

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

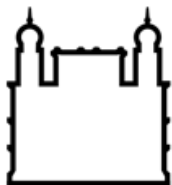
**DINA DE JESUS MARINHEIRO ANTUNES**

# **IL-6 promove alterações hemostáticas durante a fase aguda da doença de Chagas**

**Orientadora:** Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Meis

**RIO DE JANEIRO**

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**DINA DE JESUS MARINHEIRO ANTUNES**

**IL-6 promove alterações hemostáticas durante a fase aguda da  
doença de Chagas**

**Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutora em Biologia Celular e Molecular**

**Orientadora:** Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Meis

**RIO DE JANEIRO**

2019

Antunes, Dina de Jesus Marinheiro.

IL-6 promove alterações hemostáticas durante a fase aguda da doença de Chagas / Dina de Jesus Marinheiro Antunes. - Rio de Janeiro, 2019.  
xvii, 64f. f.; il.

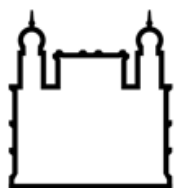
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Juliana de Meis.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Doença de Chagas. 2. Transmissão oral. 3. Citocinas. 4. Plaquetas. 5. Coagulação. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

### **DINA DE JESUS MARINHEIRO ANTUNES**

#### **IL-6 promove alterações hemostáticas durante a fase aguda da doença de Chagas**

**ORIENTADORA:** Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Meis

**Aprovada em:** 04/04/2019

#### **EXAMINADORES:**

**Prof.<sup>a</sup> Dra.** Patricia Torres Bozza, Fundação Oswaldo Cruz/RJ (Presidente)

**Prof.<sup>a</sup> Dra.** Vivian Rumjanek, Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Prof.<sup>a</sup> Dra.** Russolina Zingali, Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Prof. Dr.** Otacilio da Cruz Moreira, Fundação Oswaldo Cruz/RJ (Suplente)

**Prof. Dr.** Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto, Fundação Oswaldo Cruz/RJ

(Revisor e suplente)

Rio de Janeiro, 4 de abril de 2019

## AGRADECIMENTOS

Se no Mestrado aprendi a etiologia de “Obrigado”, no Doutorado pretendo adicionar ao meu ínfimo conhecimento desta disciplina “Gratidão”.

Gratidão. Do latim *gratus*, traduz-se para a nossa língua como “agradável”. Significa reconhecer, agradável e emotivamente, tudo o que se recebe. E tenho tanto para reconhecer agradavelmente por estes 4 anos.

Em primeiro lugar, gostaria de mostrar a minha mais profunda gratidão à Dra. Juliana de Meis, minha estimada orientadora e amiga, pela oportunidade e acolhimento no grupo de Chagas do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (LPT). Bem haja pela supervisão, estímulo, calma nas (inúmeras) horas de ansiedade, disponibilidade para discussão de resultados a qualquer momento, questioná-los e fazer-me sempre ir mais além. Formou-me para ser pesquisadora, mas também pensadora, questionadora e bom ser Humano, sem dúvida mais madura e consciente. Considero-me uma pessoa de muita sorte. Além de uma excelente orientadora, tive um magnífico coorientador, Dr. Robson Monteiro, chefe do Laboratório de Trombose e Câncer. Obrigada pela contribuição e orientação desde a concepção do projeto, pelo encorajamento na prossecução de um tema totalmente novo para mim e para os chagólogos no geral, pelo apoio bibliográfico, enfim... pelo seu apoio incondicional. O ambiente do LPT, chefiado pelo Dr. Vinícius Cotta-de-Almeida, não poderia ser mais estimulante, graças a todos os pesquisadores, Dr. Wilson Savino, Dr. Désio Aurélio de Oliveira e Dra. Dea Villa-Verde (a quem agradeço de forma especial pela preciosa contribuição neste trabalho e no grupo dos Chagólogos), Dra. Adriana Bonomo, Dra. Daniella Areas, Dr. Dumith Chequer, Dr. Ingo Riederer, Dr. Rafael Resende, Dr. Rudimar Frozza, que com o seu conhecimento subsidiaram este trabalho e construíram um laboratório sólido, de referência e com uma energia tão boa. A eles o meu mais sincero agradecimento. Aos meus amigos doutorandos, mestrandos ou ICs chagólogos do LPT, Alessandro Marins dos Santos, Bárbara Mascarenhas, Carmem Oliveira, Danielle Santos, Eliza Tavares, Guilherme Diaz, Juliana Barreto, Luiz Berbert, Mariana Tavares, Rejane Sheila, Renan Novaes, Valéria Santos pela camaradagem e partilha consentindo, desse modo, uma jornada menos árdua. Obrigada pelos dias de trabalhos intensos, cansativos, mas tão prazerosos ao vosso lado e inúmeros momentos leves e felizes que passamos juntos. Um agradecimento em especial ao Alessandro Marins por ter partilhado tanto a bancada comigo e por estar sempre disposto a ouvir os meus inúmeros desabafos, pelo apoio, amizade verdadeira e aventuras e à Rejane e

Joaninha pela amizade sólida que construímos. Aos meus colegas do LPT: “Bonomianos”: Ana Carolina, Barbara, Romulo, Felipe, Marina e Pedro; “Dani”: Carolina, Elizabeth, Julia e Luciana; “Dumithianos”: Andres, Barbara, Bruno, Igor, Jairo, Luis e Rhaissa; “Inguetes”: Aline, Camila, Cássia, Mariela, Rafaela e Samuel; “Cottas”: Arnon, Beatriz, Camilinha, Carlos Araujo (as saudades são muitas!), João Ortigão, Larissa e Lia. À maravilhosa equipe técnica Elaine, Raquel e Valmir pelo suporte e apoio fundamentais. Às queridas Lucilene, Verônica e Dona Vera, pelas histórias de vida, de luta e sagacidade e pelos ensinamentos, sinto-me honrada pela vossa confiança e amizade. Aos amigos que fiz noutros laboratórios, em especial às queridas Adriana Soprano e Marina Salles e aos que me acompanharam e apoiaram quando entrei na Fiocruz, Isabela Resende, Gláucia Vilar, Leonardo Ruivo, Rafael Silva e Verónica Schmitz.

