% e 44% da população de linfócitos T CD3<sup>+</sup> (Figura 4.34E). Nos camundongos BALB/c este aumento foi mais significativo nos 21 e 40 dpi, chegando a quase 49% o total deste tipo celular neste último tempo (Figura 4.34F).

Apesar da elevação progressiva da porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e da diminuição na subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> observadas em ambas as linhagens durante a infecção, a porcentagem desta última foi maior durante todo o estudo, sendo esta diferença significativa durante os dias mais iniciais da infecção. No entanto, com o avanço da infecção ocorreu uma redução da diferença entre esses tipos celulares.

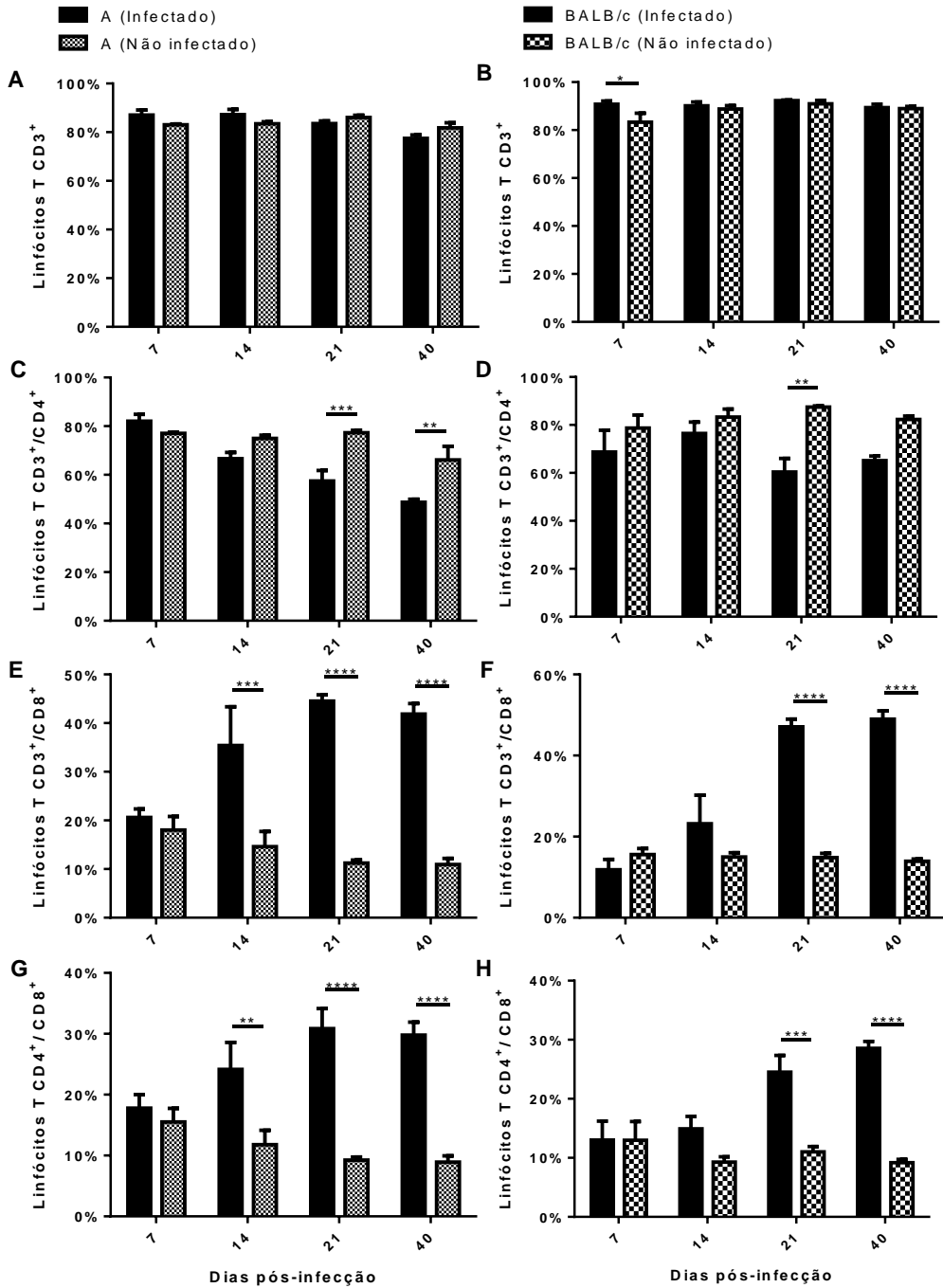
A avaliação da subpopulação de células duplo positivas CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> mostrou um padrão de elevação semelhante ao observado nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. O aumento desta subpopulação de linfócitos foi observado em ambas as linhagens de camundongos infectados. Este aumento foi expressivo aos 14, 21 e 40 dpi entre os animais da linhagem A, abrangendo de 24% a 30% da população de linfócitos, e progressivo na linhagem BALB/c, sendo mais significativo aos 21 e 40 dpi, representando 24% e 28% desta população, respectivamente (Figura 4.34G e H).



**Figura 4.34** – Análise da dinâmica de subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup> no sangue de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com 10<sup>7</sup> formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005.

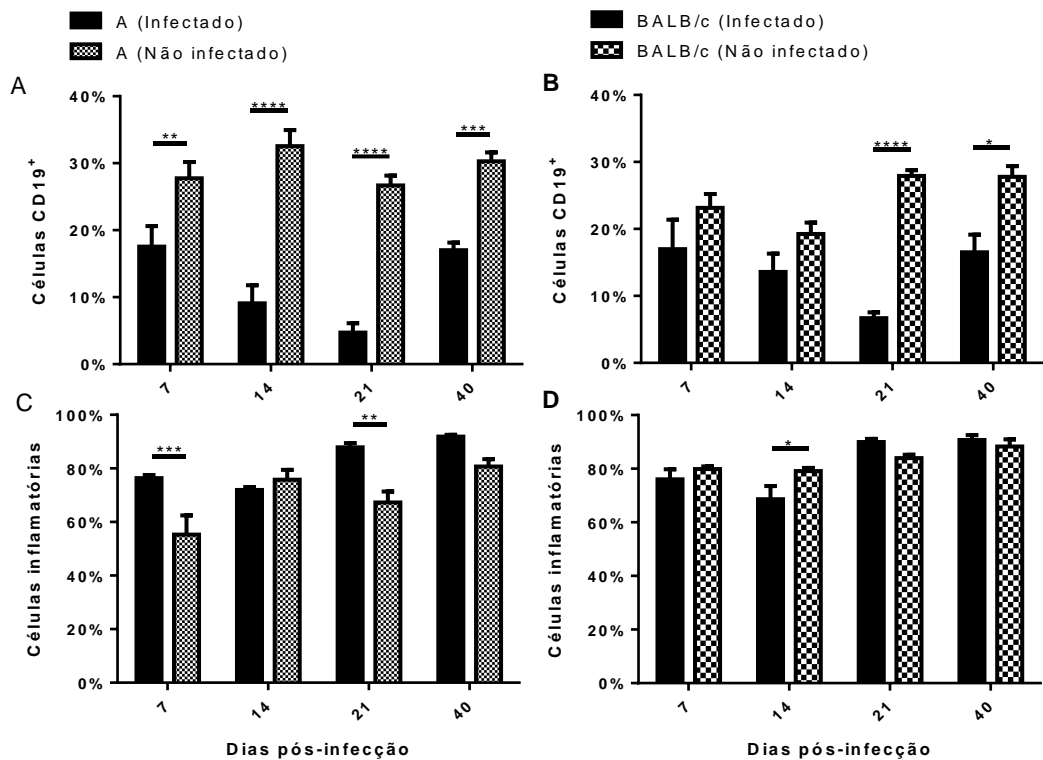
n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ .

\* $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .



Durante toda a infecção foi observada uma redução da população de linfócitos B CD19<sup>+</sup>. Camundongos A infectados apresentaram uma diminuição expressiva em todos os pontos estudados. Aos 21 dpi a porcentagem de linfócitos B CD19<sup>+</sup>, nestes animais, foi quase sete vezes maior que a observada nos controles não infectados (Figura 4.35A). Camundongos BALB/c infectados exibiram uma redução significativa desta população aos 21 e 40 dpi. Aos 21 dpi a redução foi mais acentuada e uma média de 6,68% de linfócitos B CD19<sup>+</sup> foi observada entre os animais BALB/c infectados, enquanto o controle não infectado apresentou uma população em torno de 28% (Figura 4.35B).

As variações quantitativas, das diferentes populações celulares analisadas, resultaram no aumento total da porcentagem de células inflamatórias encontradas no sangue dos animais infectados. Durante o experimento foi observada uma tendência à elevação na porcentagem de células localizadas na região de linfócitos e macrófagos (Figura 4.35C e D). Este aumento foi mais expressivo na linhagem A aos 7 e 21 dpi, quando o número destes tipos celulares se apresentou em torno de 80% (Figura 4.35C). Nos camundongos BALB/c infectados, uma redução destes tipos celulares foi observada aos 14 dpi em relação ao controle, porém a partir deste momento da infecção, a cinética deste parâmetro, entre os infectados, evidenciou um aumento, retornando aos níveis de normalidade (Figura 4.35D).



**Figura 4.35** – Análise da dinâmica de populações de linfócitos B CD19<sup>+</sup> e células inflamatórias no sangue de camundongos A e BALB/c controles e infectados pela via intragástrica com 10<sup>7</sup> formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, isolado SC2005. n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o p ≤ 0,05.

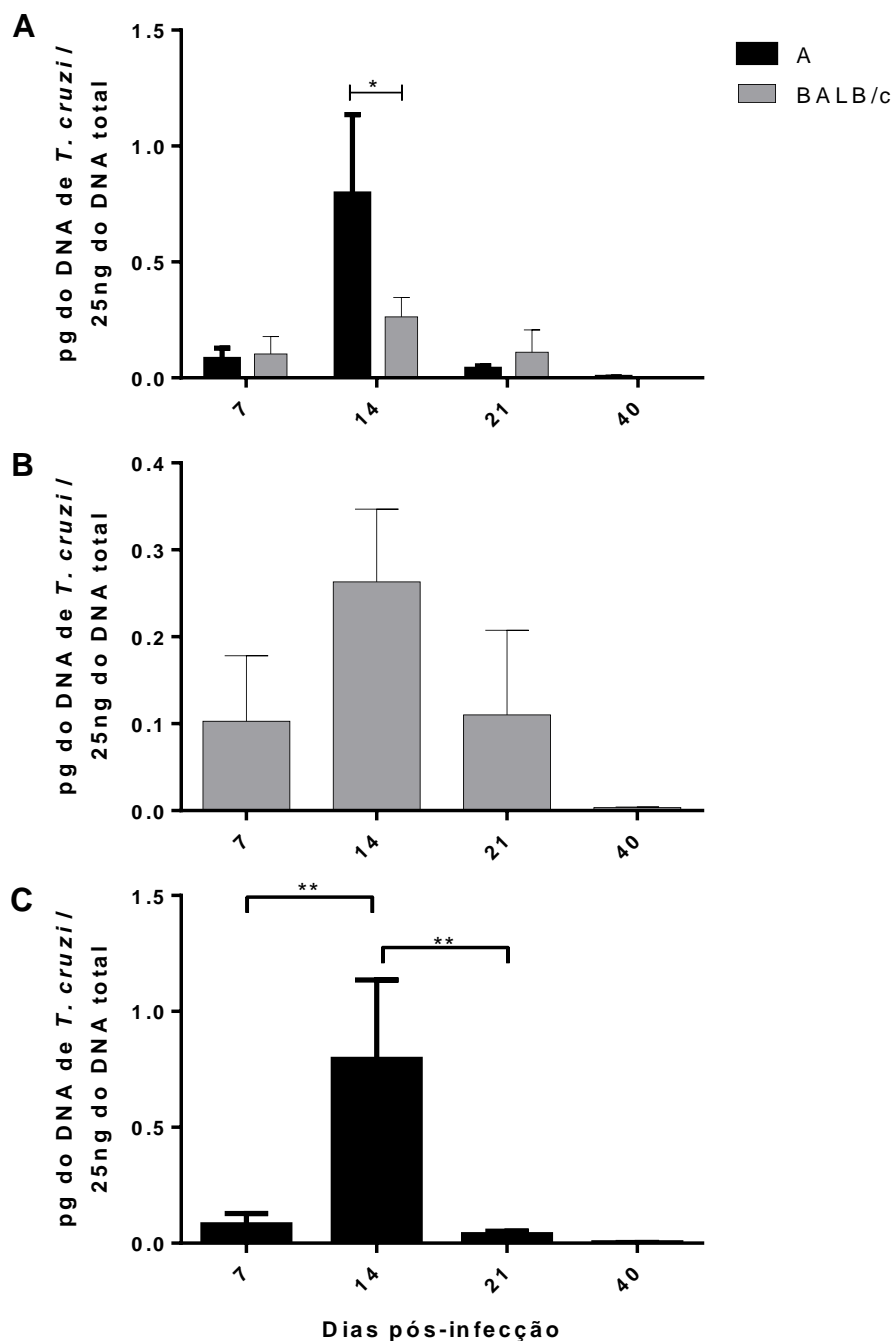
\*p ≤ 0.05; \*\* p ≤ 0.01; \*\*\* p ≤ 0.001; \*\*\*\* p ≤ 0.0001.

#### **4.2.7 PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR)**

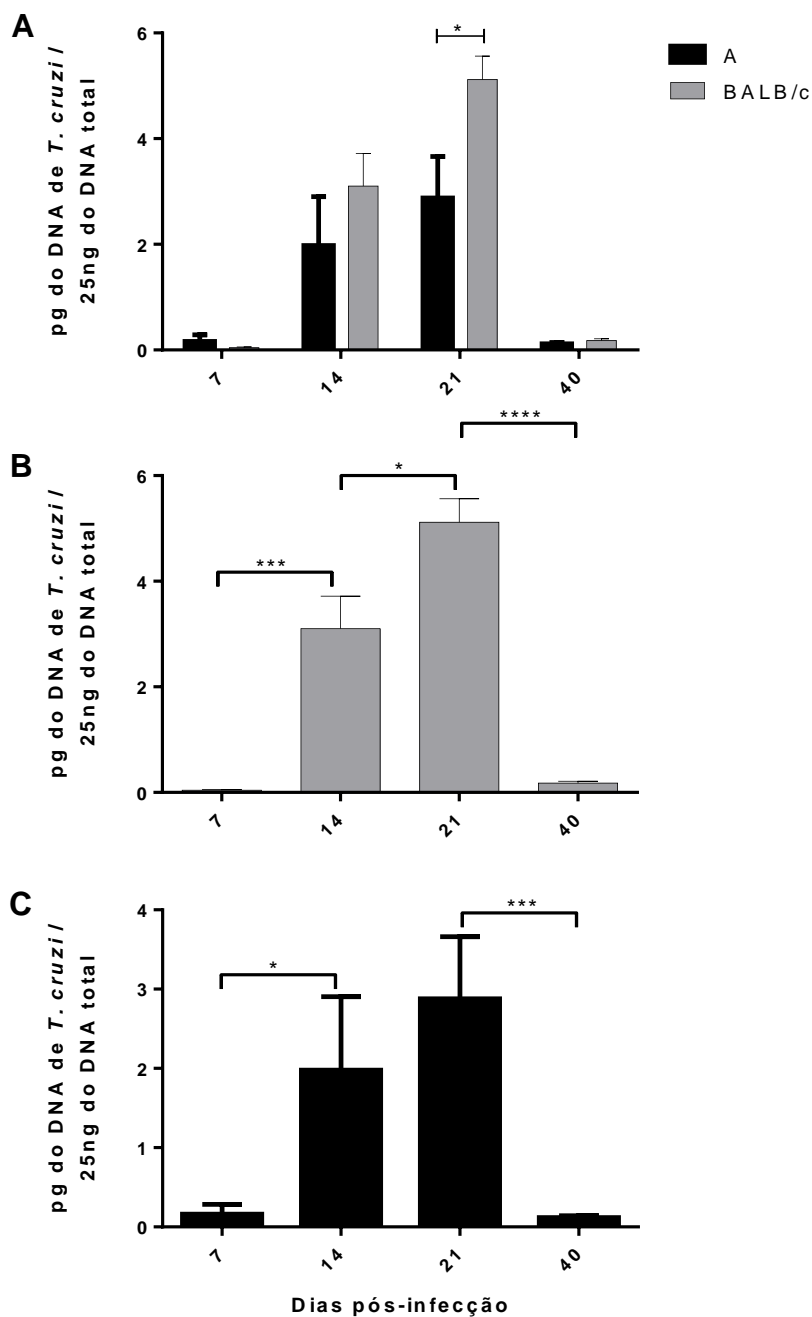
Ambas as linhagens de camundongos infectados apresentaram maior carga parasitária no estômago, aos 14 dpi. Os camundongos A apresentaram carga parasitária significativamente maior que os camundongos BALB/c (Figura 4.36B). Um aumento da carga parasitária foi observado entre o 7º e o 14º dpi, com uma posterior redução entre o 14º e o 21º dpi. Este mesmo padrão foi visto nos camundongos A infectados (Figura 4.36C).

A quantificação do DNA de *T. cruzi* no coração evidenciou que em ambas as linhagens de camundongos infectados houve um aumento da carga parasitária aos 14 e 21 dpi. Os camundongos BALB/c apresentaram carga parasitária significativamente maior que os camundongos A, principalmente aos 21 dpi. Um aumento da carga parasitária foi observado entre o 7º e o 14º e entre este último e o 21º dpi, com posterior redução entre os dias 21 e 40 após a infecção em ambas as linhagens (Figura 4.37B e C).