A gratidão que tenho por todos vós jamais será “afundada” por qualquer oceano que exista entre nós.

Bem haja ao Dr. Ernesto de Meis (*in memoriam*) por ter concebido o primeiro estudo hematológico com pacientes agudos do Pará e ter dado origem a este projeto envolvente; ao Dr. Igor Lima e Romulo Galvani pela manifesta disponibilidade no ensino de estatística; à Dra. Daniella Mizurini pela amabilidade de me ensinar os ensaios de avaliação da hemostasia; à Dra Angela Junqueira, Dr. Carlos José, Cristina e Zezé pelo suporte e apoio durante os nossos experimentos no LDP; ao Dr. Marcelo Pelajo, Dra. Jackline Ayres, Dr. Fernando Genta, Dra. Daniele Castro e Dr. Otacilio Moreira que através dos projetos de colaboração com o nosso grupo, contribuíram enormemente para a minha formação acadêmica; aos professores e Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PGBCM), coordenado pela Dra. Leila de Mendonça Lima, pelos ensinamentos ao longo do curso e oportunidade de realizar este trabalho; à Julimar, pela disponibilidade, simpatia e gentileza; à Dra. Joseli Lannes Vieira, responsável pelo meu ingresso na PGBCM; à Dra. Patricia Bozza, Dra. Vivian Rumjanek, Dra. Russolina Zingali, Dr. Rubem Menna-Barreto e Dr. Otacilio Moreira, por aceitarem constituir a banca examinadora deste trabalho; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de doutorado.

Ao ICTB, particularmente à subunidade de Análises Clínicas de Animais de Laboratório, pelo suporte técnico nas análises hematológicas e bioquímicas; aos funcionários do biotério, sempre tão atenciosos e prestativos.

Em especial, agradeço aos animais utilizados no projeto. A finalidade deste trabalho é que todo o aprendizado obtido com o modelo experimental contribua para o entendimento da patogênese da doença de Chagas e se reverta em benefícios para os portadores desta enfermidade.

Aos meus amigos de infância e de vida, de “aroma” a casa, Andreia Sobreiro, Ana Raquel Silva, Carina Fernandes, Diana, Filipa Nascimento, Joana Fernandes, Lurdes Silva, Maria Raquel Moita, Miriam Iracema, Sílvia Lopes, Sónia Rodrigues e Xinanda pela amizade, companheirismo e tantos momentos inesquecíveis; à minha prima Inês por todo o carinho e apoio incansável; a todos muito obrigada pelos telefonemas, whatsapps que alegraram os meus dias e me fizeram sentir tão presente, por não deixarem a nossa amizade esmorecer, mesmo com mais de 7700 km de distância... aos meus afilhados, Gonçalo, Francisco, Marta e Joana pela alegria e leveza que só as crianças são capazes de dar...

Aos meus Pais, a quem devo a vida, carácter e disciplina ao trabalho, por ter chegado até aqui, por me terem ensinado a gostar de aprender; por todo o esforço, dedicação e horas de trabalho para que não nos faltasse nada, nunca; pelas infinitas palavras de incentivo e confiança em mim; aos meus Irmãos e cunhados amados pelo apoio imensurável, por serem o meu abrigo e porto seguro, sempre. Não há dia que não agradeça ter nascido no seio desta família e ter os meus Irmãos como melhores amigos; à luz dos meus olhos, a minha adorada sobrinha Matilde que, sem saber, me ajudou tanto nos momentos difíceis e o seu sorriso foi o suficiente para me encorajar. Peço perdão pela privação do convívio familiar de dias, semanas, meses e anos. O vosso apoio foi fundamental para que, muitas vezes, renovasse as minhas forças para o compromisso que me propus com excelência, como vocês me ensinaram.

Ao meu companheiro de vida e noivo, Gustavo Massena, pelo apoio incondicional, pelo privilégio de caminharmos juntos nas situações diversas e adversas, pelo amor que sinto sempre a transbordar e me fazer tão feliz. Aos seus pais, Christiana e André, pelo carinho, incentivo e apoio fundamentais nesta jornada, por me tratarem como uma filha.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Gratidão, Gratidão, Gratidão.

“Porém, qualquer um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na sua vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias por violência se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A jangada de pedra)



## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença de Chagas.....	1
1.1.1. Epidemiologia e tratamento .....	1
1.1.2. Agente etiológico e seu ciclo biológico .....	2
1.1.3. Vias de transmissão .....	4
1.1.4. Aspectos clínicos e patogênese .....	8
1.2. Aspectos gerais sobre hemostasia.....	11
1.2.1. Hemostasia primária.....	12
1.2.2. Hemostasia secundária .....	14
1.2.3. Reguladores fisiológicos da coagulação.....	19
1.2.4. Fibrinólise .....	20
1.3. "Cross-talk" entre inflamação e coagulação .....	22
1.4. Distúrbios hemostáticos em doenças infecciosas .....	24
1.5. Alterações hematológicas descritas em doença de Chagas.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo geral .....	29
3.2. Objetivos específicos .....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1. Animais e infecção .....	30
4.2. Parasitemia e sobrevivência.....	30
4.3. "Cytometric bead array" (CBA).....	31
4.4. Hemogramas e análises bioquímicas.....	31
4.5. Quantificação dos fatores de coagulação .....	31
4.6. Tempos de coagulação aPTT e PT.....	32
4.7. Ensaio de sangramento da cauda.....	32
4.8. Tratamento <i>in vivo</i> com anticorpos contra IL-6R e TNF .....	32
4.9. Análise estatística .....	33
5. RESULTADOS .....	34

5.1. A produção de citocinas pró-inflamatórias ocorreu concomitantemente ao aumento da parasitemia após a infecção oral.....	34
5.2. A infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> causa trombocitopenia e aumento de sangramento nos camundongos.....	36
5.3. Camundongos OI apresentam sinais de coagulação intravascular disseminada.....	39
5.4. A citocina IL-6 é responsável pelas alterações hematológicas durante a infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> .....	42
5.5. A infecção pela via subcutânea também causa alterações hemostáticas....	45
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. ANEXO.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estimativa global dos portadores da doença de Chagas baseada em dados oficiais (2006-2010).....	2
Figura 1.2 Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> no triatomíneo e no mamífero.....	3
Figura 1.3 Vias de transmissão da doença de Chagas.....	4
Figura 1.4 Casos confirmados de doença de Chagas aguda.....	7
Figura 1.5 Parasitemia, análise de citocinas e tecidos alvo durante a fase aguda da infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> .....	11
Figura 1.6 Plaquetas humanas observadas em microscopia eletrônica de varredura.....	13
Figura 1.7 Esquema simplificado de etapas da hemostasia primária.....	14
Figura 1.8 Cascata de coagulação modelo de ativação em superfícies celulares..	16
Figura 1.9 Modelo clássico da cascata de coagulação. ....	18
Figura 1.10 Mecanismo de coagulação medido laboratorialmente através dos tempos de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e de protrombina (PT).....	19
Figura 1.11 Esquema simplificado do sistema fibrinolítico e seus intervenientes. ....	21
Figura 5.1 Curva de parasitemia durante a fase aguda da infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> .....	34
Figura 5.2 Quantificação de citocinas durante a fase aguda da infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> .....	35
Figura 5.3 Ensaio de sangramento da cauda efetuado aos animais NI e OI 7, 14, 21 e 28 dpi.....	37
Figura 5.4 Quantificação de parâmetros bioquímicos relacionados a dano hepático.....	38
Figura 5.5 Quantificação de aPTT e PT após infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> .....	39
Figura 5.6 Alterações nas concentrações séricas dos fatores de coagulação durante a fase aguda da infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> .....	41
Figura 5.7 Tratamento com anticorpo contra TNF e alterações hematológicas..	43
Figura 5.8 Tratamento com anticorpo contra IL-6R e alterações hematológicas..	44
Figura 5.9 Ensaio hemostáticos após infecção subcutânea pelo <i>T. cruzi</i> .....	46
Figura 6.1 Infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> resulta em anormalidades hematológicas ligadas a uma inflamação sistêmica.....	52

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1 Hemogramas dos animais não infectados (NI) e infectados pelo *T. cruzi* oralmente (OI) aos 7, 14, 21 e 28 dpi .....36

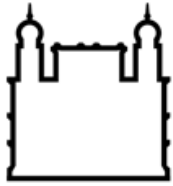
Tabela 5.2 Quantificação do produto de degradação da fibrina D-dímero no soro durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi*. .....42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha_2$ -AP	$\alpha_2$ -antiplasmina
Ag	Antígeno
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
APC	Proteína C ativada, do inglês “activated protein C”
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Anti-trombina
aPTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada, do inglês “activated partial thromboplastin time”
CBA	Do inglês “cytometric bead array”
CCC	Cardiopatia chagásica crônica
CCL	Quimiocina ligante do motivo C-C, do inglês “Chemokine (C-C motif) ligand”
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
COX-1	Cicloxigenase-1
DC	Doença de Chagas
DIC	Coagulação intravascular disseminada, do inglês “disseminated intravascular coagulation”
dpi	Dias após infecção, do inglês “days post infection”
DTU	Unidades discretas de tipagem, do inglês “discrete typing units”
ECM	Matriz extracelular, do inglês “extracellular matrix”
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
F <sub>1+2</sub>	Fragmento 1+2 da protrombina
FDP	Produtos de degradação da fibrina
FV	Fator V
FVII	Fator VII
FVIII	Fator VIII
FIX	Fator IX
FX	Fator X

FXI	Fator XI
FXII	Fator XII
FXIII	Fator XIII
GP	Glicoproteína
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês “human immunodeficiency virus”
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1, do inglês “intercellular adhesion molecule 1”
IG	Infecção intragástrica
IP	Infecção intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida , do inglês “induced nitric oxide synthase”
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
K2EDTA	Ácido etilendinitrilo tetraacético sal dipotássico, do inglês “dipotassium ethylenediamine tetraacetic acid”
Ln	Logaritmo natural
LPS	Lipopolissacarídeo
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês “messenger ribonucleic acid”
MIF	Fator inibitório de migração de macrófagos, do inglês “Macrophage migration inhibitory fator”
MS	Ministério da Saúde
OI	Infecção oral, do inglês “orally infected”
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio (Tipo 1), do inglês “plasminogen activator inhibitor-1”
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico, do inglês “peripheral blood mononuclear cell”
Poli P	Polifosfatos
PT	Tempo de protrombina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, do inglês “quantitative polymerase chain reaction”