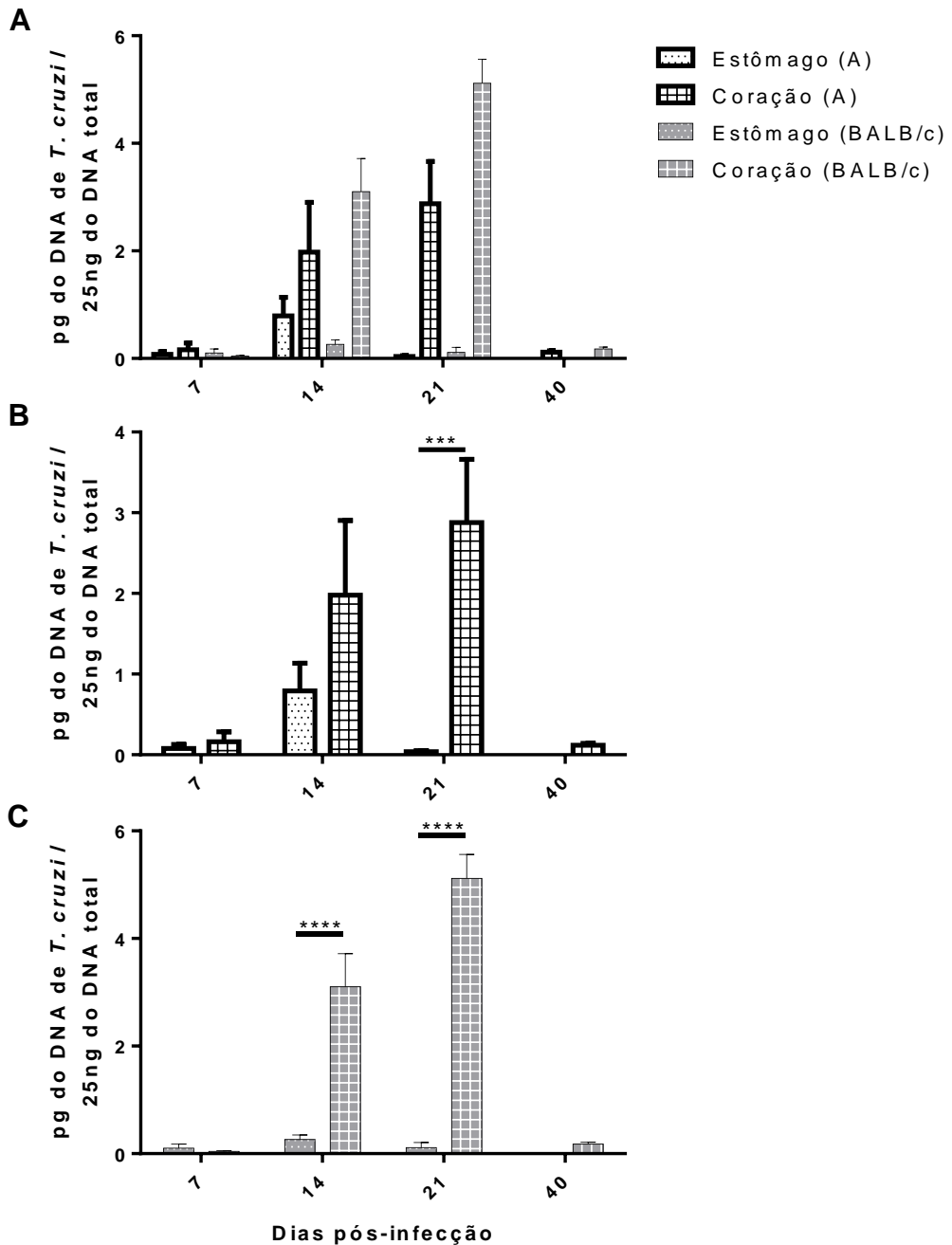
Em ambas as linhagens a quantidade de DNA de *T. cruzi* no estômago se apresentou elevada mais recentemente, aos 14 dpi, seguida de progressivas reduções. Contrariamente, no coração a carga parasitária se apresentou elevada a partir dos 14 dpi, alcançando as maiores dosagens aos 21 dpi, com posterior queda. No período final da infecção, aos 40 dpi, a carga parasitária em ambos os órgãos foi significativamente reduzida, quando comparada aos momentos anteriores. Além disso, também ficou evidente a maior quantificação de DNA do *T. cruzi* no coração de ambas as linhagens em relação ao estômago (Figura 4.38A e B).



**Figura 4.36** – Quantificação de DNA do *T. cruzi*, por qPCR, no estômago de camundongos A e BALB/c infectados pela via intragastrica com  $10^7$  formas tripomastigotas do isolado SC2005. n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ . \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .



**Figura 4.37** – Quantificação de DNA do *T. cruzi*, por qPCR, no coração de camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas metacíclicas do isolado SC2005. n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ . \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .



**Figura 4.38** – Quantificação de DNA de *T. cruzi*, por qPCR, no estômago e coração de camundongos A e BALB/c infectados pela via intragástrica com  $10^7$  formas tripomastigotas do isolado SC2005. n=6 camundongos/dpi/grupo. Foram considerados significativos valores com o  $p \leq 0,05$ .

\*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .



## 5 DISCUSSÃO

É sabido que a infecção pelo *T. cruzi*, assim como em outras infecções parasitárias, acontece através da interação de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro, sendo a via de infecção considerada um fator importante para a ocorrência da doença e um determinante na forma de evolução da mesma. Doenças parasitárias de origem alimentar são geralmente pouco consideradas, porém, tornaram-se mais comuns ao longo dos anos (Dorny et al. 2009). Dentre elas, destacam-se os casos de doença de Chagas aguda proveniente dos surtos frequentemente observados pela ingestão de alimentos contaminados pelo parasito (Yoshida et al. 2011). A transmissão oral do *T. cruzi* tem um caráter habitual primitivo no ciclo enzoótico, ocorrendo a ingestão de vetores infectados por mamíferos suscetíveis (WHO 2002).

No presente trabalho avaliamos, em camundongos das linhagens Swiss Webster, A e BALB/c, as alterações imunopatológicas da infecção pelo *T. cruzi*, isolado SC2005, o qual é proveniente de um surto agudo de doença de Chagas oral.

Na primeira parte deste estudo, grupos de camundongos Swiss Webster foram infectados pelas vias intragástrica (IG) ou intraperitoneal (IP) com formas tripomastigotas derivadas de cultura celular, do isolado SC2005, o qual foi caracterizado como pertencente ao subgrupo Tc II. Os resultados obtidos utilizando-se as duas diferentes vias de infecção indicam uma clara diferença na parasitemia, mortalidade e taxa de infecção.

Os dois grupos de animais, infectados tanto pela via IP quanto pela via IG, apresentaram duplo pico parasitêmico, padrão semelhante ao observado por Andrade et al. (2011) em experimentos com camundongos Swiss Webster inoculados com outros isolados, também pertencente ao DTU TcII. Estudos realizados por Dias et al. (2013) também mostraram uma maior parasitemia maior e mais precoce dos camundongos Swiss Webster infectados pela via IP com isolados de *T. cruzi* pertencentes a diferentes DTUs.

Uma correlação significativa foi observada entre a parasitemia e a contagem de leucócitos nos animais infectados. Guedes et al. (2012) também observaram uma relação, embora não significativa, entre os números de células sanguíneas e a parasitemia de cães infectados com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y

de *T. cruzi* pela via IP. No nosso estudo os animais infectados pela via IG mostraram um padrão de leucocitose a partir do dia de maior pico de parasitemia, o qual permaneceu até o final do experimento. As populações de linfócitos e neutrófilos se apresentaram elevadas neste momento. Uma correlação significativa foi observada entre a parasitemia e a contagem de monócitos, onde um aumento desta população foi observado no momento do maior pico da parasitemia. Indicando um importante papel da resposta imune do hospedeiro contra a presença do parasito. A população de eosinófilos se mostrou reduzida em alguns momentos da infecção independente da via de infecção utilizada. De acordo com Valent et al. (2012) esta redução pode ser explicada, provavelmente, pela ação de citocinas responsáveis pelo controle do parasito e recrutamento de leucócitos durante a infecção, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12, as quais desempenham um papel inibitório sobre as populações de eosinófilos. Os mesmos padrões de eosinofilia foram observados por Quijano-Hernández et al. (2012) em estudos com cães infectados com *T. cruzi* pela via IP.

O aumento de células inflamatórias circulantes também pôde ser observado nos órgãos dos camundongos infectados. A análise histopatológica dos camundongos Swiss Webster infectados pela via IG e IP mostrou a presença de infiltrados inflamatórios compostos predominantemente por células mononucleares, os quais estavam localizados, preferencialmente, nas camadas musculares dos órgãos analisados. Estes infiltrados estavam normalmente associados à redistribuição e neoformação de fibras do sistema colágeno. Ninhos de parasitos, quando observados, também se localizavam nestas camadas. Tal padrão miotrópico observado em nosso estudo é característico de cepas pertencentes ao DTU TcII (Zingales et al. 2012).

Alterações ocorridas principalmente no coração e sistema digestório são constantemente descritas e estudadas (Santos et al. 2004). Alterações nas gônadas, rins (Cabrine-Santos et al. 2003), sistema nervoso central e glândulas endócrinas (Saldanha et al. 2001; Santos et al. 2002) também foram documentadas. Entretanto, o comprometimento do pâncreas, embora tenha sido descrito, não é muito estudado (Santos et al. 2004). Nesta etapa do estudo os animais infectados pela via IP, principalmente aos 11 dias de infecção, apresentaram uma severa pancreatite, com focos de necrose, o que, possivelmente, ocasionou a morte dos animais infectados entre o 13º e o 18º dias após a infecção. A presença de ninhos de *T. cruzi* também pôde ser observada neste órgão. Já nos animais infectados pela via IG aos 26 dias

de infecção, observou-se apenas uma pancreatite moderada associada à fibrose, sem a presença de parasitos. Estes dados corroboram com os descritos por Santos et al. (2004) em hamsters infectados com *T. cruzi* pela via IP, os quais desenvolveram um quadro de pancreatite envolvendo alterações nos acinos, ilhotas e nervos, com atrofia, fibrose e infiltrado inflamatório mononuclear. Na doença de Chagas, a ocorrência da pancreatite parece estar ligada com o parasitismo local, envolvendo liberação de enzimas pancreáticas devido à ruptura de células parasitadas (Corbett et al. 2002).

O coração dos animais infectados pela via IG apresentaram um intenso infiltrado mononuclear e poucos ninhos de parasitos. Já os camundongos infectados pela via IP mostraram um infiltrado inflamatório moderado e um aumento do parasitismo, com maior presença de ninhos nos tecidos. Segundo Quijano-Hernandez et al. (2012), o parasitismo se inicia no átrio seguido de uma resposta inflamatória eficiente contra o *T. cruzi* e um posterior acometimento do ventrículo. Este padrão foi confirmado por nosso estudo, onde encontramos infiltrados inflamatórios mais severos no átrio e mais ninhos de amastigotas no ventrículo em ambas as vias de infecção.

O fígado dos camundongos *outbreak* infectados por ambas as vias apresentou infiltrados inflamatórios periductais. Segundo Dias-Ungría e Bracho (1970) estes infiltrados se justificam uma vez que a infecção causada pelo *T. cruzi* se propaga, também, pela circulação sanguínea, via sistema porta. Além disso, a presença de megacariócitos e células imaturas, algumas vezes em apoptose, neste órgão sugerem a ocorrência de hematopoiese extramedular. Processos de hematopoiese extramedular no fígado, baço, linfonodo e rim têm sido relatados na literatura (Ahuja et al. 2010; Singhal et al. 2011). Na infecção aguda pelo *T. cruzi* uma supressão da medula óssea com um significativo decréscimo no número de megacarioblastos, eritoblastos, mieloblastos e monoblastos, associado a uma severa anemia foi descrito por Marcondes et al. (2000).

As alterações ocorridas em resposta aos danos sofridos nos diferentes órgãos, são denominadas de remodelamento e envolvem o alongamento celular, a reorganização da matriz tecidual e morte celular (Opie et al. 2006). A morte celular leva ao remodelamento do órgão por um tecido conectivo, formado principalmente por colágeno, dando início a um processo de fibrose (Rassi et al. 2000). Castro-Sesquen et al. (2013) demonstraram um aumento da deposição de colágeno no

coração de cobaias infectadas pela via IP durante a infecção por *T. cruzi*. Este aumento foi observado no interstício do órgão e nos espaços perivasculares, próximos a infiltrados inflamatórios. Uma deposição de colágeno também foi observada próximo ao tecido adiposo epicárdico, associada a células inflamatórias. Nossos resultados mostraram uma redistribuição de colágeno associada aos infiltrados inflamatórios no baço, fígado, coração, estômago, pâncreas, esôfago e intestino dos animais infectados, sugerindo uma alteração na conformação destas fibras devido à presença de células inflamatórias. Estudo realizado com camundongos BALB/c, C57BL/6 e DBA/2 infectados com *Leishmania amazonensis*, corroboram nossos dados, uma vez que a presença de colágeno tipo III foi observada em lesão da fase crônica, fornecendo suporte para células inflamatórias nos tecidos afetados pelo parasito (Abreu-Silva et al. 2004).

O controle da doença de Chagas, desempenhado pelo sistema imunológico, é essencial para a minimização de danos ocorridos em órgãos acometidos durante a infecção, como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso (Tanowitz et al. 1992; Brener & Gazzinelli 1997). Em nossos experimentos, observamos uma flutuação na porcentagem de linfócitos nos tecidos analisados. A relação linfocitária no baço e no sangue dos animais infectados pela via IP não apresentou alteração na fase inicial da infecção, semelhante ao observado no grupo controle, não infectado. Com exceção da redução na proporção de células T CD4<sup>+</sup> no linfonodo mesentérico durante todo o experimento e em todos os animais, independente do grupo experimental, exceto no 18<sup>o</sup> dia de infecção. Por outro lado, notou-se um aumento das células TCD8<sup>+</sup> no fígado e no sangue, indicando a proliferação destas células e redistribuição para locais de infecção. A variação das populações celulares em diferentes órgãos linfóides demonstra um perfil diferente de resposta em cada um desses compartimentos, levando a uma flutuação da população de linfócitos (Morrot et al. 2012).

Apesar dos perfis de alterações imunopatológicas gerados serem semelhantes nas vias de infecção IP e IG nos camundongos Swiss Webster, a infecção intragástrica se demonstrou mais branda, com taxas de mortalidade e parasitemia reduzidas, infiltrados inflamatórios e presença de ninhos de parasitos menos frequentes. Talvez a utilização de formas derivadas de cultura de célula para a realização da infecção tenha um papel determinante nos resultados observados, uma vez que infecções orais tendem a ser mais severas. Além disto, a variação na

taxa de infecção observada entre os camundongos Swiss Webster infectados pela via IG demonstra que fatores relacionados à genética do hospedeiro estão envolvidos no controle da infecção. Para esclarecer esses pontos foram realizados protocolos experimentais que compuseram a segunda parte dos estudos apresentados, onde camundongos A e BALB/c foram infectados pela via IG com formas tripomastigotas metacíclicas do isolado SC2005 de *T. cruzi*, derivadas de cultura axênica.

Na segunda parte deste trabalho, a avaliação de proteínas de superfície gp82, gp90 e gp35/50 foi realizada utilizando-se anticorpos monoclonais, os quais identificaram uma grande expressão de gp90 e gp82 nas formas tripomastigotas metacíclicas. Segundo Bayer-Santos et al. (2013) estas glicoproteínas de superfície estão presentes tanto em formas epimastigotas quanto em tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, porém, uma alta expressão destas é observada apenas nas formas tripomastigotas metacíclicas. Aos 22 dias de cultura, uma alta expressão de gp90 (5E7) e gp82 (3F6) foi notada, indicando a presença de formas tripomastigotas metacíclicas na amostra. A presença da gp82 e gp90 interfere diretamente na invasão do parasito ao epitélio gástrico, as quais atuam, respectivamente, como mediadora e reguladora negativa deste processo (Clemente et al. 2016).

Formas metacíclicas de isolados TcII, altamente invasivas, são deficientes em gp90, reconhecida pelo anticorpo 1G7, porém, expressam a forma modificada desta glicoproteína detectada pelo 5E7 (Yoshida 2006). Na primeira parte do nosso estudo, os resultados da caracterização do isolado SC2005 de *T. cruzi*, utilizado em ambos os experimentos, mostrou que ele pertence a DTU – TcII e a análise de glicoproteínas de superfície das formas tripomastigotas metacíclicas deste isolado ratifica esta classificação. Apesar da gp90 regular negativamente a entrada do parasito no epitélio gástrico, a cepa SC2005 demonstrou uma alta capacidade em infectar camundongos pela via oral, isto porque quando em contato com o conteúdo gástrico a gp90 sofre uma completa digestão, segundo o observado por Covarrubias et al. (2007).

A técnica de Western-blotting também demonstrou a presença da glicoproteína de superfície gp35/50 no isolado SC2005. A glicoproteína de superfície gp35/50, detectada pelos anticorpos 2B10 e 10D8, é observada nas formas evolutivas epimastigota e tripomastigota metacíclica. Formas metacíclicas, de alguns isolados utilizam esta glicoproteína como auxílio para a invasão do epitélio gástrico.

Além disso, a gp35/50 pode proteger os parasitos contra a digestão pelo suco gástrico durante a infecção oral (Mortara et al. 1992; Yoshida 2006; Niyogi et al. 2014).