RPMI	Meio de cultura, do inglês “Roswell Park Memorial Institute medium”
SC	Infecção subcutânea
sE-selectina	Forma solúvel da molécula E-selectina
SFB	Soro Fetal Bovino
sICAM-1	Forma solúvel de molécula de adesão intercelular-1, do inglês “soluble intercellular adhesion molecule 1”
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação para Doença de Chagas Aguda
sVCAM-1	Forma solúvel de molécula de adesão vascular-1, do inglês “soluble vascular cell adhesion molecule 1”
TAFI	Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina do inglês “thrombin activatable fibrinolysis inhibitor”
TAT	Complexo trombina-antitrombina
TF	Fator tecidual
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual, do inglês “tissue factor pathway inhibitor”
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento beta, do inglês “Transforming growth factor-beta”
T <sub>H</sub>	Célula T auxiliar, do inglês “Helper T cell”
TLR	Receptores do tipo Toll, do inglês “Toll-like receptors”
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês “tumor necrosis factor”
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual, do inglês “tissue plasminogen activator”
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
uPA	Uroquinase ativador de plasminogênio
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1, do inglês “vascular cell adhesion molecule 1”
vWF	Fator de von Willebrand, do inglês “von Willebrand factor”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

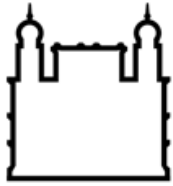
## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **RESUMO**

#### TESE DE DOUTORADO

A infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é a via de transmissão com maior registro de casos no Brasil nos dias de hoje. Outros países da América Latina também reportaram surtos associados ao consumo de alimentos contaminados. Esta via de infecção apresenta sintomas específicos como edema de face e de membros inferiores e, em alguns casos, hemorragias e risco de tromboembolismo. Mesmo assim, ainda existem poucos estudos que abordam esta via de transmissão tanto ao nível da sua patogênese quanto, mais especificamente, ao nível do sistema hemostático e sua interação com o sistema imune. Neste trabalho, camundongos BALB/c com idade entre 6±8 semanas foram infectados por via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos da cepa Tulahuén derivados de excreta de insetos *Triatoma infestans*. Quando comparados com os controles, os animais oralmente infectados apresentaram altas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6). As maiores concentrações e o aumento da parasitemia foram obtidos entre os 14-28 dias após a infecção (dpi). Os hemogramas demonstraram leucocitose e trombocitopenia nos animais infectados, resultando em um aumento do sangramento aos 21 dpi. Alterações hematológicas paralelas ao prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativada, consumo de fator VIII e detecção do D-dímero, sugerem que a infecção pelo *T. cruzi* apresenta sinais de coagulação intravascular disseminada. Notavelmente, o bloqueio de IL-6R preveniu as anormalidades hematológicas, revelando o papel crítico de IL-6 no curso da infecção oral. Além disso, análises hematológicas em camundongos infectados pela via subcutânea indicaram que as perturbações no sistema hemostático não são específicas da via de infecção oral. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, que a infecção pelo *T. cruzi*, resulta em alterações no sistema hemostático e mostram a relevância do "crosstalk" entre inflamação e coagulação nesta doença parasitária.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ABSTRACT

#### PhD THESIS

Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, is presently the most important route of infection in Brazil. Other South American countries have also reported outbreaks of acute Chagas disease associated with food consumption. A conspicuous feature of this route of transmission is presenting distinct symptoms such as facial and lower limbs edema, in some cases bleeding manifestations and risk of thromboembolism are evident. Notwithstanding, studies that address this route of infection are largely lacking regarding its pathogenesis and, more specifically, the crosstalk between immune and hemostatic systems. Here, BALB/c mice, aged 6±8 weeks, were orally infected with metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* Tulahuén strain, obtained from excreta of *Triatoma infestans*. When compared with control uninfected animals, orally infected mice presented higher pro-inflammatory cytokine (TNF, IFN- $\gamma$  and IL-6) serum levels. The highest concentrations and the parasitemia increase were obtained between 14-28 days post-infection (dpi). Blood counts in the oral infected group revealed concomitant leukocytosis and thrombocytopenia, resulting in increased bleeding at 21 dpi. Hematological changes paralleled with prolonged activated partial thromboplastin time, Factor VIII consumption and increased D-dimer levels, suggest that oral *T. cruzi* infection relies on disseminated intravascular coagulation. Remarkably, blockade of the IL-6 receptor blunted hematological abnormalities, revealing a critical role of IL-6 in the course of oral infection. Moreover, haematological analyses in mice subcutaneously infected indicated that haemostatic disorders are not specific to the oral infection route. These results unravel that acute *T. cruzi* infection results in significant alterations in the hemostatic system and indicates the relevance of the crosstalk between inflammation and hemostasis in this parasitic disease.

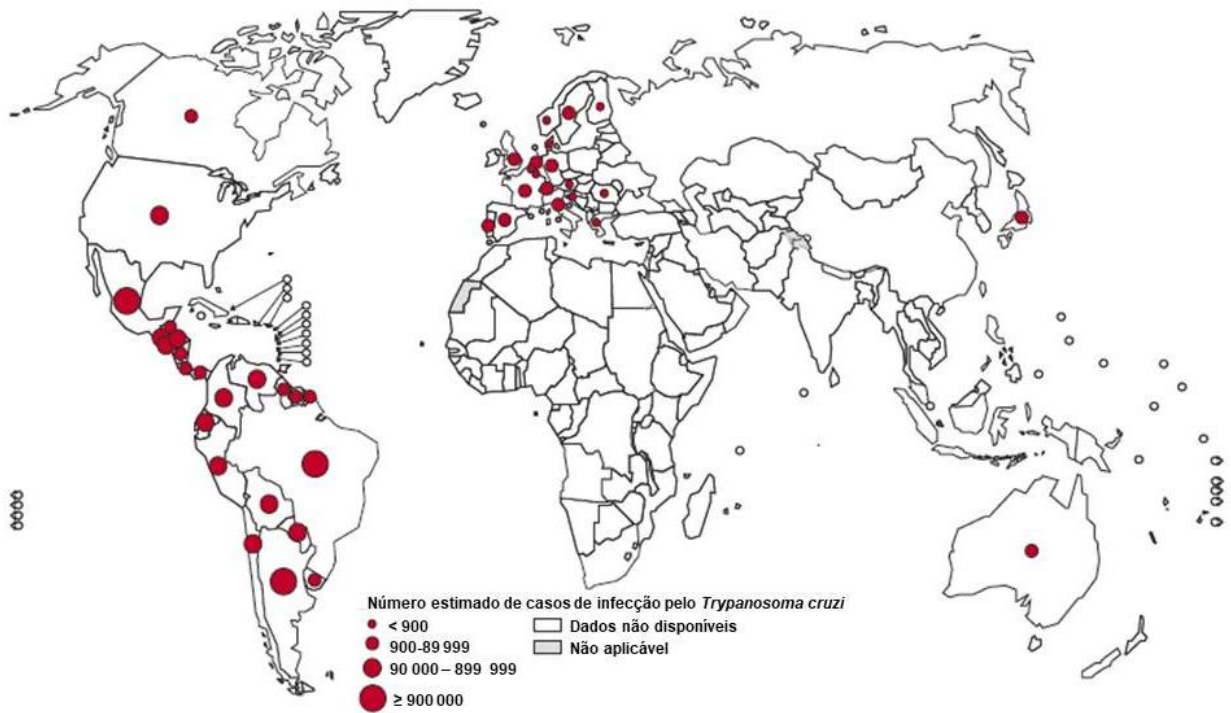
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Doença de Chagas

### 1.1.1. Epidemiologia e tratamento

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas (1) e é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* da família Trypanosomatidae. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) esta doença atinge cerca de 6 a 7 milhões de pessoas, a maioria em áreas endêmicas da América Latina devido à presença de mais 140 espécies do inseto vetor (Triatominae, Hemiptera, Reduviidae), dentre as quais destacam-se *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius robustus* (2–4). Somente no Brasil, estima-se que existam entre 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (3). A DC é uma doença negligenciada e está frequentemente associada a populações de baixa renda vivendo em áreas rurais, perfil que está sendo alterado devido a fluxos migratórios para zonas urbanas e para outros países (3,5). São encontradas pessoas afetadas pela doença fora das áreas endêmicas tais como Europa (principalmente, Espanha, Itália, França, Reino Unido e Suíça, entre outros), América do Norte (Estados Unidos e Canadá), Ásia (Japão) e Austrália (3,5,6) (Figura 1.1).

Estima-se que mais de 80% dos portadores da DC no mundo não possuam acesso ao diagnóstico e tratamento, resultando num agravamento da morbimortalidade e custo social da doença (3). O tratamento consiste na utilização de medicamentos antiparasitários, como o nifurtimox e o benzonidazol, ambos desenvolvidos há mais de 45 anos, pela Bayer (1967) e pela Roche (1971) respectivamente (7). Contudo, estas terapias apresentam diversos efeitos adversos tais como dermatopatia alérgica, erupções cutâneas, náuseas e vômitos e ainda longos períodos de tratamento (entre 60-90 dias) levando cerca de 15-20% dos pacientes à desistência do tratamento (5,7). Vale ressaltar que ainda não existe vacina para a DC (5,6).