Os dados apresentados sugerem uma alta capacidade do isolado SC2005 de *T. cruzi* de promover infecção pela via oral, confirmada pelos achados em ambas as linhagens de camundongos utilizadas no presente estudo. Além de fatores relacionados ao parasito, a genética do hospedeiro e a via de infecção também estão envolvidos no desenvolvimento da imunopatologia da doença de Chagas. No nosso trabalho, os resultados da infecção das duas linhagens estudadas indicaram uma significativa diferença na parasitemia e na sobrevivência. Embora ambas as linhagens tenham se mostrado susceptíveis à infecção, a linhagem BALB/c apresentou um grau de sensibilidade mais acentuado. Esta linhagem apresentou uma parasitemia elevada e uma anemia microcítica hipocrômica mais precoce, se comparada aos camundongos da linhagem A, que exibiram uma baixa parasitemia acompanhada de uma anemia microcítica hipocrômica mais tardia.

Segundo Naoum e Naoum (2008) uma anemia microcítica hipocrômica pode ser causada por uma condição de ferropenia ou talassemia, sendo esta última, uma doença hereditária autossômica recessiva. A provável ferropenia causada pela exfoliação do ferro em infecções parasitárias, incluindo a doença de Chagas, é indicada em inúmeros estudos (Arantes et al. 2007; Jankowska et al. 2010; Miranda et al. 2014). No entanto, o baixo nível de ferro relatado nesses estudos ocorre em órgãos como fígado e coração. Arantes et al. (2011) não observaram alteração nos níveis de ferro no soro de camundongos infectados com *T. cruzi*. Outra possível causa da anemia microcítica hipocrômica, observada no nosso estudo, pode ser decorrente de uma possível alteração nas células-tronco hematopoiéticas da medula óssea. Tal hipótese é corroborada pela presença de megacariócitos, células eritróides e seus precursores e células mitóticas no fígado dos animais infectados, aos 14 e 21 dias após a infecção. Estes achados, sugestivos de hematopoese extramedular, também foram descritos na etapa anterior do presente estudo, utilizando camundongos Swiss Webster infectados com *T. cruzi* pela via IG e IP (Domingues et al. 2015).

O aumento do número de leucócitos apontado pelo hemograma também foi observado no estômago, coração e fígado dos animais infectados de ambas as

linhagens, sendo, as alterações histopatológicas semelhantes em ambas as linhagens. O estômago tem sido descrito como a principal porta de entrada do *T. cruzi* no organismo hospedeiro, onde a capacidade de invadir e se multiplicar está intimamente relacionada com as glicoproteínas de membranas apresentadas pelo parasito (Maeda et al. 2016; Filigheddu et al. 2017). A presença de intensos infiltrados inflamatórios foi observada no estômago dos animais de ambas linhagens infectadas. Aos 7 dias de infecção a camada mucosa apresentou um acometimento semelhante entre elas. Porém, neste mesmo tempo de infecção, os camundongos da linhagem A apresentaram moderada inflamação, também, na camada muscular deste órgão. Aos 14 dias de infecção a presença de células inflamatórias na camada muscular do estômago destes animais, coincidiu com a grande quantidade de DNA do parasito. Nos camundongos da linhagem BALB/c, os infiltrados na camada muscular do estômago apareceram aos 14 dias, coincidindo com o aumento da quantidade de DNA de *T. cruzi* neste órgão. Em ambas as linhagens, aos 21 dias de infecção, o estômago ainda se apresentou muito inflamado, porém a presença de DNA do parasito estava muito reduzida. Estes dados corroboram os de Cortez et al. (2012) que observaram a capacidade do parasito de invadir e se multiplicar no estômago de camundongos BALB/c após quatro dias da infecção oral.

Embora alguns autores descrevam a cavidade oral, esôfago e palato como possíveis locais de invasão do parasito (Añez et al. 2013; Silva-dos-Santos et al. 2017), os dados do presente estudo indicam uma eficiente migração, invasão e multiplicação do parasito no estômago dos animais infectados. A elevada presença de DNA do *T. cruzi* nos tempos iniciais da infecção, seguida de reduções sucessivas, indicam tal eficiência. Somado a isto, a ausência de alterações ao longo do intestino e a presença de infiltrados inflamatórios, somente a partir dos 14 dias, restrito à camada muscular no esôfago de camundongos da linhagem A, corroboram os achados que indicam o estômago como local de entrada do parasito.

Além do intenso acometimento da camada muscular do estômago, o coração dos animais BALB/c e A infectados também apresentou intensas alterações imunopatológicas. Durante o desenvolvimento da infecção pelo *T. cruzi*, um padrão miotrópico é observado principalmente nos isolados pertencentes aos grupos TcI e TcII. Além disso, os casos de morte pela doença de Chagas aguda estão intimamente relacionados com danos cardíacos (Zingales et al. 2012; de Góes Costa et al. 2017).

No coração dos animais infectados a presença de células inflamatórias foi notada a partir do 7º dia de infecção. Porém, nos animais da linhagem A ocorreu um aumento do infiltrado no 14º dpi, no mesmo momento em que foram observados ninhos de *T. cruzi* e a presença de DNA do parasito neste órgão. Aos 21 dias, a quantificação do DNA do parasito continuou elevada, assim como a presença de ninhos do *T. cruzi*, mas aumentaram os infiltrados inflamatórios presentes neste órgão. Na linhagem BALB/c o aumento do infiltrado inflamatório foi observado mais tardiamente, aos 21 dias, momento em que a quantificação do DNA parasitário se mostrou mais elevada. Aos 40 dias, em ambas as linhagens, os infiltrados inflamatórios permaneceram elevados, porém, a ausência de ninhos e uma redução significativa na presença de DNA do parasito foram observadas. No coração de camundongos BALB/c infectados pela via oral com diferentes isolados de *T. cruzi*, provenientes de casos agudos da doença de Chagas, Diaz et al. (2015) observaram a associação do dano cardíaco por infiltrados inflamatórios e ninhos de parasito com a presença de DNA do *T. cruzi* onde o isolado mais patogênico apresentou mais infiltrados inflamatórios e ninhos de amastigota correlacionados com a maior quantificação do DNA no órgão.

Além da observação dos tipos celulares presentes nos infiltrados inflamatórios, a distribuição destes nos órgãos estudados mostrou um padrão de localização em ambas as linhagens de camundongos avaliadas. No coração, os infiltrados estavam mais intensos na região do átrio. Com a progressão da infecção, as células inflamatórias alcançaram o ventrículo, porém, uma organização próxima às regiões do endocárdio e pericárdio foi observada. Este padrão de distribuição dos infiltrados já foi descrito anteriormente, tanto na primeira parte do presente estudo, em camundongos Swiss Webster infectados com este mesmo isolado de *T. cruzi*, quanto por outros autores (Quijano-Hernandez et al. 2012; Barreto-de-Albuquerque et al. 2015; Domingues et al 2015). Estes dados indicam que o parasitismo no coração e a resposta do hospedeiro a este processo é semelhante independente das variáveis inseridas no processo de infecção, como: genética do hospedeiro, via de infecção, isolado ou forma evolutiva do *T. cruzi*.

No estômago, um padrão de distribuição dos infiltrados inflamatórios também se mostrou evidente. As células inflamatórias, quando alcançaram a região da camada muscular do órgão, estavam distribuídas próximas ao tecido conjuntivo presente entre os feixes. Esta distribuição espacial dos infiltrados inflamatórios no



coração e estômago indicam um íntimo contato das células inflamatórias com as regiões de tecido conjuntivo denso, os quais são ricos em colágeno. Por isto, uma redistribuição e produção de fibras colágenas foram constantemente notadas, estando associadas aos infiltrados inflamatórios. Estudos que visam o controle da infecção pelo *T. cruzi* indicam grandes danos associados à neoformação de colágenos em órgãos como o coração, uma vez que claros benefícios são observados com a redução da resposta inflamatória nos tecidos e a regularização na formação de colágeno (Leite et al. 2017).

No fígado, a presença do elevado número de células inflamatórias tanto ao redor dos vasos, extravasamento celular, como no parênquima do órgão, indicam um grande acometimento do órgão. A localização do infiltrado inflamatório na região do parênquima e ao redor dos vasos também foi observada em estudos com camundongos BALB/c infectados pela via IG com a cepa Tulahuén (DTU- TcVI) (Barreto-de-Albuquerque et al. 2015). Em diferentes estudos utilizando camundongos de diferentes linhagens infectados com cepas DTU- TCII, infiltrados inflamatórios no parênquima e ao redor dos vasos no fígado também foram observados (Arantes 2006; Sardinha et al. 2010; Lopes et al. 2016).

O aumento do número de leucócitos observado tanto no sangue, como no fígado e no coração dos animais infectados de ambas as linhagens, ocorreu devido ao aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, caracterizados por linfocitose e atipia linfocitária no hemograma. Porém, no sangue dos animais infectados, o aumento de monócitos circulantes também foi notado e o número de células CD19<sup>+</sup> não foi alterado, contrapondo ao observado no fígado e no coração. No fígado foi observada a diminuição de macrófagos F4/80<sup>+</sup> e o aumento de linfócitos B CD19<sup>+</sup> e no coração as populações de macrófagos F4/80<sup>+</sup> se mostraram inalteradas e linfócitos B CD19<sup>+</sup> se mostraram reduzidos em ambas as linhagens.

Estudos mostram que embora a atuação de ambas as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> sejam observadas durante a infecção pelo *T. cruzi*, independente da via de infecção estudada (Zhang & Tarleton 1999; Sardinha et al. 2010; Kuehn et al. 2014; Cerny et al. 2016), linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm sido descritos como de grande importância para o controle antigênico da infecção, tanto em infecções agudas adquiridas pela via oral, como em infecções crônicas (Collins et al. 2011; Mateus et al 2017). Contudo, outros estudos indicam que linfócitos T CD8<sup>+</sup> falham em conter a parasitemia e o parasitismo tecidual na ausência de linfócitos T

CD4<sup>+</sup> (Padilla et al. 2007). Isto se deve ao fato de que a deficiência de células CD4<sup>+</sup> leva a um aumento do parasitismo tecidual, consequência da redução global da resposta imunológica do hospedeiro, possivelmente devido à deficiência na ativação de macrófagos e da proliferação de linfócitos B e T CD8<sup>+</sup> promovida pela ação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Rottenberg et al. 1995; Gonçalves da Costa et al. 2002). Desta forma, esses resultados evidenciam que ambas as subpopulações T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são necessárias para o desenvolvimento da imunidade protetora, porém, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são suficientes para o desempenho de uma função efetora contra o parasito (Sullivan et al. 2011). Apesar da presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue, no fígado e no coração dos animais infectados, o aumento dos LT CD8<sup>+</sup> nos tecidos contribuem diretamente para o controle da carga parasitária. Isto explica porque camundongos da linhagem A, que apresentam uma resposta contra infecção mais recente (14 dpi), apresentam uma parasitemia e mortalidade mais reduzidas. Além de ser corroborado pela acentuada queda na quantificação do DNA do *T. cruzi* aos 40 dias de infecção no coração e estômago, após o aumento essencialmente linfocitário nestes órgãos.

Células T duplo-positivas CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> são observadas em indivíduos que possuem doenças infecciosas, autoimunes e distúrbios inflamatórios crônicos (Perez et al. 2012). Em condições normais, estes tipos celulares são encontrados no timo, onde sofrem diferenciação em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> maduras. Todavia, durante a infecção pelo *T. cruzi*, cascatas desreguladas de citocinas pró-inflamatórias comprometem significativamente este órgão, levando a uma maturação celular em órgãos extra-tímicos, tais como medula óssea e fígado (Perez et al. 2007; Araújo et al. 2008). Somado a isto, a anemia microcítica hipocrômica e a atipia linfocitária no fígado e sangue, reforçam a ideia de circulação de células imaturas, como os linfócitos duplo-positivos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, e indicam a ocorrência da maturação de linfócitos T que expressam co-receptores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no fígado dos animais A e BALB/c infectados neste estudo.

O aumento de monócitos no sangue dos animais infectados é de extrema importância, uma vez que a imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos invasores, estando diretamente envolvida no controle do *T. cruzi* e iniciando uma resposta celular e humoral, sistêmica e local (Reyes et al. 2006; Cerny et al. 2016). Estudos com camundongos infectados com *T. cruzi*, pela via oral e intragástrica, relataram o aumento desta linhagem celular nos

momentos iniciais da infecção (Kuehn et al. 2014; Barreto-de-Albuquerque et al. 2015; Domingues et al. 2015).

Células CD19<sup>+</sup> em maior número no fígado dos animais infectados foi observada mais precocemente aos 14 dpi nos camundongos A, no mesmo momento em que plasmócitos foram observados no parênquima do órgão. O mesmo perfil foi visto mais tardiamente em camundongos BALB/c. Estudos sugerem que além da secreção de anticorpos, as células B desempenham a função de apresentação de antígenos durante o desenvolvimento de uma imunidade protetora contra o *T. cruzi* (Hoft et al. 2007). Em estudos de imunização, as células B desempenham um importante papel como células apresentadoras de antígenos (APC), ativando células T CD8<sup>+</sup> (Sullivan et al. 2011). A diminuição de linfócitos B no coração é ocasionada, provavelmente, pela migração deste tipo celular para outros locais afetados pela infecção e o posterior retorno aos níveis normais desta população estão ligados à modulação do sistema imunológico local e sistêmico. Esta regulação está, muitas vezes, relacionada à gravidade das manifestações clínicas presentes, refletindo na redistribuição e circulação dos subtipos de linfócitos (Toso et al. 2011; Domingues et al. 2015). No parênquima hepático, concomitante ao aumento de células B, foi observada a elevação da porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> sugerindo o desenvolvimento de função de APC pelas células CD19<sup>+</sup>. A presença de células B está também relacionada à maior capacidade de mobilização de células inflamatórias para os tecidos, sugerindo que as células B modulam os linfócitos T para uma resposta do tipo Th1 durante a fase aguda da infecção (Arantes et al. 2011).

Essencialmente citocinas Th1 foram observadas, no presente estudo, no soro dos camundongos A e BALB/c infectados. Tais citocinas desempenham uma função pró-inflamatória, contra a replicação intracelular sistêmica do patógeno, conferindo ao hospedeiro um perfil de resistência (Gutierrez et al. 2009; Sanmarco et al. 2016). Estudos *in vitro*, utilizando PBMCs infectadas com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*, apontam para a ação da IL-6 sobre as células citotóxicas, melhorando a sua sobrevivência e funções efetoras (Sanmarco et al. 2016). Células T efetoras contra o *T. cruzi* produzem interferon (IFN)- $\gamma$ , citocina apontada como um dos principais fatores envolvidos na destruição do parasito, em distintos modelos experimentais (Miranda et al. 2015). Estes dados elucidam o fato do aumento de IL-6 ter sido observado anteriormente (7 dpi) à elevação dos níveis de IFN- $\gamma$  (14 dpi) em ambas

as linhagens, uma vez que as células citotóxicas presentes nos tecidos, podem ter sido primeiramente ativadas pela IL-6, para a posterior produção de IFN- $\gamma$ . Em estudos, utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes para IL-17A (IL-17A<sup>-/-</sup>) infectados com *T. cruzi*, cepa Tulahuén, foi observada uma parasitemia mais severa e mortalidade acompanhadas de uma produção reduzida das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , em relação aos camundongos selvagens (Miyazaki et al. 2010). No presente trabalho as mesmas citocinas foram observadas aumentadas nos camundongos infectados com a cepa de *T. cruzi* SC2005. Estes dados revelam a importância destas citocinas no controle parasitêmico da infecção.

Ambas as linhagens se mostraram sensíveis ao *T. cruzi* e desenvolveram semelhantes padrões de resposta frente a infecção. No entanto, as alterações imunopatológicas observadas ocorreram mais precocemente nos camundongos da linhagem A, em geral aos 14 dias após a infecção, momento que antecede o pico parasitêmico. Além disto, esta linhagem demonstrou uma baixa parasitemia, indicando a eficiência da resposta imune recém deflagrada, uma vez que a quantificação de DNA do *T. cruzi*, no estômago, se mostrou mais elevada que nos camundongos BALB/c, porém, o coração desta linhagem apresentou reduzida carga parasitária. Os danos teciduais observados nesta linhagem foram pouco menos intensos do que os apresentados pela linhagem BALB/c, que apresentaram maior quantificação de DNA do parasito no coração, indicando uma resposta imune menos eficiente nestes camundongos. Nos animais da linhagem BALB/c, a resposta à infecção ocorreu mais tardiamente, aos 21 dpi, quando a parasitemia já se encontrava elevada, justificando maior taxa de mortalidade e maior parasitemia apresentada por estes animais.

Apesar de ambas as linhagens A e BALB/c serem suscetíveis ao *T. cruzi* e desenvolverem a infecção, elas apresentam um perfil mais resistente, caracterizado pelas alterações imunopatológicas e pelas baixas parasitemia e mortalidade observadas quando comparadas a outros modelos experimentais, como o utilizado na primeira parte do nosso estudo - camundongos Swiss Webster infectados IG pelo *T. cruzi*. Porém, por desenvolver uma resposta mais precoce, a linhagem A se mostrou menos sensível que a linhagem BALB/c. Estes dados enfatizam a importância do desenvolvimento precoce e mais rápido de um perfil celular citotóxico com produção de citocinas pró-inflamatórias para um melhor prognóstico da doença de Chagas.

Com base no exposto, podemos afirmar que o presente estudo contribuiu para o possível desenvolvimento de intervenções imunes, a serem utilizadas na elaboração de vacinas profiláticas e terapêuticas. O desenvolvimento de imunoterapias, que envolvam um perfil Th1, visando uma rápida proliferação de linfócitos T CD8+, é uma importante perspectiva deste trabalho.