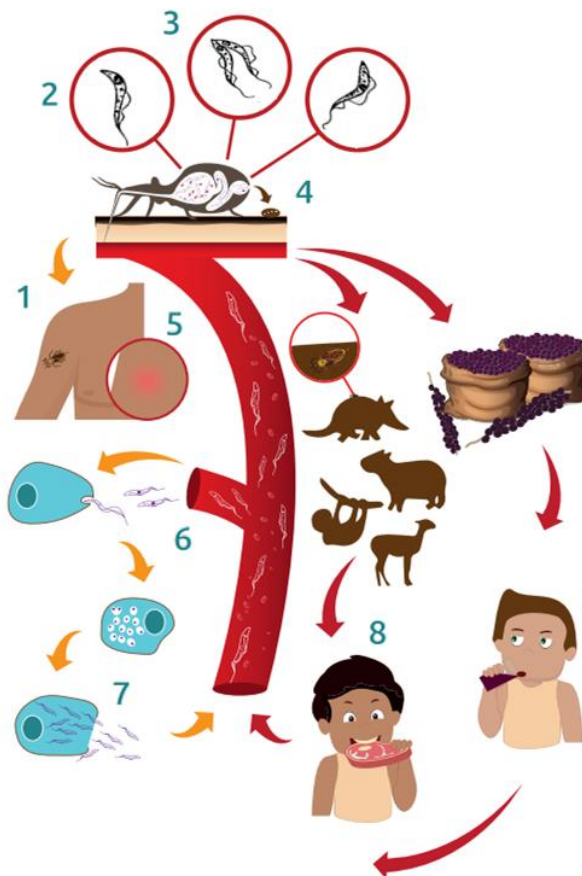


**Figura 1.1 Estimativa global dos portadores da doença de Chagas baseada em dados oficiais (2006-2010).** Apesar de a América Latina ser a região com maior endemicidade devido à presença do vetor, é possível observar casos da enfermidade em outros países devido a fluxos migratórios. Adaptado de (5).

### 1.1.2. Agente etiológico e seu ciclo biológico

O *T. cruzi* apresenta diversidade biológica, bioquímica e genética pelo que foi proposta uma classificação em seis unidades de tipagem discreta (DTUs), nomeadas de TcI a TcVI, após uma genotipagem multilocus das cepas(8). O parasito possui diferentes estágios evolutivos e dois hospedeiros: o inseto triatomíneo e os mamíferos (Figura 1.2). Na via clássica de infecção, o inseto libera na sua excreta as formas infectivas e não proliferativas do parasito, as formas tripomastigotas metacíclicas, após seu repasto sanguíneo (6). No local da ferida e da penetração das fezes, os tripomastigotas invadem as células, geralmente macrófagos, fibroblastos e outros tecidos mesenquimais (9,10). Nessas células, os parasitos escapam dos vacúolos parasitóforos e sofrem diferenciação para a forma amastigota. Os amastigotas intracelulares são morfologicamente bem distintos dos tripomastigotas, apresentando flagelo curto e internalizado. Esta forma do parasito é proliferativa e multiplica-se por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira. Depois de vários ciclos de divisão, os amastigotas diferenciam-se em

tripomastigotas sanguíneos e acabam por lizar a célula, disseminando-se pela corrente sanguínea e infectando outros tecidos (10). Estando na circulação dos indivíduos, o tripomastigota sanguíneo está sujeito a ser ingerido por um triatomíneo durante seu repasto. Uma vez no intestino médio do triatomíneo, os tripomastigotas ingeridos diferenciam-se na forma epimastigota que se replica. Por fim, o ciclo se completa quando epimastigotas migram para a região posterior do reto do inseto, onde ocorre a sua diferenciação em tripomastigota metacíclico, forma que é liberada na excreta do triatomíneo (11). Esses dejetos também podem ser ingeridos juntamente com alimentos, assim como o triatomíneo triturado constituindo a via de transmissão oral (Figura 1.2 – 8), descrita com mais detalhes em “1.1.3 Vias de transmissão”.

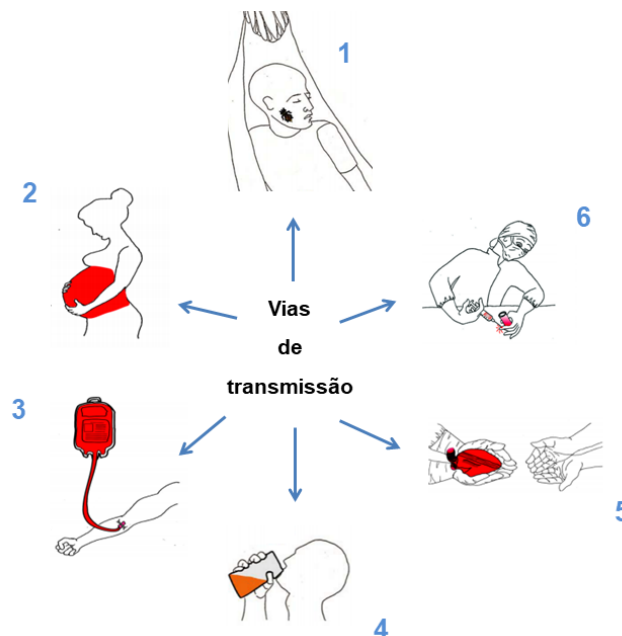


**Figura 1.2 Ciclo biológico do *T. cruzi* no triatomíneo e no mamífero.** (1) O inseto hematófago alimenta-se de sangue humano ou de animal doméstico ou silvestre, contendo as formas infectivas tripomastigotas sanguíneas. Os tripomastigotas sanguíneos ingeridos diferenciam-se e replicam-se sob a forma epimastigota (2, 3) no estômago e posteriormente no intestino médio do triatomíneo. (4) Na porção final do intestino do inseto, as formas epimastigotas se diferenciam em formas infectivas tripomastigotas metacíclicas que serão liberadas juntamente com as fezes. (5) Ao se coçar, o indivíduo leva o parasita presente nas

fezes do barbeiro até o local da picada, por onde o protozoário pode penetrar, invadindo macrófagos, fibroblastos e outras células locais. (6) No interior das células, a forma tripomastigota sofre uma diferenciação reduzindo o comprimento de seu flagelo e se tornando arredondado. Esta forma amastigota se multiplica. (7) Após se multiplicar, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, rompem a célula hospedeira e alcançam a circulação sanguínea, disseminando a infecção. (8) Alimentos contaminados (carne mal cozinhada de animais silvestres, suco de frutos) com fezes de barbeiro infectadas com o *T. cruzi* (8a e 8b) também podem iniciar uma infecção no homem pois os parasitos são capazes de infectar células da boca e do estômago. Fonte: Adaptado de (11).