## 6 CONCLUSÕES

1. Formas tripomastigostas derivadas de cultura de células de *Trypanosoma cruzi*, isolado SC2005, são capazes de promover infecção pelas vias intragástrica (IG) e intraperitoneal (IP) no modelo murino;
2. A infecção pela via intragástrica promove uma infecção mais branda do que a infecção pela via intraperitoneal;
3. A genética do hospedeiro tem um papel fundamental no desenvolvimento da infecção pela via intragástrica (IG);
4. Camundongos da linhagem A apresentaram uma resposta mais efetiva contra a infecção em comparação com os animais BALB/c;
5. O aumento do número de leucócitos está associado à parasitemia apresentada pelos camundongos infectados, independente da via de infecção e da genética do hospedeiro;
6. O aumento do número de células inflamatórias antecedendo o aumento acentuado da parasitemia contribui para uma infecção mais branda;
7. A produção precoce de citocinas Th1, principalmente IL-6, está relacionada com uma resposta imune mais eficaz contra o parasito;
8. O padrão de colonização observado nos animais infectados, independente da via de infecção e da genética do hospedeiro, foi idêntico, entretanto houve variação na intensidade do parasitismo;
9. O processo inflamatório cardíaco está associado a presença do parasito independente da via de infecção e genética do hospedeiro;
10. Hematopoiese extramedular observada no fígado dos animais infectados está diretamente relacionada às variações observadas no eritrograma;
11. A elevada presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> contribui para o controle da infecção;
12. O estômago é o principal local de entrada do parasito na infecção pela via IG.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Mortara RA, Tedesco RC, Cardoso FO, Carvalho LO, Gonçalves da Costa SC. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. *Parasitology*. 2004; 128(Pt 4):385-90.

Ahuja S, Grover G, Jha AK, Sodhi K, Bansal D, Dey P. Extramedullary hematopoiesis presented as solitary renal mass: a case report with review of literature. *Diagn Cytopathol*. 2011; 39(6):435-7.

Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol*. 2005; 3(10):819-823.

Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, Almeida MC, Reis JN, Santos VC, Valadares HM, Reis MG, Macedo AM. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(8):948-56.

Añez N, Crisante G, Rojas A, Dávila D. Brote de enfermedad de Chagas aguda de posible transmisión oral en Mérida, Venezuela [Acute Chagas disease outbreak of possible oral transmission in Merida, Venezuela]. *Bol Mal Salud Amb*. 2013; 53:1–11.

Arantes JM, Francisco AF, de Abreu Vieira PM, Silva M, Araújo MS, de Carvalho AT, et al. *Trypanosoma cruzi*: desferrioxamine decreases mortality and parasitemia in infected mice through a trypanostatic effect. *Exp Parasitol*. 2011;128(4):401-8.

Arantes JM, Pedrosa ML, Martins HR, Veloso VM, de Lana M, Bahia MT, et al. *Trypanosoma cruzi*: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. *Exp Parasitol*. 2007;117(1):43-50.

Arantes JM. Influência da utilização da desferrioxamina, quelante de ferro, sobre o curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongo. [Tese]. Universidade Federal de Ouro Preto. 2006.

Araújo J A P, Catelan T T T, Cruvinel W M, Mesquita Jr D, Silva N P, Andrade L E C. Linfócitos B: da imunobiologia aos imunobiológicos. Sinopse de Reumatologia. 2008; 10:03-19.

Araujo PF, Almeida AB, Pimentel CF, Silva AR, Sousa A, Valente SA, Valente VC, Britto MM, Rosa AC, Alves RM, Hagström L, Teixeira AR. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017; 112(6):437-446.

Ayub-Ferreira SM, Mangini S, Issa VS, Cruz FD, Bacal F, et al. Mode of death on Chagas heart disease: comparison with other etiologies. A subanalysis of the REMADHE prospective trial. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7:e2176.

Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, et al. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(6):e0003849.

Bastin P, Gull K. Assembly and function of complex flagellar structures illustrated by the paraflagellar rod of trypanosomes. Protist. 1999; 150(2):113-23.

Bayer-Santos E, Cunha-e-Silva NL, Yoshida N, Franco da Silveira J. Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Parasit Vectors. 2013; 6:127.

Bern C. Chagas' disease. N Engl J Med. 2015; 373:456–66.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol. 1997; 114(2):103-110.

Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. Cell. Microbiol. 2002; 4(11):701-711.

Cabrine-Santos M, Santos VM, Lima MA, Abreu MEA, Lages-Silva E, Ramírez LE. Genitourinary changes in hamsters infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98:523–528.



Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 1964; 6:93-100.

Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortes A, Levin MJ, Gonzalez A, Degraeve W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requena JM, Dasilveira JF. Molecular Karyotype of Clone CI Brener Chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. Mol Biochem Parasitol. 1995; 71(2):273-278.

Cardoso FA. Sur le mecanisme de la transmission de la maladie de Chagas. Ann Parasitol Humaine. 1933; 16: 341-9.

Carvalho CM, Andrade MC, Xavier SS, Mangia RH, Britto CC, Jansen AM, Fernandes O, Lannes-Vieira J, Bonecini-Almeida MG. Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography, and radiology. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68(6):683-91.

Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Human & experimental toxicology. 2006; 25:471-9.

Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Paico H, Yauri V, Angulo N, Ccopa F, Bern C. Cell death and serum markers of collagen metabolism during cardiac remodeling in *Cavia porcellus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(2):e1996.

Cerny N, Sánchez Alberti A, Bivona AE, De Marzi MC, Frank FM, Cazorla SI, et al. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new immunotherapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection. Hum Vaccin Immunother. 2016; 12(2):438-50.

Chatelain E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? Comput Struct Biotechnol J. 2017; 14(15):98-103.

Clemente TM, Cortez C, Novaes Ada S, Yoshida N. Surface Molecules Released by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Downregulate Host Cell Invasion. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(8):e0004883.

Collins MH, Craft JM, Bustamante JM, Tarleton RL. Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8<sup>+</sup> T cell response and protection against heterotopic challenge. *Infect Immun*. 2011; 79(8):3397-406.

Corbett CE, Scremin LH, Lombardi RA, Gama-Rodrigues JJ, Okumura M. Pancreatic lesions in acute experimental Chagas' disease. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002; 57(2):63-6.

Cortez C, Yoshida N, Bahia D, Sobreira TJ. Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. *PLoS One*. 2012; 7(7):e42153.

Cortez C, Martins RM, Alves RM, Silva RC, Bilches LC, Macedo S, Atayde VD, Kawashita SY, Briones MR, Yoshida N. Differential infectivity by the oral route of *Trypanosoma cruzi* lineages derived from Y strain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10):e1804.

Coura Jr, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease-100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:31-40.

Coura Jr, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol*. 2002; 18(4):171-176.

Coura Jr. Relatório apresentado ao Instituto Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde, sobre surto de doença de Chagas Aguda ocorrido em Teutônia, Município de Estrela, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro, junho de 1966.

Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110(3):277-82.

Covarrubias C, Cortez M, Ferreira D, Yoshida N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int J Parasitol*. 2007; 37(14):1609-16.

de Góes Costa E, Dos Santos SO, Sojo-Milano M, Amador EC, Tatto E, Souza DS, de A Costa F, Póvoa RM. Acute Chagas Disease in the Brazilian Amazon: Epidemiological and clinical features. *Int J Cardiol*. 2017; 235:176-178.

de Noya BA, González ON. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop.* 2015; 151:94-102.

Dias E. Transmissão do *Schizotrypanum cruzi* entre vertebrados, por via digestiva. *Brasil Médico.* 1940; 54: 775-6.

Dias GB, Gruending AP, Araújo SM, Gomes ML, Toledo MJ. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol.* 2013; 135(3):511-7.

Dias JC, Ramos AN Jr, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. [Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. *Epidemiol Serv Saude.* 2016; 25(spe):7-86.

Dias JC. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(4):370-375.

Dias-Ungría C, Bracho JS. Camino que sigue el *Trypanosoma cruzi* en perros infectados por la vía bucal: nuevos estudios. *RevVet Venez.* 1970; 29: 271-8.

Díaz ML, Leal S, Mantilla JC, Molina-Berríos A, López-Muñoz R, Solari A, Escobar P, González Rugeles CI. Acute Chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasit Vectors.* 2015; 8:608.

Domingues CS, Haridoim DJ, Souza CS et al. Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. *PLoS One.* 2015; 10(10):e0122566.

Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S. Emerging food-borne parasites. *Vet Parasitol.* 2009;163(3):196-206.

dos Santos VM, de Lima MA, Cabrine-Santos M, de Stefani Marquez D, de Araújo Pereira G, Lages-Silva E, Ramírez LE. Functional and histopathological study of the pancreas in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 2004; 94(2):125-33.

dos Santos VM, de Lima MA, Cabrine-Santos M, Marquez Dde S, Reis Md, Pereira Gde A, Lages-Silva E, Ramírez LE. Pancreatic hepatocytes in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2002; 100(2):103-11.

Eickhoff CS, Giddings OK, Yoshida N, Hoft DF. Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(5):687-691.

Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. Acta Trop. 2002; 81(2):123-132.

Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. Med Clin (Barc). 2017; 148(3):125-131.

Giordano R, Fouts DL, Tewari D, Colli W, Manning JE, Alves MJM. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. J. Biol. Chem. 1999; 274(6):3461-3468.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods. 2001; 25(4):386-401.

Goldenberg S, Avila AR. Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. Adv Parasitol. 2011; 75:285-305.

Gonçalves da Costa S C, Calabrese K S, Zaverucha do Valle T, Lagrange P H. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. Histol Histopathol. 2002; 17(3):837-44.

Guedes PM, Veloso VM, Mineo TW, Santiago-Silva J, Crepalde G, Caldas IS, Nascimento MS, Lana M, Chiari E, Galvão LM, Bahia MT. Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Parasitol Vet. 2012; 21(2):151-6.

Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunol. 2009; 31: 673–685.

Hardoim DJ. Imunopatologia da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos CBA e C57BL/10 infectados pela vias intragástrica e intraperitoneal [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2014.

Hashimoto K, Schofield CJ. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. Parasit Vectors. 2012; 225:45.

Hoare CA. The Trypanosomes of mammals. Oxford and Edinburger: Blackwell Scientific Publications; 1972. 749 p.

Hoft DF, Eickhoff CS, Giddings OK, Vasconcelos JR, Rodrigues MM. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. J Immunol. 2007; 179(10):6889-900.

Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. Infect Immun. 1996; 64(9):3800-3810.

Jankowska EA, Rozentryt P, Witkowska A, Nowak J, Hartmann O, Ponikowska B, et al. Iron deficiency: an ominous sign in patients with systolic chronic heart failure. Eur Heart J. 2010; 31: 1872-1880.

Kofoed CA, Donat F. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* from the intestine of cone-nose bug *Triatoma protracta*. Proc Soc Exp Biol. 1933; 30: 489-91.

Kuehn CC, Oliveira LG, Miranda MA, Prado JC. Distinctive histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal *Trypanosoma cruzi* Y strain infection. Parasitology. 2014; 141(7):904-13.

Leite ALJ, Paula Costa G, Lopes LR, Reis Mota LWD, Vieira PMA, Talvani A. The immunomodulatory effects of the Enalapril in combination with Benznidazole during acute and chronic phases of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 2017; 174:136-145.

Lennert K, Parwaresch MR. Pathology of tissue mast cells. Verh Dtsch Ges Pathol. 1978; 62:546.

Lopes CR, Falkowski GJ, Brustolin CF, Massini PF, Ferreira ÉC, Moreira NM, et al. Highly diluted medication reduces tissue parasitism and inflammation in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. Homeopathy. 2016; 105(2):186-93.

Maeda FY, Clemente TM, Macedo S, Cortez C, Yoshida N. Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. Parasit Vectors. 2016; 9:189.

Maeda FY, Cortez C, Yoshida N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. Front Immunol. 2012; 3:361.

Marcondes MC, Borelli P, Yoshida N, Russo M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect.* 2000; 2(4):347-52.

Marsden PD. *Trypanosoma cruzi* Infections in Cfi Mice .2. Infections Induced by Different Routes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 1967; 61(1):62-67.

Mateus J, Pérez-Antón E, Lasso P, Egui A, Roa N, Carrilero B, et al. Antiparasitic Treatment Induces an Improved CD8+ T Cell Response in Chronic Chagasic Patients. *J Immunol.* 2017; 198(8):3170-3180.

Matos MN, Cazorla SI, Schulze K, Ebensen T, Guzmán CA, Malchiodi EL. Immunization with Tc52 or its amino terminal domain adjuvanted with c-di-AMP induces Th17+Th1 specific immune responses and confers protection against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(2):e0005300.

Mazza S, Montana A, Benitez C, Janzi E. Transmisión del *Schizotripanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. *MEPRA* 1936; 28: 41-9.

Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015; 13(8):995-1029.

Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância da Saúde.. [homepage on the internet]. Situação epidemiológica. [updated 2017 aug 16; cited 2017 sep 20]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-chagas/l2-doenca-de-chagas/11116-situacao-epidemiologica-chagas> .

Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. [internet]. 2015. Volume 46. N° 21.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

Minoprio PM, Eisen H, Forni L, Lima MRD, Joskowicz M, Coutinho A. Polyclonal Lymphocyte-Responses to Murine *Trypanosoma-Cruzi* Infection .1. Quantitation of Both T-Cell and B-Cell Responses. Scandinavian Journal of Immunology. 1986; 24(6):661-668.

Miranda CP, Botoni FA, Nunes M do CP, Rocha MÓ da C. The metabogenic role of iron in chronic chagasic cardiac failure. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(1):154-155.

Miranda CP, Botoni FA, Rocha MOC. Iron metabolism in chronic Chagas cardiomyopathy. Rev Med Minas Gerais. 2014; 3: 1-2.

Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2010; 185(2):1150-7.

Molyneux DH, Savioli L, Engels D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. Lancet. 2011; 389(10066):312-325.

Moncayo A. Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(5):577-591.

Moncayo A. Progress towards the interruption of transmission of Chagas disease in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(suppl. I):401-404.

Moolenbeek C, Ruitenber EJ. The 'Swiss Roll': A Simple Technique For Histological Studies Of The Rodent Intestine Laboratory Animals. Lab Anim. 1981;15(1):57-9.

Moraes-Souza H, Ferreira-Silva M M. O controle da transmissão transfusional. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [Internet]. 2011 [cited 2017 May 25] ; 44( Suppl 2 ): 64-67.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. N Engl J Med. 2015; 373(14):1295-306.

Morrot A, Barreto de Albuquerque J, Berbert LR, de Carvalho Pinto CE, de Meis J, Savino W. Dynamics of Lymphocyte Populations during *Trypanosoma cruzi*

Infection: From Thymocyte Depletion to Differential Cell expansion/Contraction in Peripheral Lymphoid Organs. *J Trop Med*. 2012:747185.

Mortara RA, da Silva S, Araguth MF, Blanco SA, Yoshida N. Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun*. 1992; 60(11):4673-8.

Naoum PC, Naoum FA. [homepage on the internet] Interpretação Laboratorial do Hemograma. São José do Rio Preto, Brazil, 2008 [updated 2017 aug 16; cited 2017 sep 20]. Disponível em: [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/Artigos\\_cientificos/Interphemo.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/Artigos_cientificos/Interphemo.pdf).

Nascentes GA, Hernández CG, Rabelo RA, Coelho RF, Moraes FR, Marques T, et al. The Driving of Immune Response by Th1 Adjuvants in Immunization of Mice with *Trypanosoma cruzi* marinkellei Elicits a Controversial Infection Control. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016; 16(5):317-25.

Neira I, Silva FA, Cortez M, Yoshida N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*. 2003; 71(1):557-561.

Neri Guimarães F, Da Silva NN, Clausel DT, Mello AL, Rapone T, Snell T, de Rodrigues N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teotônia (Estrêla-Rio Grande do Sul). *O Hospital*. 1968; 73(6): 73-110.

Niyogi S, Mucci J, Campetella O, Docampo R. Rab11 regulates trafficking of trans-sialidase to the plasma membrane through the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2014; 10(6):e1004224.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006; 367(9507):356–67.

Organização Panamericana da Saúde (OPAS/PAHO/OMS). [homepage on the internet]. Chagas disease [updated 2017 aug 16; cited 2017 sep 20]. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40%20743&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40%20743&lang=es).

Padilla A, Xu D, Martin d, Tarleton R. Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. *Infect Immun*. 2007; 75(1):231-235.



Perez A R, Morrot A, Berbert L R, Terra-Granado E, Savino, W. Extrathymic CD4+CD8+ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1262; 27–36.

Perez A R, Roggero E, Nicora A, Palazzi J, Besedovsky H O, Del Rey A, et al. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immunoendocrine imbalance. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2007; 21:890–900.

Pinazo MJ, Munoz J, Posada E, Lopez-Chejade P, Gallego M, Ayala E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; 54:4896-9.

Piron R, Fisa N, Casamitjana P, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*. 2007; 103: 195–200.

Pizzi T, Prager R. Estabilizacion de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasaje seriado en ratones de constitucion genetica uniforme: analisis cuantitativo del curso de la infection. *Biologica*. 1952; 16–17:3–12.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001; 1(2):92–100.

Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines* 2011; 7(11):1184-1191.

Ramírez JD, Hernández C. *Trypanosoma cruzi* I: Towards the need of genetic subdivision?, Part II. *Acta Trop*. 2017; S0001-706X(17):30250-4.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol*. 2000; 23:883–9.

Rassi Júnior A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375(9723):1388-402.

Reyes J L, Terrazas L I, Espinoza B, Cruz-Robles D, Soto V, Rivera-Montoya I. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*. 2006; 74:3170–3179.

Rodrigues AA, Notário AF, Teixeira TL, e Silva RT, Quintal AP, Alves RN, Brígido PC, Siqueira CS, Martins FA, Machado FC, Clemente TM, da Silva AA, Borges BC, Teixeira SC, dos Santos MA, da Silva CV. A high throughput analysis of

cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(6):3355-64.

Rottenberg M E, Riarte A, Sporrang L. Outcome of infection with diferente strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett.* 1995;45: 53-60.

Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC et al. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica.* 2014; 34:631-41.

Ruiz RC, Favoreto S Jr, Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. *Biochem J.* 1998; 330 ( Pt 1):505-11.

Saldanha JC, Santos VM, Reis MA, Cunha DF, Teixeira VPA. Morphologic and morphometric evaluation of pancreatic islets in chronic Chagas' disease. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2001; 56:131–138.

Sanmarco LM, Visconti LM, Eberhardt N, Ramello MC, Ponce NE, Spitale NB, et al. IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease. *Front. Immunol.* 2016; 7:626.

Sardinha LR, Mosca T, Elias RM, do Nascimento RS, Gonçalves LA, Bucci DZ, et al. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(1): e578.

Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (Susam). Susam investiga surto de Doença de Chagas no município de Carauari.[internet] Amazonas, 2015. [acesso em jun 2015]. Disponível em: <http://www.amazonas.am.gov.br/2015/01/susam-investiga-surto-de-doenca-de-chagas-no-municipio-de-carauari/>.

Secretaria de Saúde do Rio Grande do Norte (SESAP-RN). [homepage on the internet] Investigação aponta surto de Doença de Chagas em municípios do RN em 2015. [updated 2017 aug 16; cited 2017 sep 20]. Disponível em: <http://www.saude.rn.gov.br/Conteudo.asp?TRAN=ITEM&TARG=111912&ACT=null&PAGE=null&PARM=null&LBL=NOT%C3%83+CIA>.

Shapiro TA, Englund PT. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Ann. Rev. Microbiol.* 1995; 49:117-143.

Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 1969; 3(2):153-157.

Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev.* 2011; 240:72-91.

Silva CV, Luquetti AO, Rassi A, Mortara RA. Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Microb Infect.* 2006; 8: 2120-2129.

Silva GK, Cunha LD, Horta CV, et al. A parent-of-origin effect determines the susceptibility of a non-informative F1 population to *Trypanosoma cruzi* infection in vivo. *PLoS One.* 2013; 8(2):e56347.

Silva-Dos-Santos D, Barreto-de-Albuquerque J, Guerra B, Moreira OC, Berbert LR, Ramos MT, Mascarenhas BAS, Britto C, Morrot A, Serra Villa-Verde DM, Garzoni LR, Savino W, Cotta-de-Almeida V, Meis J. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(4):e0005507.

Singhal N, Tahlan A, Bansal C, Handa U, D'Cruz S. Coexistence of leukemic infiltration and extramedullary hematopoiesis in a lymph node: A cytological diagnosis. *J Cytol.* 2011; 28(3):138-40.

Souza Wd. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (suppl. I):89-100.

Sullivan NL, Eickhoff CS, Sagartz J, Hoft DF. Deficiency of antigen-specific B cells results in decreased *Trypanosoma cruzi* systemic but not mucosal immunity due to CD8 T cell exhaustion. *J Immunol.* 2015; 194(4):1806-18.

Sullivan NL, Eickhoff CS, Zhang X, Giddings OK, Lane TE, Hoft DF. Importance of the CCR5-CCL5 axis for mucosal *Trypanosoma cruzi* protection and B cell activation. *J Immunol.* 2011; 187(3):1358-68.

Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius red f3ba as a stain for connective tissue. Arch Pathol. 1964; 78:69-72.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. Clin Microbiol Rev. 1992; 5(4):400-19.

Toso A, Vial F, Galanti N. Oral transmission of Chagas' disease. Revista Medica De Chile. 2011; 139(2):258-266.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 2001; 31(5-6):472-481.

Valent P, Gleich GJ, Reiter A, Roufosse F, Weller PF, Hellmann A, Metzgeroth G, Leiferman KM, Arock M, Sotlar K, Butterfield JH, Cerny-Reiterer S, Mayerhofer M, Vandenberghe P, Haferlach T, Bochner BS, Gotlib J, Horny HP, Simon HU, Klion AD. Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. Expert Rev Hematol. 2012; 5(2):157-76.

Valente SAS, Vera CV, Pinto AYN. Epidemiologia e transmissão oral da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. Informe de la Consulta Técnica en Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA)/ Organización Panamericana de la Salud, Unidad Regional de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles (DPC/CD/CHA), Grupo Técnico Especializado en Inocuidad de Alimentos (DPC/VP/FOS). Rio de Janeiro. 2006; 21-26.

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1911; 3:276-294.

World Health Organization. [homepage on the internet]. Chagas disease (American trypanosomiasis). [updated 2017 aug 16; cited 2017 sep 20]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> .

World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec. 2015; 90(6):33-44.

World Health Organization. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser; 2002.109p.

World Health Organization. Control of Chagas' disease. World Health Organization Tech. Rep. Ser. 1991; 811:1-91.

World Health Organization. World Health Report, Making health research work for poor people. Tropical Disease Research Progress 2003-2004. 2005: 30-33.

Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. Trends Parasitol. 2011; 27(10):459-66.

Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc. 2006; 78(1):87-111.

Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 Suppl 1:101-7.

Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. J Infect Dis. 1999; 180(2):480-6.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(7):1051-1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012; 12(2):240-53.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. Int J Parasitol. 1998; 28(1):105-112.

# APÊNDICE A - LICENÇA LW16/11



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

## LICENÇA

**LW-16/11**

Certificamos que o protocolo (P-89/10-2), intitulado "ESTUDOS IMUNOPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS ORAL NO MODELO MURINO", sob a responsabilidade de KATIA DA SILVA CALABRESE, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/05/2014 e inclui o uso total de :

***Mus musculus***

- 669 Fêmeas de Swiss Webster, Idade: 4 Semana(s), Peso: 18,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 16 de maio de 2011

**Octavio Augusto França Presgrave**  
Coordenador da CEUA

## APÊNDICE B - LICENÇA LW42/14



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética  
no Uso de Animais

### LICENÇA

LW-42/14

Certificamos que o protocolo (P-21/14.3), intitulado “**INFECÇÃO INTRAGÁSTRICA POR *Trypanosoma cruzi*: aspectos imunopatológicos e moleculares da infecção em camundongos das linhagens A e C57BL/10**”, sob a responsabilidade de **KATIA DA SILVA CALABRESE** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 14/07/2018 e inclui o uso total de:

#### ***Mus musculus***

- 471 fêmeas de A, idade: 4 semanas, peso: 16 gramas.

#### ***Mus musculus***

- 1178 fêmeas de C57BL/10, idade: 4 semanas, peso: 16 gramas.

Rio de Janeiro, 14 de julho de 2014.

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octavio A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

# APÊNDICE C - ARTIGO: ORAL OUTBREAK OF CHAGAS DISEASE IN SANTA CATARINA, BRAZIL: EXPERIMENTAL EVALUATION OF A PATIENT'S STRAIN



## RESEARCH ARTICLE

### Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain

Carolina S. Domingues<sup>1</sup>, Daiana J. Hardoim<sup>1</sup>, Celeste S. F. Souza<sup>1</sup>, Flávia O. Cardoso<sup>1</sup>, Verônica G. Mendes<sup>2</sup>, Henrique Previtali-Silva<sup>1</sup>, Ana L. Abreu-Silva<sup>3</sup>, Marcelo Pelajo-Machado<sup>4</sup>, Sylvio Celso Gonçalves da Costa<sup>1</sup>, Kátia S. Calabrese<sup>1\*</sup>

**1** Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, **2** Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS)/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Negligenciadas/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, **3** Departamento de Patologia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, Maranhão, Brasil, **4** Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

\* [calabrese@ioc.fiocruz.br](mailto:calabrese@ioc.fiocruz.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Domingues CS, Hardoim DJ, Souza CSF, Cardoso FO, Mendes VG, Previtali-Silva H, et al. (2015) Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. PLoS ONE 10(10): e0122566. doi:10.1371/journal.pone.0122566

**Editor:** Mauricio Martins Rodrigues, Federal University of São Paulo, BRAZIL

**Received:** December 12, 2014

**Accepted:** February 22, 2015

**Published:** October 15, 2015

**Copyright:** © 2015 Domingues et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by CAPES Brazil and Oswaldo Cruz Institute. Kátia da Silva Calabrese (CNPq n° 306271/2011-7) and Sylvio Celso Gonçalves da Costa (306130/2011-4) are senior researchers. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Chagas disease is a worldwide public health problem. Although the vectorial transmission of Chagas disease has been controlled in Brazil there are other ways of transmission, such as the ingestion of *T. cruzi* contaminated food, which ensures the continuation of this zoonosis. Here, we demonstrate the influence of the inoculation route on the establishment and development of the SC2005 *T. cruzi* strain infection in mice. Groups of Swiss mice were infected intragastrically (IG) or intraperitoneally (IP) with the *T. cruzi* SC2005 strain derived from an outbreak of oral Chagas disease. The results revealed that 100% of IP infected mice showed parasitemia, while just 36% of IG infected showed the presence of the parasite in blood. The parasitemia peaks were later and less intense in the IG infected mice. Mortality of the IP infected animals was more intense and earlier when compared to the IG infected mice. In the IP infected mice leucopenia occurred in the early infection followed by leucocytosis, correlating positively with the increase of the parasites. However, in the IG infected mice only an increase in monocytes was observed, which was positively correlated with the increase of the parasites. Histopathological analyses revealed a myotropic pattern of the SC2005 strain with the presence of inflammatory infiltrates and parasites in different organs of the animals infected by both routes as well as fibrosis foci and collagen redistribution. The flow cytometric analysis demonstrated a fluctuation of the T lymphocyte population in the blood, spleen and mesenteric lymph nodes of the infected animals. *T. cruzi* DNA associated with the presence of inflammatory infiltrates was detected by PCR in the esophagus, stomach and intestine of all infected mice. These findings are important for the understanding of the pathogenesis of *T. cruzi* infection by both inoculation routes.



## Introduction

Chagas disease affects more than 10 million people around the world, most of who reside in the endemic areas of 21 countries in Central and South Americas [1, 2]. According to Schimunis and Yadon in 2010 [3] Chagas disease is no longer a health problem only of Latin America becoming a worldwide health problem. Although transmission by *T. infestans* has been controlled in endemic countries such as Brazil, Uruguay, Chile, Venezuela and areas of Argentina and Bolivia [4, 5], there are other ways of transmission that guarantee the continuation of this zoonosis. Besides vectorial transmission, parasites may be transmitted by blood transfusion [6], congenitally [7] organ transplantation [8], laboratory accidents [9], and finally, by ingestion of contaminated food [10]. These forms of transmission are currently responsible for the introduction and maintenance of Chagas disease in non-endemic countries such as European countries, Japan, Australia, North America and the continuation of the disease in the endemic countries of Latin America [11].

Effective strategies to control vectorial transmission as well as the interruption of blood and organ transplant transmissions were adopted in several countries where the disease was endemic. Unexpectedly, other routes as oral transmission acquired importance due consumption of *T. cruzi* contaminated food [12].

Worldwide Brazil has the highest incidence of oral transmission. Between 2000 and 2011, 1,252 acute cases of Chagas disease were reported, and of these, 70% were attributed to oral transmission [13]. Several outbreaks of the disease from the consumption of foods and beverages contaminated with *T. cruzi* have emphasized the importance of this transmission route in humans [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21].

Although various studies had evaluated the infectivity and the pathogenicity of intragastric infection is still required to improve understanding of the mechanisms involved in *T. cruzi* oral infection. Therefore, this study aims to shed further light on the pathogenesis and the influence of the inoculation route on the establishment and development of Chagas disease, by studying, in an experimental murine model, the behavior of the SC2005 strain, which was isolated from an outbreak of oral transmission in Santa Catarina, Brazil.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All experiments with animals were performed in strict accordance with the Brazilians guidelines described in the National Council on Ethics in Research, and the protocols were approved by the Institutional Committee for Animal Ethics of FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ), License Number LW16/11.

### Animals

Healthy outbred female Swiss mice, 4–6 weeks old, weighing from 20 to 22g were used. During the experiments, all mice were maintained under controlled temperature, receiving food and water *ad libitum* and were daily monitored each morning and afternoon until the end of the study.

### Parasites

**SC2005 strain of *T. cruzi* trypomastigotes derived from cell culture.** The SC2005 strain of *T. cruzi*, isolated from the peripheral blood of a man in the acute phase of Chagas disease, was used. The patient had acquired the infection orally during an outbreak of the disease in Santa Catarina, Brazil [22]. Epimastigotes of the *T. cruzi* SC2005 strain were maintained

axenically by passages in LIT medium for 30 days, which is the period required for the occurrence of the partial metacyclogenesis forms present in the culture. Bottles of VERO cells, maintained in RPMI medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, were infected with the metacyclic trypomastigotes. Ten days later the trypomastigotes derived from the cell culture (TCC) were obtained by washing the infected bottles and resuspending the trypomastigotes in a final volume necessary for the infection of mice.

**SC2005 *T. cruzi* strain characterization.** The DNA was extracted from *T. cruzi* epimastigotes according to Sambrook *et al.* in 1989 [23]. PCR-multiplex assay was performed using five primers; three representatives of different groups of *T. cruzi* strains (TCI, TCII and TCIII) were used (Table 1).

The reaction conditions and the thermal profiles were standardized and a GeneAmp PCR System 9600 thermocycler (Perkin-Elmer) was used.

The amplification product was evaluated in 2% agarose gel using a molecular weight marker in the range of 100 base pairs.

### Experimental design

Mice were divided into three groups which were subjected to 4 hours of fasting prior to infection. Group 1 (G1): 30 animals inoculated intraperitoneally (IP) with  $10^7$  TCC forms of SC2005 strain of *T. cruzi*, suspended in 0.2ml of RPMI medium; G2: 55 mice inoculated intragastrically (IG) with  $10^7$  TCC forms SC2005 strain of *T. cruzi*, suspended in 0.1ml of RPMI medium; and G3 (control group): 15 normal uninfected animals. The results presented here are representative of two independent experiments.

**Parasitemia.** Five microliters of tail vein blood were put under a 22 X 22mm<sup>2</sup> coverslip and the parasites were counted in 50 microscopic fields. The number of parasites/ml was estimated as described by Pizzi and Prager in 1952 [24]. Ten mice from each group were used for this procedure.

**Mortality.** Ten mice of each group were checked daily always in the morning and the mortality rate was estimated in order to obtain the surviving percentages. The mean time of death of mice was obtained based on Liddell in 1978 [25]. If any of the animals present two of the pre-established symptoms such as piloerection, partial anorexia, 10% of weight loss, vocalization, decreased mobility it was euthanized.

**Blood leukocytes measurement.** At the time of parasitemia evaluation mice were bled from the tail and samples were diluted in Turk's solution (1/20) [26]. The cells were then counted in a hemocytometer. Differential cell counts were made on blood smears after May Grünwald-Giemsa staining by counting 100 leukocytes per slide. Measures were taken and the results are expressed either in terms of absolute numbers of cells or differential cell count.

**Histopathology.** Three animals of each group were randomly chosen and killed in accordance with the protocol approved by the Institutional Committee for Animal Ethics of

**Table 1. PCR-multiplex assay using five primers; were used three representatives of different groups of *T. cruzi* strains (TCI, TCII and TCIII).**

PRIMER	SEQUENCE	Tm °C
Tc1	5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCAT-3'	53
Tc2	5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G-3'	52
Tc3	5'-CCG CGW ACA ACC CCT MAT AAA AAT G-3'	52
Tr	5'-CCT ATT GTG ATC CCC ATC TTC G-3'	50
Exon	5'-TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G-3'	42

doi:10.1371/journal.pone.0122566.t001

FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ), License Number LW16/11 on days 11 and 18 (G1—IP infected) and days 26 and 32 (G2—IG infected) after infection, for organ recovery. The animals were anesthetized with a combination of ketamine 100 mg/kg and xylazine 2% 10mg/kg and killed with an intraperitoneal injection of Tiopental 150mg/kg, according to Brazilian legislation (CONCEA). All collected organs that were removed were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS 0.01M, pH7.45 at 4°C for 48 hours and processed with paraffin embedding for conventional histology. Sections of 5µm thick were stained with hematoxylin eosin, Lennert's Giemsa, Picrosirius red (Direct Red 80, Aldrich Milwaukee, WI 53233, USA) and Weigert's resorcin-fuchsin after oxidation with oxone. The histopathological analyses were performed in a Zeiss Axioplan 2 microscope, applied to a Soft Imaging System (CC-12) camera. The inflammatory infiltrate intensity was evaluated according to Dias *et al.* [27] were 10 or more inflammatory cells per field was considered as inflammatory infiltrate and classified as follows: absent (no presence of inflammatory cells); mild (10–25 cells); moderate (26–50 cells) and intense (>50 cells).

**Spleen and thymus index.** Increases in size and weight of the spleen represent reticuloendothelial stimulation; spleen indexes were calculated after evaluation of the relative spleen weight (spleen weight/mouse weight) on days 11 and 18 (G1) and 26 and 33 (G2) after infection [28]. The same methodology was employed for thymus index.

**PCR analysis.** To detect parasite DNA in the esophagus, stomach and intestine, tissue samples of each organ were processed separately for DNA extraction according to Sambrook *et al.* in 1989 [23], and purified DNA was PCR amplified using *T. cruzi*-specific kDNA minicircle primers 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') and 122 (5'-GGTTGCATTGGGTTGGTGTAAATATA-3') which amplified 330 bp fragments [29].

The reaction conditions and the thermal profile were standardized and a GeneAmp PCR System 9600 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used.

The amplification product was observed in 1.5% agarose gel stained with Nancy-520 (SIGMA) using a molecular weight marker in the range of 100 base pairs.

## Statistical analysis

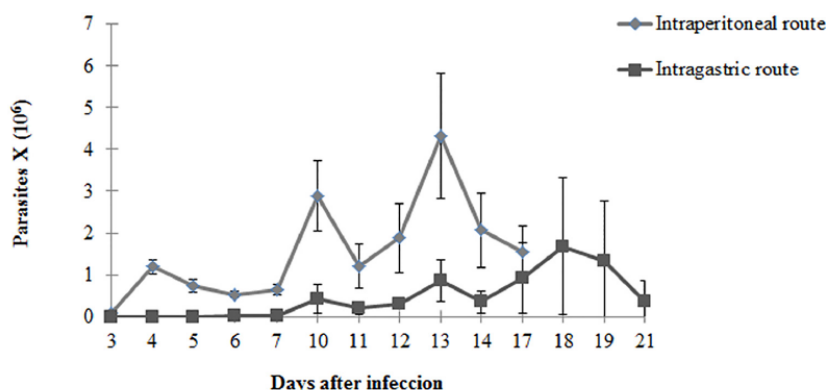
Results are expressed as the mean and standard error of the mean (S.E.M). Significance of total and specific leucometry as well as the spleen and thymic indexes were calculated using parametric ANOVA (one Way Analysis of Variance) and a post test Turkey-Kramer for non-parametric data. 2-Way ANOVA was used for FACs data and GraphPad Prism for mortality evaluation.

## Results

### Parasitemia and mortality

Parasitemia in mice intraperitoneally infected (IP) started early on the 3<sup>rd</sup> day after infection when compared with mice intragastrically infected (IG) which the presence of parasites in the blood was only observed on the 11<sup>th</sup> day post infection. One hundred percent of IP infected mice showed parasitemia, while just 36% of IG infected showed the presence of the parasite in blood. As the aim of this study was to evaluate the influence of the inoculation route on the establishment and development of Chagas disease in an experimental murine model only animals that showed parasitemia were used in this study. Two peaks of parasites were observed in both IP and IG groups; however in the IP infected mice these peaks were earlier on the 10<sup>th</sup> and 13<sup>th</sup> days and higher (2.9 and 4.3 X 10<sup>6</sup> parasites/ml respectively) than those observed in the IG infected animals which presented peaks on the 13<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> days post infection with 0.9 and 1.7 X 10<sup>6</sup> parasites/ml respectively (Fig 1).

Table 2 showed that IP infected animals were the first to die, and at the end of the experiment (on the 33<sup>th</sup> day of infection) 80% of these animals were dead. In the IG group the



**Fig 1. Parasitemia curve.** Parasitemia curve of 4–6 week old female mice Ip or IG infected with 10<sup>7</sup> culture-derived trypomastigotes of *T. cruzi* SC2005 strain.

doi:10.1371/journal.pone.0122566.g001

mortality of animals was in the range of 30%. Mean mortality time of mice varied between 16.13±0.8 in IP and 22.67±2.0 in IG infected mice.

### Kinetics of peripheral leukocyte counts

The peripheral leukocyte cell populations of all groups were analyzed. The kinetics of total leukocyte counts of IP infected mice showed an alternate pattern of leucopenia/leucocytosis. At the beginning of the infection (from 3 up to 7 days) mice showed low amount of leukocytes. However when a parasitemia peak was observed on the 10<sup>th</sup> day post infection, leukocytes reach normal values. From this point, leukocytes values reach high levels except on day 13, when a new peak of parasitemia was observed and leukocytes fell to normal values. Mice intra-gastrically infected showed a leucopenia pattern independent of whether the parasitemia was low or high at the beginning of the infection. However when the number of parasites began to rise on the 17<sup>th</sup> day post infection a pattern of leucocytosis was observed which remained until the end of the experiment (Fig 2A).

### Differential cell counts

The number of monocytes, lymphocytes, neutrophils, eosinophils and basophils was counted in the blood of the Swiss mice. The counts demonstrated an increase of neutrophils, lymphocytes and monocytes and a reduction of the number of eosinophils in all infected mice, independent of the infection route. The animals infected with the SC2005 strain by IP route displayed a significant correlation of the lymphocyte and neutrophil counts with the

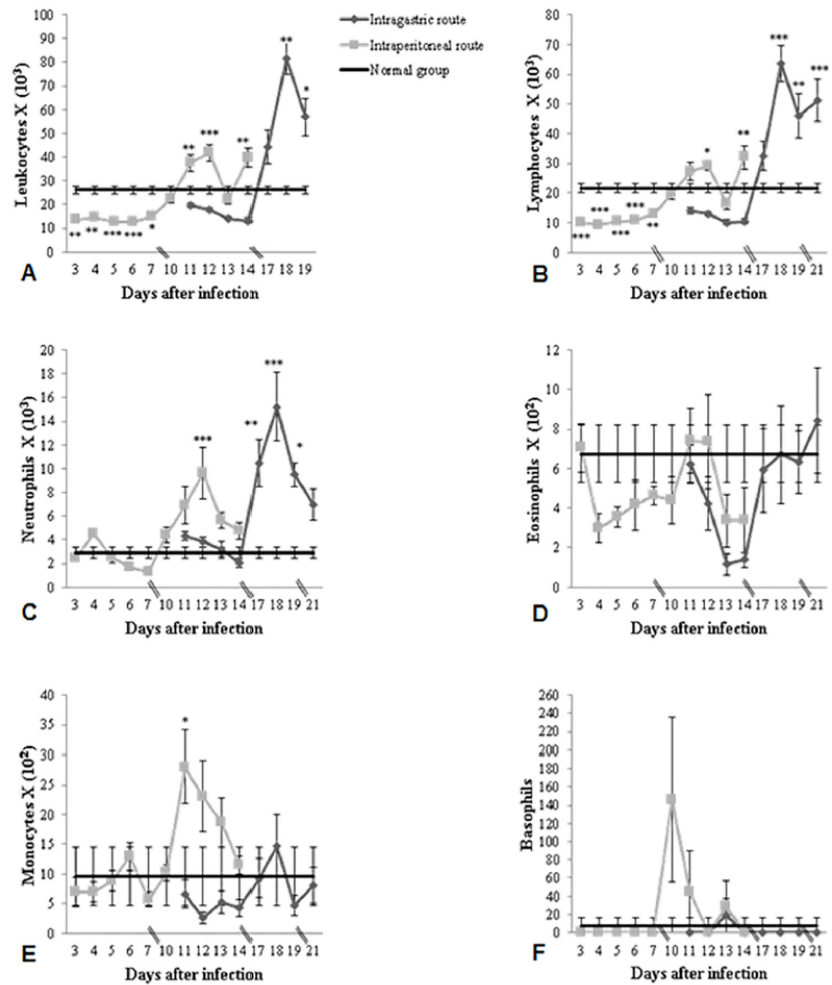
**Table 2. Mortality rates and mean time of death of mice infected with 10<sup>7</sup> *T. cruzi* trypomastigotes SC2005 strain, inoculated IP (intraperitoneally) or IG (intragastrically).**

Groups	Mortality	Mean time of death (days)
IP	(2/10) <sup>a</sup>	16.13±0.8 <sup>b</sup>
IG	(7/10) <sup>a</sup>	22.67±2.0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Number survivors/Nb mice.

<sup>b</sup>Mean of mortality time (MMT±S.E.M.).

doi:10.1371/journal.pone.0122566.t002



**Fig 2. Absolute and specific number of peripheral blood leukocyte counts.** Absolute and specific number of peripheral blood leukocyte counts of IP or IG infected and control mice. Mice were infected with  $10^7$  trypomastigotes of *T. cruzi* SC2005 strain. The value for control mice is expressed by the mean of all counts.

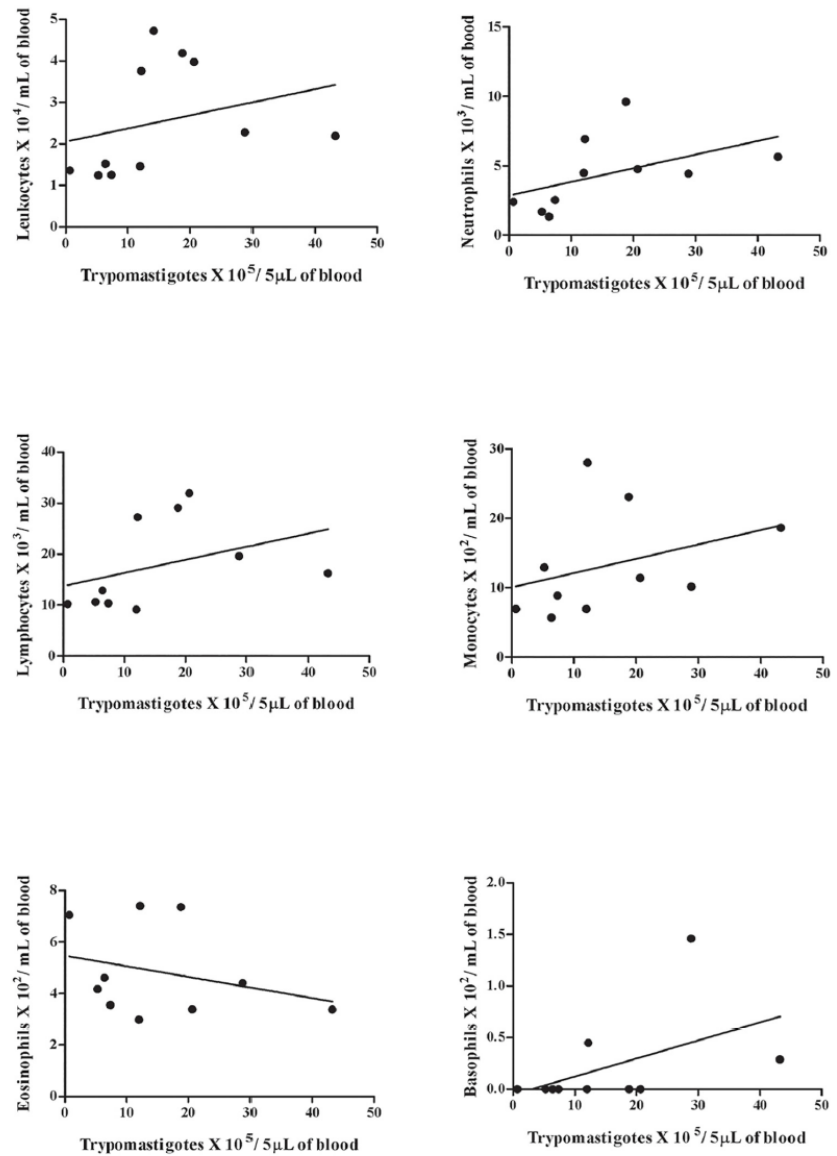
doi:10.1371/journal.pone.0122566.g002

parasitemia. There was a significant reduction in lymphocyte counts until 7 days post-infection (dpi). Lymphocytosis was observed at 12 and 14 dpi. Enhanced neutrophils counts at 12 dpi was also seen in this group. Mice inoculated with the SC2005 strain by the IG route demonstrated that the parasitemia peak (18 dpi) was correlated with the enhanced monocyte counts during the acute phase of infection. No correlation or significant alterations in basophil levels were observed in both groups. (Figs 2B–2E, 3 and 4).

### Spleen and thymus index

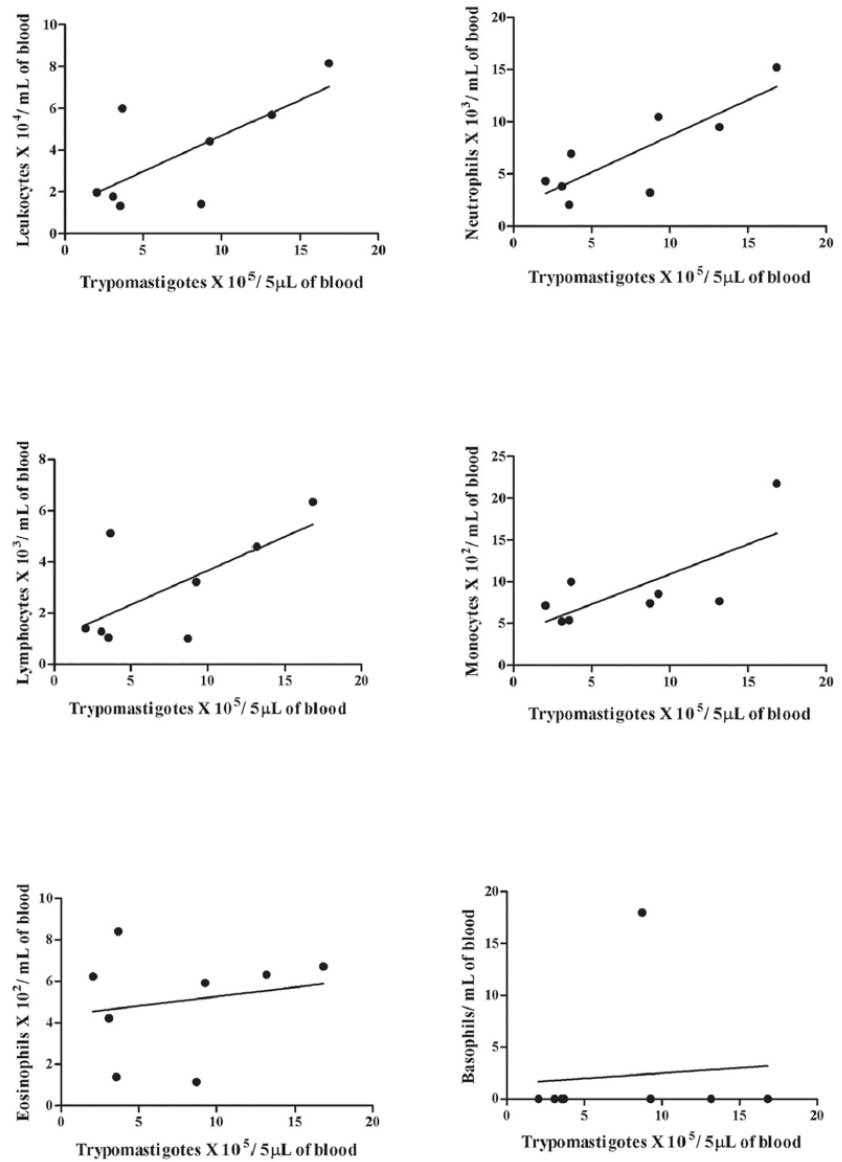
The effect of infection on the spleen and thymus weight was evaluated on days 11 and 18 after infection of the IP infected mice and on days 26 and 33 post infection of the IG infected mice.

The spleen reached more than twice its weight in both of the infected groups when compared to the control group (not-infected mice). When the thymus was evaluated our results showed that the *T. cruzi* infection by the IP route induced a reduction in the thymus index. This reduction was not observed in the IG infected mice thymus. Instead, a slight increase of this organ was observed, regardless of the infection time (Fig 5A and 5B).



**Fig 3. Spearman's test of IP infected mice.** Correlation between parasitemia and total leukocytes (A), neutrophils (B), lymphocytes (C), monocytes (D), eosinophils (E) and basophils (F) in animals IP infected with  $10^7$  trypomastigotes forms of *T. cruzi*, SC2005 strain. The correlation was significant between parasitemia and white blood cell count ( $p = 0.023$ ), neutrophils ( $p = 0.021$ ) and lymphocytes ( $p = 0.042$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0122566.g003

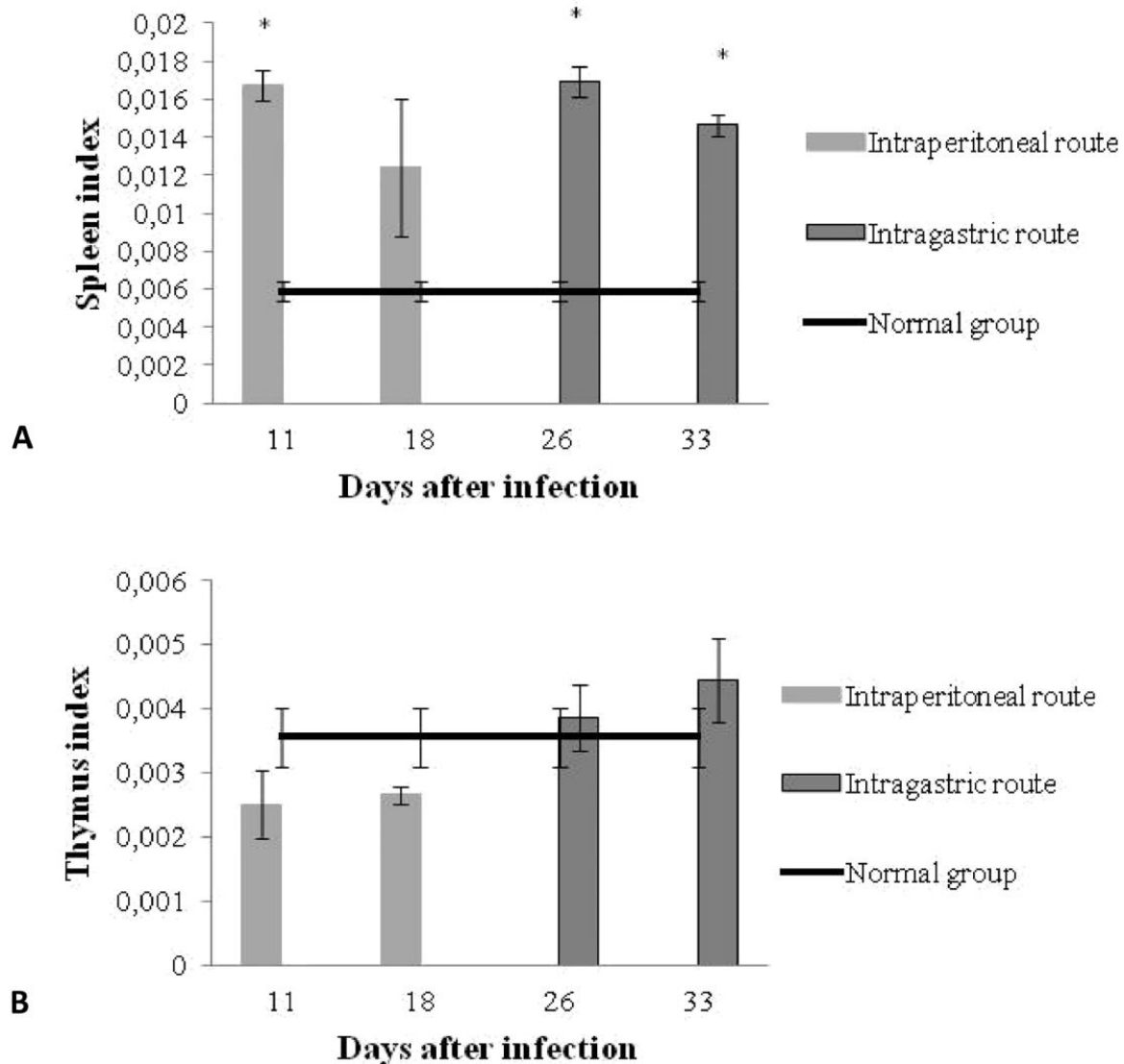


**Fig 4. Spearman's test of IG infected mice.** Correlation between parasitemia and total leukocytes (A), neutrophils (B), lymphocytes (C), monocytes (D), eosinophils (E) and basophils (F) in IG infected animals. A significant correlation was observed between parasitemia and monocyte count ( $p = 0.028$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0122566.g004