### 1.1.3. Vias de transmissão

A DC em humanos apresenta vias de transmissão primárias (via vetorial clássica, via de transmissão congênita, transfusional e oral) e secundárias, que ocorrem com menos frequência, tais como transplante de órgãos, acidentes de laboratório ou em ambiente hospitalar (12). Existem outras vias hipotéticas de transmissão, a transmissão sexual e por amamentação (caso específico de infecção oral), alvo de estudo nos últimos anos (13).



**Figura 1.3 Vias de transmissão da doença de Chagas.** Via vetorial clássica (1), via de transmissão congênita (2), transfusional (3), oral (4), por transplante de órgãos (5) e por acidentes de laboratório (6). Adaptado de (11).

Em 2006, o Brasil foi o primeiro país da América Latina a ganhar a certificação internacional de erradicação da transmissão da DC pelo *T. infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) (14). Esta espécie era considerada a principal transmissora no país por ser domiciliada (15). As medidas de controle adotadas, centradas no combate aos vetores domiciliados com inseticidas, proporcionaram uma diminuição significativa de notificações de casos agudos no país. Contudo, ainda ocorrem casos de infecção por esta via, representando cerca de 6,4% dos casos no Brasil entre 2000 a 2013 (16). Por este motivo, ocorreu uma modificação considerável na epidemiologia da doença, no que diz respeito à sua incidência e formas de transmissão sendo que as vias alternativas de infecção vêm ganhando importância (17–19).

A transmissão congênita ou vertical ocorre quando o parasito atravessa a barreira placentária e atinge a circulação fetal afetando entre 1-10% dos fetos (20). O risco de transmissão parece ser maior durante a fase aguda da DC, quando a parasitemia da gestante é mais elevada, mas é possível ocorrer transmissão para o feto durante a fase crônica (6) e em qualquer momento da gestação sendo mais preponderante no segundo e terceiro trimestres da gravidez (21). No Brasil, o inquérito nacional demonstrou prevalência de 0,02% para esta forma de transmissão, identificando que 60% dos casos confirmados de infecção vertical eram do Estado de Rio Grande do Sul (16).

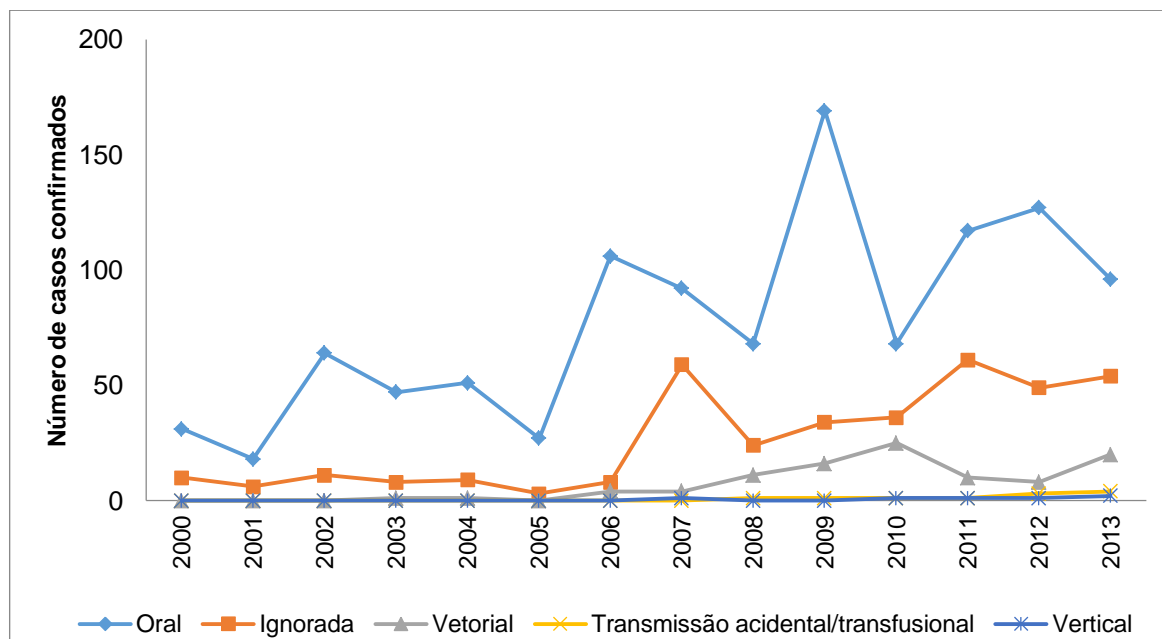
Apesar do reconhecimento da transfusão sanguínea como via de transmissão da DC em 1952, somente em 1980 com a pandemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é que foram implementados programas de controle nos bancos de sangue dos países da América Latina de forma a prevenir a transmissão de várias doenças, entre elas a DC (22). Uma das medidas obrigatórias no Brasil foi a seleção sorológica das amostras dos candidatos à doação além da necessidade de responder a um questionário epidemiológico de forma a avaliar a probabilidade do indivíduo estar infectado pelo *T. cruzi* reduzindo o risco de infecção para 1:200.000 unidades de sangue (23). No caso de transplantes, o risco de transmissão da DC ocorre através de órgãos ou tecidos de um doador infectado para um receptor, mesmo que o primeiro não apresente manifestações clínicas da doença. O fato de o receptor do transplante ter de fazer terapia imunossupressiva, facilita a transmissão por esta via. O risco de transmissão varia de órgão para órgão sendo cerca de 10-20% para rins e fígado e superior a 75% do caso de transplante de coração (24).