### Flow cytometry

The flow cytometric analysis of the spleens from IP infected animals, 11 days after infection, showed a decrease in the number of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and a slight increase of CD4<sup>+</sup>. At 18 days post-infection an increase of 50% in the number of these cells was noted when compared



**Fig 5. Spleen and thymus index.** Spleen (A) and thymus (B) index of mice infected with  $10^7$  trypomastigotes forms of *T. cruzi*, SC2005 strain by the IP or IG routes. The value for control mice is expressed by the mean of all counts.

doi:10.1371/journal.pone.0122566.g005

with non infected control mice. The analysis of the spleen from the IG infected animals, 26 six days post infection, showed approximately the same number of CD4<sup>+</sup> cells observed in the control group. The number of CD8<sup>+</sup> cells was 68% higher than controls and approximately 80% or 40% higher than the IP infected mice depending on the day of infection. Double positive cells of the IG infected mice increased approximately 65% when compared to the control and IP inoculated animals. At 33 days post-infection, IG infected animals showed similar profiles of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells to those observed in animals at 26 days of infection. There was a



**Table 3. Analysis of the T lymphocyte profiles in spleen, blood and lymph node of mice inoculated with the SC2005 strain by IP and IG routes.**

		Lymphocyte subsets			
		CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	
SPLEEN	Normal group		14.97% ± 2%	6.38% ± 1%	0.18% ± 0%
	IP Route	11°	17.22% ± 2%	4.08% ± 0%	0.20% ± 0%
		18°	32.61% ± 0%***	12.43% ± 0%	1.10% ± 0%
	IG Route	26°	12.51% ± 1%	19.51% ± 1%***	3.05% ± 1%
		33°	12.29% ± 0%	20.92% ± 5%***	1.49% ± 0%
	BLOOD	Normal group		29.40% ± 3%	11.43% ± 2%
IP Route		11°	33.62% ± 3%	13.30% ± 5%	3.55% ± 2%
		18°	27.76% ± 0%	19.65% ± 0%	2.40% ± 0%
IG Route		26°	10.38% ± 0%*	44.69% ± 0%***	3.63% ± 0%
		33°	18.92% ± 5%	48.11% ± 9%***	2.70% ± 0%
LYMPH NODE		Normal group		34.39% ± 3%	15.13% ± 2%
	IP Route	11°	25.25% ± 0%**	10.65% ± 1%	0.37% ± 0%
		18°	38.05% ± 0%	15.62% ± 0%	0.97% ± 0%
	IG Route	26°	20.51% ± 4%***	14.01% ± 2%	1.66% ± 1%
		33°	26.45% ± 1%**	15.77% ± 2%	0.62% ± 0%

\*p<0.05

\*\*p<0.01

\*\*\*p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0122566.t003

reduction of double positive cells when compared to 26 days of infection, however, the number of cells was higher than those observed in the control group and in the IP infected animals after 11 days of infection (Table 3).

The evaluation of the mesenteric lymph nodes from the IP infected animals after 11 days of infection showed a reduction in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> when this mice were compared to the controls. No changes in double positive cells were observed at this point. Eight days after infection CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells had values similar to the control animals, although a slight increase of double positive cells was observed. In the IG infected mice there was a reduction (41%) of CD4<sup>+</sup> and maintenance of CD8<sup>+</sup> values after 26 days of infection. The profile of double positive cells was similar to that shown by the control group. At thirty three days of infection a reduction in the number of CD4<sup>+</sup> cells was also observed, but lower than that observed at 26 days for the IG infected mice. The CD8<sup>+</sup> cells showed the same profile observed in the non infected control mice, in the IP infected mice, 18 days post infection and in the IG infected mice. Double positive cells were observed in equal amounts to the control group and to both infected mouse groups (Table 3).

The analysis of the T cells in the blood of the IP infected animals, 11 days after infection, showed no change in the number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells when compared to control group. Double positive cells were shown to be nearly equal to the control group. On day 18 after infection there was no change in the number of CD4<sup>+</sup> cells, however a slight increase of CD8<sup>+</sup> and double positive was observed in the IP infected animals compared to the control. Twenty six days after infection IG infected animals showed a reduction of 62% of CD4<sup>+</sup> and an increase of 75% in the number of CD8<sup>+</sup> cells, and an increase in double-positive cells when compared to control. Thirty three days after infection the number of CD8<sup>+</sup> and double positive cells was equal to that observed at 26 days for the IG infected mice. On the other hand, the amount of CD4<sup>+</sup> T cells was higher in relation at IG infected animals at 26<sup>th</sup> days post infection. There

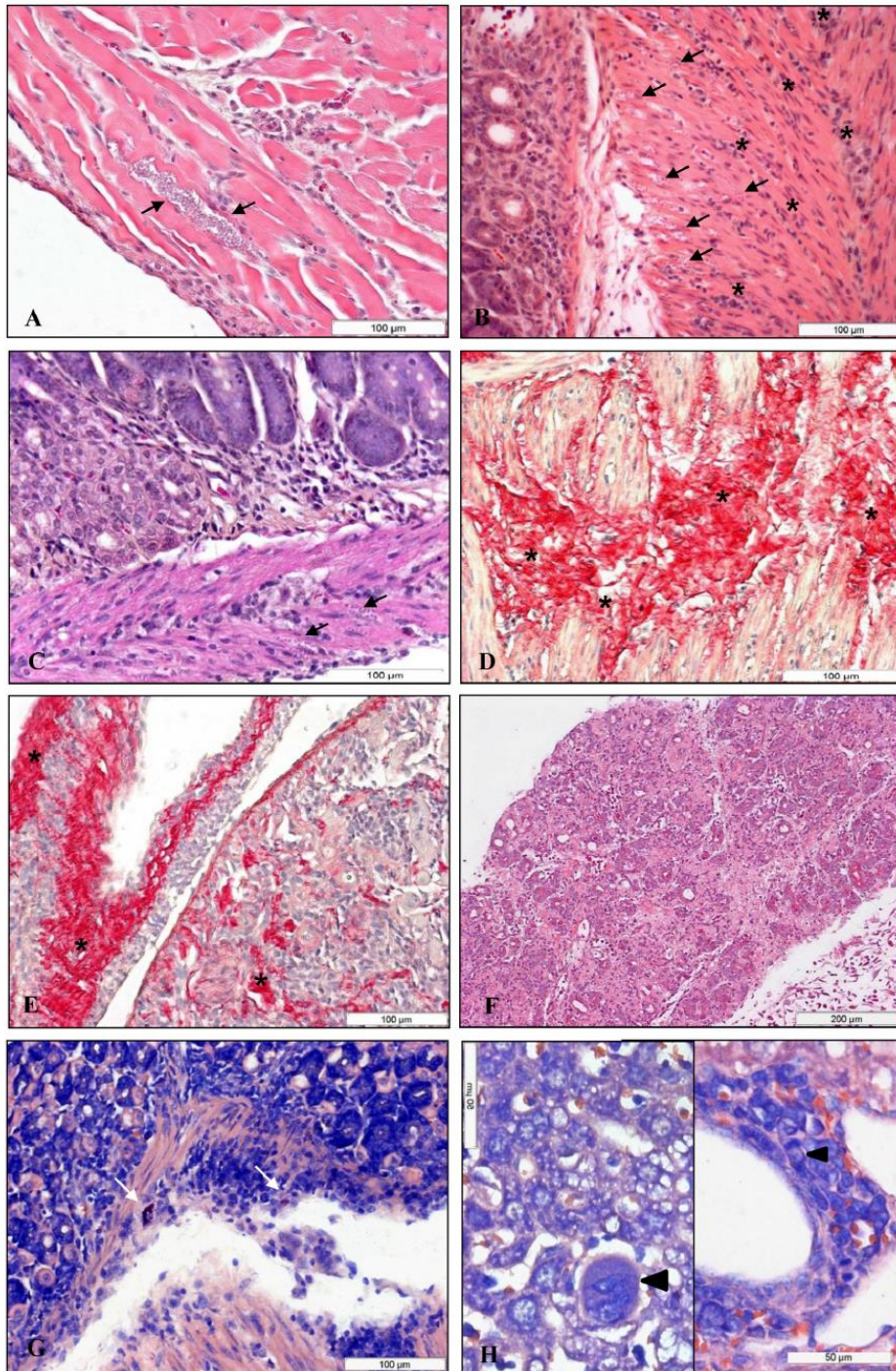
was a reduction in CD4<sup>+</sup> cells of the IG animals at 26 and 33 dpi when compared to the control group (Table 3).

## Histopathology

**Infection with the SC2005 strain given by the intraperitoneal route.** To determine whether IP-given *T. cruzi* infection induced histopathological variations in different organs, three animals were killed on days 11 and 18 post infection and subjected to histopathological analysis. The IP infected animals showed a moderate to intense diffuse inflammatory reaction, exhibiting mainly monocytes and lymphocytes in the esophagus (Fig 6A), stomach (Fig 6B), intestine (Fig 6C), heart, liver, pancreas, adrenal gland, bladder, uterus and adipose tissue. The mucosal and submucosal layers of the different organs rarely demonstrated any mononuclear infiltration, showing normal aspects in most cases. However, in the muscle layer inflammatory infiltrates were frequently observed. Picrosirius staining showed a redistribution and increase of collagen deposits in the inflammatory foci in the esophagus, stomach (Fig 6D), heart (Fig 6E), bladder and uterus. In addition, hyperplasia of the germinal centers of the spleen and lymph nodes was seen. Mast cells were present in the adipose tissue, heart and stomach (Fig 6G). There were amastigotes in the esophagus, stomach, intestine, heart, pancreas and bladder (Fig 6A, 6B and 6C). Omental and mesenteric milky spots were activated with myeloid cells. An intense parasitism was found in the heart ventricles, however a larger number of inflammatory cells were observed in the atria. This study showed pancreatitis with focal necrosis (Fig 6F) and nests of amastigotes in the Langerhans islets. In the liver of the infected mice immature cells, eventual megakaryocytes and dividing cells were observed (Fig 6H). No significant alterations could be seen in elastic system in sections stained with Weigert's resorcin-fuchsin after oxidation with oxone.

**Infection with the SC2005 strain given by the intragastric route.** In order to verify whether IG-given *T. cruzi* infection caused histopathological variations in different organs three animals were killed on day 26 and 33 post infection. Sections of the organs revealed a mild to moderate diffuse mononuclear infiltration, mainly in the muscle layer of the stomach, esophagus and intestine, and in the heart, liver, pancreas, kidney, bladder, uterus, encephalon and adipose tissues (Fig 7A, 7B and 7C). Picrosirius staining showed a redistribution and increase of collagen deposits in the inflammatory foci in the esophagus (Fig 7A), stomach (Fig 7D), intestine (Fig 7E), heart, spleen, liver, pancreas, uterus and adipose tissue. Again, hyperplasia of the germinal centers of the spleen and lymph nodes was seen. Mast cells were present in the adipose tissue, bladder and stomach (Fig 7F). Parasites were scarce in the stomach, heart (Fig 7G), bladder and adipose tissue. Omental and mesenteric milky spots were activated with immature and mature myeloid cells. The lesions became more intense in the atria and ventricles of the heart of mice infected by the IG route, with fewer nests of amastigotes (Fig 7H). Immature cells and megakaryocytes were observed in the liver. No significant alterations could be seen in elastic system in sections stained with Weigert's resorcin-fuchsin after oxidation with oxone.

**PCR.** PCR was performed to detect *T. cruzi* DNA in the esophagus, stomach and intestine of infected mice in all points of necropsy. To check the quality of the PCR reaction, the amplification of an endogenous gene—GAPDH in the three randomly chosen samples was performed (data not shown). The samples tested showed a band corresponding to 171 base pairs, which is related to the fragment amplified for the endogen, demonstrating that the reaction proceeded satisfactorily. The PCR for parasite detection demonstrated that all samples showed a band corresponding to a fragment of 330 base pairs indicating the presence of the *T. cruzi* DNA in the esophagus, stomach and intestine of all infected animals (Fig 8A and 8B).



**Fig 6. Histopathological alterations in the IP infected mice.** Histopathological alterations in the mice infected IP with  $10^7$  *T. cruzi*, SC2005 strain. (A) esophagus; (B) stomach and (C) intestine showing inflammatory cell infiltrate (asterisks) and nests of amastigotes (arrows) in the muscular layer. Hematoxylin and eosin (HE) staining. Redistribution and increase of collagen deposits (asterisks) were seen in the inflammatory foci in the stomach (D); and heart (E), Picrosirius red staining. (F) Pancreatitis with focal necrosis, HE staining. (G) Presence of mast cells (arrows) in stomach, Giemsa staining. (H) Liver showing megakaryocyte (arrow) on the left side and mitotic cells (arrow) on the right side, Giemsa stained.

doi:10.1371/journal.pone.0122566.g006

## Discussion

The transmission of the *T. cruzi* infection depends on several factors such as the stage or number of parasites, the routes of infection and the *T. cruzi* strain [30]. Little is known about the hematological, pathological and parasitological behavior of a strain isolated from the 2005 outbreak of an oral *T. cruzi* infection that occurred in Santa Catarina, Brazil. The findings of the present investigation indicate a similar histopathological pattern to strain TcII.

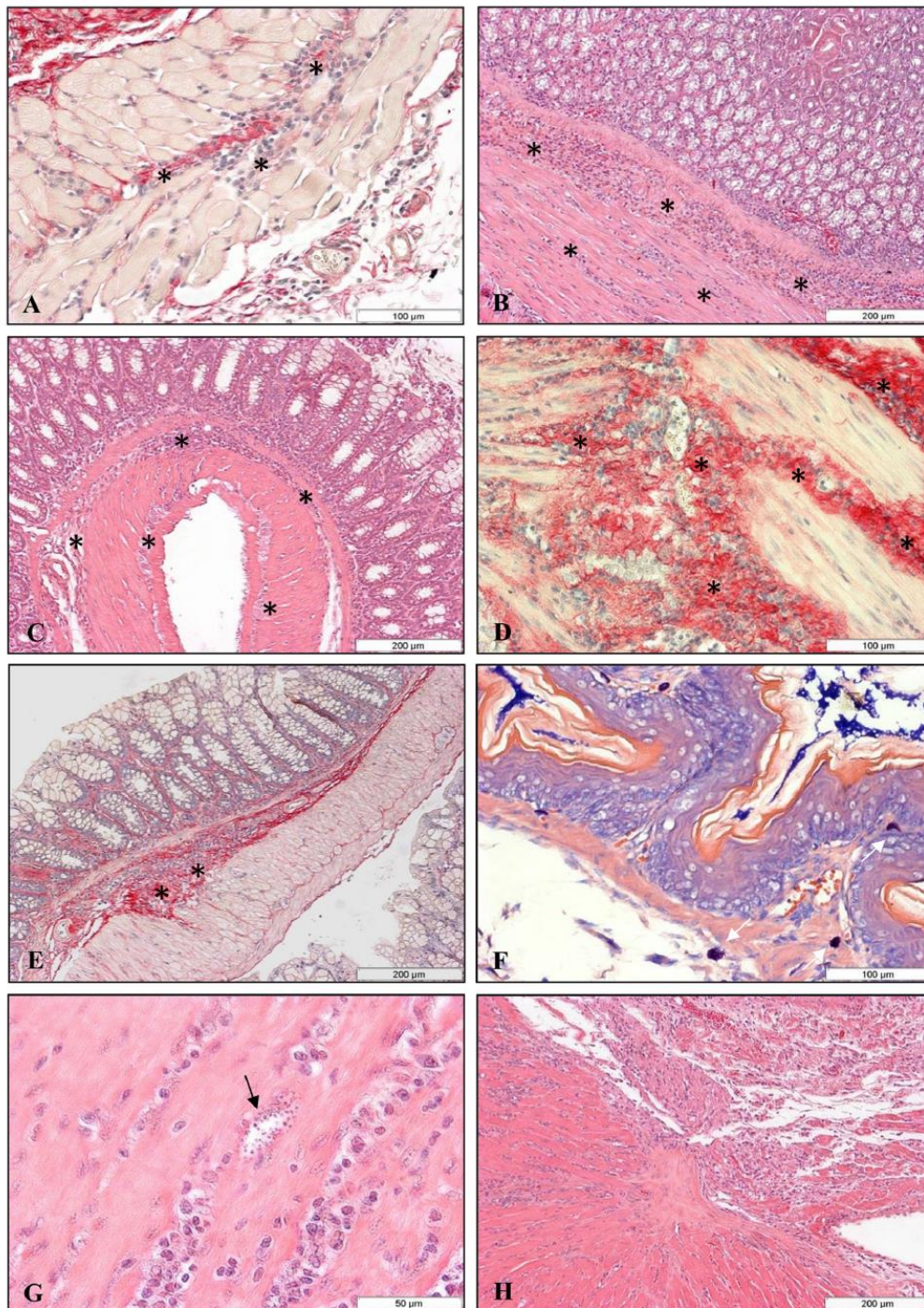
In this study, groups of outbred Swiss mice were infected intragastrically (IG) or intraperitoneally (IP) with cell culture-derived trypomastigotes of strain SC2005 as counterparts of bloodstream parasites. This form exposes on its surface a member of the gp85/trans-sialidase superfamily, Tc85-11, which is related with cell invasion and interaction with host factors. Expression of Tc85-11 on the TCC *T. cruzi* surface is an important condition for the parasite to translocate through the gastric mucin layer, reach the target cells and ascertain their survival within the host [31].

The results of the two different routes of infection studied here indicate a clear difference in parasitemia, mortality and infection rate. Nevertheless, inoculation by both routes produced double peaks of parasitemia in Swiss mice. An early low peak and a late high peak were observed, suggesting a mixed infection. These patterns and characteristics were similar to the TcII profiles of *T. cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission, previously described by Andrade *et al.* in 2011 [32].

Data in the literature have demonstrated that during the parasite infection molecules produced by the immune system of the host and molecules produced by *T. cruzi* may collaborate to produce alterations in blood cell counts [33]. Our findings indicate a positive correlation between parasitemia levels and leukocytes counts. Guedes *et al.* in 2012 [34] and Marcondes *et al.* in 2000 [35] previously reported alterations in blood cell counts associated with parasitemia levels, however different patterns of leucocytosis and leucopenia were seen. This dissimilarity may be explained by the different animals, by their heterogeneous genetic background and by different strains used in the experimental protocols.

The lymphocytosis described is concordant with the polyclonal activation of B and T lymphocytes observed elsewhere. De Meis *et al.* in 2009 [36] reported that this activation leads to increased splenic cellularity. During the *T. cruzi* infective process, we observed an increase in spleen weight without a loss of total body weight and a strong activation of lymphocytes in the germinal center in both IP and IG infected animals.

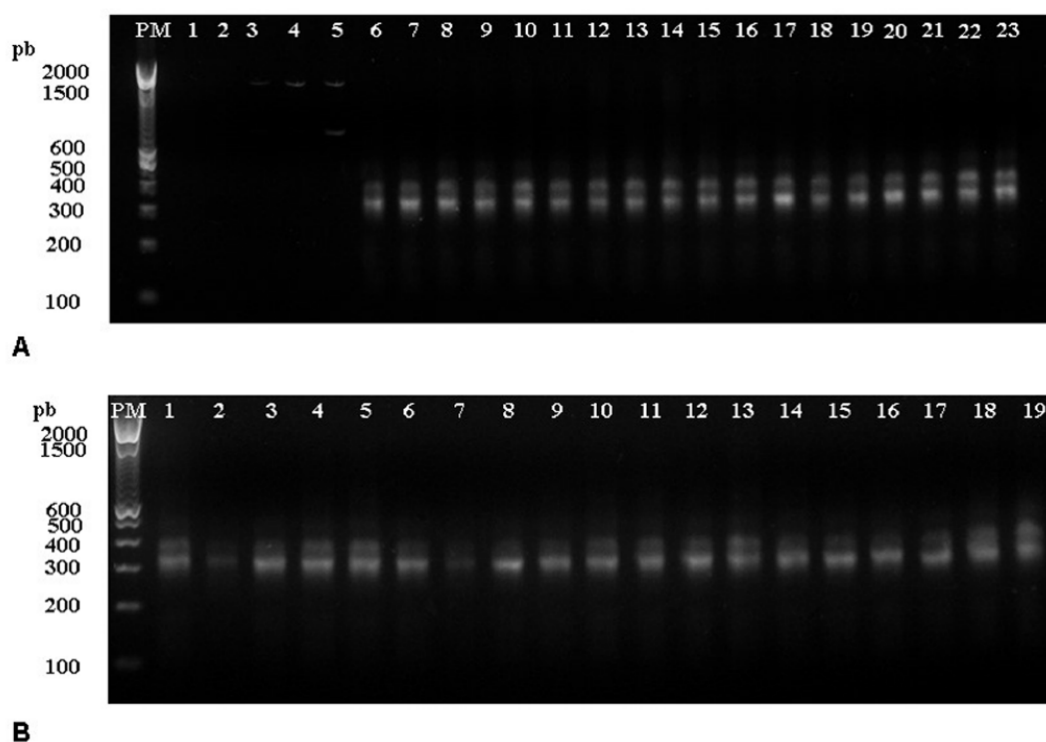
Our histopathological results confirmed the findings of Rassi *et al.* in 2000 [37], Opie *et al.* in 2006 [38] and Castro-Sesquen *et al.* in 2013 [39] which described the presence of apoptosis and necrosis associated to the deposition of collagen in tissue remodeling during the *T. cruzi* infection. In the present study the histopathological analysis showed an intense mononuclear infiltrate mainly located in the muscular layers with neoformation and remodeling collagen fibers in different organs. Amastigotes were also observed in the muscular layers. These histopathological patterns were characteristic of infection with strains belonging to the biotemes type II and III [40]. In this work, we also observed an intense inflammatory lesion in the myocardium. Amastigote nests were present more frequently in the ventricles than in the atria. However, the atria were more severely affected than the ventricles, presenting an intense



**Fig 7. Histopathological alterations in the IG infected mice.** Histopathological alterations in mice infected IG with  $10^7$  *T. cruzi*, SC2005 strain. Inflammatory cell infiltrate in the muscular layer of esophagus (A), Picrosirius red staining; stomach (B) and intestine (C), HE staining. Redistribution and increase of collagen deposits were seen in the inflammatory foci (arrows) in the esophagus (A), stomach (D) and intestine (E), Picrosirius red staining; (F) Presence of mast cells (white arrows) in the stomach, Giemsa staining; (G) Heart showing nests of amastigotes (arrow) and (H) intense inflammatory infiltrate mainly in auricle, HE stained.

doi:10.1371/journal.pone.0122566.g007

inflammatory infiltration with many amastigote nests, 11 days after IP infection and 26 days after IG infection. A more intense inflammatory infiltration was noted 18 and 33 days after infection in IP and IG infected mice, respectively. Increased myocardium destruction at the ventricles, less amastigote nests and more severe mononuclear cell infiltration were also noted. These findings suggest that the severe inflammatory response acts against the parasite, as it first occurred in the auricular tissue, and only reached the ventricular tissue later. It is interesting to note that Quijano-Hernández *et al.* in 2012 [41] observed the same histopathological patterns in infected dogs.



**Fig 8. PCR.** Agarose gels electrophoresis, 2%, showing the single PCR products (330pb) amplified by primers 121 and 122 extracted from different organs. (A) Non-infected animals and IP *T. cruzi* infected mice. Lines 1 and 2: negative control; 3 to 5: non-infected mice (control group) (3- esophagus; 4- stomach; 5- intestine); 6 to 14: IP infected animals 11 dpi (6- esophagus of the mice number 1 -m1; 7- stomach (m1); 8- intestine (m1); 9- esophagus (m2); 10- stomach (m2); 11- intestine (m2); 12- esophagus (m3); 13- stomach (m3); 14- intestine (m3)); 15 to 23: IP infected mice 18 dpi. (15- esophagus (m1); 16- stomach (m1); 17- intestine (m1); 18- esophagus (m2); 19- stomach (m2); 20- intestine (m2); 21- esophagus (m3); 22- stomach (m3); 23- intestine (m3)). (B) IG *T. cruzi* infected mice. Lines 1–9: IG infected mice 26 dpi (1- esophagus (m1); 2- stomach (m1); 3- intestine (m1); 4- esophagus (m2); 5- stomach (m2); 6- intestine (m2); 7- esophagus (m3); 8- stomach (m3); 9- intestine (m3)); 10–18: IG infected mice 33 dpi. (10- esophagus (m1); 11- stomach (m1); 12- intestine (m1); 13- esophagus (m2); 14- stomach (m2); 15- intestine (m2); 16- esophagus (m3); 17- stomach (m3); 18- intestine (m3)); 19- positive control. PM: 100bp DNA marker ladder.

doi:10.1371/journal.pone.0122566.g008

The histopathological analysis showed the presence of immature cells and megakaryocytes in the liver of all infected mice, and this cells types were observed in the lymph node of animals inoculated by the IG route at 33 days after infection. This finding suggests that extramedullary hematopoiesis was occurring in these organs. During the acute phase of *T. cruzi* infection, Marcondes *et al.* in 2000 [35] demonstrated alterations in blood cell counts associated with bone marrow suppression and anemia, which explain the occurrence of extramedullary hematopoiesis.

Inflammatory infiltration was found in many organs, and lymphocytes were the most frequently observed cell type. The fluctuations of the lymphocyte population observed in our study confirmed the results described by Morrot *et al.* in 2012 [42]. During the *T. cruzi* infection, the T-cell dynamic reflects the redistribution of lymphocyte subsets and specific and coordinated responses to the parasite in the lymphoid tissues.

The different approaches in the present study lead us to conclude that the route of infection has a direct effect on the course and the intensity of the disease. It is important to note that the SC2005 strain exhibit a specific pattern of infection that differentiates it from other strains.

### Acknowledgments

This work was supported by CAPES and Oswaldo Cruz Institute. Kátia da Silva Calabrese (CNPq n° 306271/2011-7) and Sylvio Celso Gonçalves da Costa (306130/2011-4) are senior researchers. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors thank Plataforma de Citometria de Fluxo-Análise Multiparamétrica do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ for FACs analysis.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KSC. Performed the experiments: CSD DJH CSFS FOC VGM HPS KSC. Analyzed the data: CSD ALAS MPM SCGC KSC. Contributed reagents/materials/analysis tools: KSC MPM. Wrote the paper: CSD KSC.

### References

1. Pan American Health Organization (PAHO) (2006) Quantitative estimation of Chagas disease in the Americas. Montevideo. OPAS/HDM/CD/425-06.
2. Pan American Health Organization (PAHO). Available: [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2382&Itemid=3921&lang=fr](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2382&Itemid=3921&lang=fr). Accessed 20 March 2014.
3. Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 115(1–2): 14–21. doi: [10.1016/j.actatropica.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003) PMID: [19932071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19932071/)
4. Silveira AC (2002) O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991–2001. In: Silveira AC, editor. *O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991–2001*. Brasília: Pan-americana da Saúde. pp. 15–43.
5. Pan American Health Organization (PAHO) (1992) Documento sobre a Iniciativa do Cone Sul. Washington DC. OPAS. PNSP/92-18.
6. Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM (2011) Control of transfusional transmission. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 64–67. PMID: [21584359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21584359/)
7. Alkmim-Oliveira SM, Costa-Martins AG, Kappel HB, Correia D, Ramirez LE, Lages-Silva E (2013) *Trypanosoma cruzi* experimental congenital transmission associated with TcV and TcI subpatent maternal parasitemia. *Parasitol Research* 112(2): 671–678.
8. Márquez E, Crespo M, Mir M, Pérez-Sáez MJ, Quintana S, Barbosa F, et al. (2013) Chagas' disease and kidney donation. *Nefrologia* 33(1): 128–33. doi: [10.3265/Nefrologia.pre2012.Sep.11636](https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2012.Sep.11636) PMID: [23364636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23364636/)
9. Dias JC (2006) Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(4): 370–375. PMID: [17119753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17119753/)

10. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB (2012) Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* 54(6): 845–852. doi: [10.1093/cid/cir956](https://doi.org/10.1093/cid/cir956) PMID: [22238161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22238161/)
11. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N (2011) Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin Microbiol Rev* 24(3): 592–630. doi: [10.1128/CMR.00063-10](https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10) PMID: [21734249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21734249/)
12. Toso A, Vial F, Galanti N (2011) Oral transmission of Chagas' disease. *Rev Med Chile* 139(2): 258–266. PMID: [21773665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21773665/)
13. Ministry of Health (Brasil). Available: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454). Accessed 10 January 2014.
14. Bastos CJC, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, et al. (2010) Clinical Outcomes of Thirteen Patients with Acute Chagas Disease Acquired through Oral Transmission from Two Urban Outbreaks in Northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 4(6): e711. doi: [10.1371/journal.pntd.0000711](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000711) PMID: [20559542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20559542/)
15. Cavalcanti LPG, Rolim DB, Neto RJP, Vilar DCLF, Nogueira JOL, Pompeu MML, et al. (2009) Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. *Cadernos Saúde Coletiva* 17(4): 911–921.
16. Valente SAS, Pimentel PS, Valente VC, Pinto AYN, Souza GCR, Carvalho LS. (2001) Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém, primeiro registro no oeste do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop* 34(1): 19–20.
17. Valente SAS, Valente VC, César MJB, Santos MP (1997) Registro de 15 casos autóctones de doença de Chagas no Estado do Amapá com evidências de transmissão oral. XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 53.
18. Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Cuedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. (1991) Possible Oral-Transmission of Acute Chagas-Disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop* 33(5): 351–357.
19. Shikanai-Yasuda MA (1987) Surto epidêmico de doença de Chagas aguda em Catolô do Rocha, Paraíba. *Rev Soc Bras Med Trop* 20(2): M-14-M-15.
20. Miles MA (1972) *Trypanosoma cruzi*—Milk Transmission of Infection and Immunity from mother to young. *Parasitol* 65(1): 1–9.
21. Nery-Guimarães F, Da Silva NN, Clause DT, Mello AL, Rapone T, Snell T, et al. (1968) Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teotônia (Estrêla-Rio Grande do Sul). *O Hospital* 73(6): 73–110.
22. Silva CV, Luquetti AO, Rassi A, Mortara RA (2006) Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Microbes Infect* 8: 2120–2129. PMID: [16793313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16793313/)
23. Sambrook J, Fritsch WF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
24. Pizzi T, Prager R (1952) Estabilizacion de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por passage seriado en ratones de constitucion genetica uniforme: analisis cuantitativo del curso de la infection. *Biologica* 16(17): 3–12.
25. Liddell FD (1978) Evaluation of survival in challenge experiments. *Microbiol Rev* 42(1): 237–249. PMID: [752766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/752766/)
26. Langeron M (1949) *Précis de microscopie*. In: Masson. Paris, Paris.
27. Dias GB, Gruendling AP, Araújo SM, Gomes ML, Toledo MJ (2013) Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *PLoS One* 8(3): e51117. doi: [10.1371/journal.pone.0051117](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051117) PMID: [23533117](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23533117/)
28. Lagrange PH, Mackaness GB (1975) A stable form of delayed type hypersensitivity. *J Exp Med* 141: 82. PMID: [1090700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1090700/)
29. Carvalho CME, Andrade MCR, Xavier SS, Mangia RHR, Britto CC, Jansen AM, et al. (2003) Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography, and radiology. *Am J Trop Med Hyg* 68: 683–691. PMID: [12887027](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12887027/)
30. Souza W (1999) O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: Brenner Z., Andrade Z. A., and Barral-Neto M., Editors. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 126–188.
31. Cortez C, Yoshida N, Bahia D, Sobreira TJ (2012) Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. *PLoS One* 7(7): e42153. doi: [10.1371/journal.pone.0042153](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042153) PMID: [22860068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22860068/)
32. Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, Almeida MC, et al. (2011) Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its



- correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(8): 948–956. PMID: [22241116](#)
33. Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS, Campetella O (2005) The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immunol* 73(1): 201–207.
  34. Guedes PM, Veloso VM, Mineo TW, Santiago-Silva J, Crepalde G, Caldas IS, et al. (2012) Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Parasitol Vet* 21(2): 151–156. PMID: [22832757](#)
  35. Marcondes MC, Borelli P, Yoshida N, Russo M (2000) Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect* 2(4): 347–52. PMID: [10817635](#)
  36. De Meis J, Morrot A, Farias-De-Oliveira DA, Villa-Verde DMS, Savino W (2009) Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 3(7): e417. doi: [10.1371/journal.pntd.0000417](#) PMID: [19582140](#)
  37. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC (2000) Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23: 883–889. PMID: [11129673](#)
  38. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA (2006) Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 367(9507): 356–367. PMID: [16443044](#)
  39. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Paico H, Yauri V, Angulo N, Ccopa F, et al. (2013) Cell Death and Serum Markers of Collagen Metabolism during Cardiac Remodeling in *Cavia porcellus* Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 7(2): e1996. doi: [10.1371/journal.pntd.0001996](#) PMID: [23409197](#)
  40. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Gen Evol* 12(2): 240–253.
  41. Quijano-Hernández IA, Castro-Barcena A, Aparicio-Burgos E, Barbosa-Mireles MA, Cruz-Chan JV, Vázquez-Chagoyán JC, et al. (2012) Evaluation of clinical and immunopathological features of different infective doses of *Trypanosoma cruzi* in dogs during the acute phase. *Scientific World Journal* 2012: 635169. doi: [10.1100/2012/635169](#) PMID: [22547991](#)
  42. Morrot A, Barreto de Albuquerque J, Berbert LR, de Carvalho Pinto CE, de Meis J, Savino W (2012) Dynamics of lymphocyte populations during *Trypanosoma cruzi* Infection: From thymocyte depletion to differential cell expansion/contraction in peripheral lymphoid organs. *J Trop Med* 2012: 747185. doi: [10.1155/2012/747185](#) PMID: [22505943](#)