A transmissão oral é causada pela ingestão de alimentos contaminados tais como açaí, bacaba, babaçu, cana-de-açúcar e outros sucos e frutas, em decorrência do contato com a excreta do triatomíneo contendo o *T. cruzi* ou com o próprio inseto macerado acidentalmente junto aos alimentos; ingestão de alimentos contaminados com secreções das glândulas anais de marsupiais; ingestão de carnes de caça cruas ou mal cozidas de animais silvestres infectados, como por exemplo de gambá e tatu, hospedeiros vertebrados do parasito (3,6,25).

A ingestão destes alimentos leva a ocorrência de surtos uma vez que acometem indivíduos de uma mesma família ou comunidade que compartilharam a mesma refeição. Estes surtos de transmissão oral da DC tornaram-se frequentes sobretudo na região amazônica do Brasil e em outros países da América Latina (3,6,25).

O primeiro caso de infecção oral pelo *T. cruzi* descrito no Brasil ocorreu em 1965 numa escola na cidade de Teutônia no Rio Grande do Sul (26). O inquérito epidemiológico apontou a ocorrência de um surto de transmissão oral da DC, uma vez que foram diagnosticados concomitantemente 17 casos sérios de miocardite aguda. Os pacientes não apresentavam sinais da porta de entrada, como danos cutâneos ou nas mucosas e não existiam triatomíneos na escola que pudessem ter infectado os indivíduos pela via vetorial. Foi identificada a presença de *Didelphis* spp. na escola, sugerindo que a infecção ocorreu pela ingestão de alimentos contaminados pelas secreções das glândulas anais do animal.

Dados publicados em 2015 pelo MS mostram que a via oral é a forma de transmissão mais frequente no Brasil, representando cerca de 70% dos indivíduos infectados entre 2000 e 2013 (16). Dados do nosso grupo tendo por base número de notificações e confirmações do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Estado do Pará, mostraram que entre os anos de 2000-2016 foram confirmados 2.030 casos de DC aguda com alta incidência nos meses de agosto a dezembro, coincidindo com a safra do açaí, alimento fundamental na dieta dos paraenses e de subsistência da sua população (27).



**Figura 1.4 Casos confirmados de doença de Chagas aguda.** Segundo ano de notificação e forma de transmissão tendo por base o Sistema de Informação de Agravos de Notificação para Doença de Chagas Aguda (SINAN). Brasil, 2000 a 2013. Adaptado de (16).

A DC assim como as restantes doenças negligenciadas, sempre estiveram relacionadas às baixas condições socioeconômicas dos portadores. Contudo, os surtos de infecção oral podem atingir indivíduos com condições socioeconômicas mais altas (28).

Além do Brasil, outros países da América Latina tais como Argentina, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Equador e Venezuela, apresentam casos de transmissão da doença Chagas por via oral (3,25,29,30). Um dos maiores surtos de infecção oral descritos na literatura ocorreu em uma escola em Caracas, na Venezuela, afetando alunos, professores e trabalhadores da instituição de ensino. Nesse surto foram confirmados 103 casos de infecção oral através da ingestão de suco de goiaba contaminado (30).

No que concerne as vias hipotéticas de transmissão, verificou-se em um estudo longitudinal no Pará com pacientes na fase aguda da DC e suas famílias, que amostras de sêmen destes indivíduos contendo parasitos quando injetadas na cavidade peritoneal ou colocadas na vagina de fêmeas BALB/c, tinham capacidade infectiva, sugerindo a transmissão sexual. Passadas cinco semanas da infecção, foram detectados ninhos de amastigotas no coração e músculos esqueléticos dos animais e parasitos em diferenciação no lúmen do ducto deferente e na tuba uterina dos animais (13).



Ainda existem debates sobre o risco de transmissão oral pela amamentação. Apesar de terem sido encontradas formas tripomastigotas no leite de camundongos infectados experimentalmente e no leite de mães portadoras da DC na fase aguda (existindo controvérsias sobre a contaminação do leite com sangue de mamilos gretados e feridos), a infecção por esta via tanto em humanos como em modelos experimentais não está estabelecida (31).

#### **1.1.4. Aspectos clínicos e patogênese**

A DC apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase aguda da doença é caracterizada por um elevado número de parasitos circulantes e nos tecidos enquanto que a fase crônica, contrariamente à fase aguda, possui uma baixa parasitemia, sendo muito rara a sua detecção em exames diretos (6).

Na fase aguda, geralmente oligossintomática, os pacientes apresentam sintomas inespecíficos tais como febre prolongada, mialgia, cefaleia, náuseas, diarreia, linfadenomegalia e hepatoesplenomegalia (6). Este fato dificulta o diagnóstico da infecção nos estágios iniciais e limita a disponibilidade de estudos com os pacientes nesta fase (32). No caso da infecção pela via vetorial clássica, é possível observar um chagoma de inoculação, edema com reação inflamatória local da picada, que quando ocorre na pálpebra é denominado de sinal de Romaña. Um outro sintoma importante da fase aguda é a miocardite causada pelo parasitismo das fibras cardíacas que levam a uma intensa resposta inflamatória no coração. Os sintomas da via de transmissão oral são mais específicos compreendendo o edema de face e membros inferiores e, em alguns casos, sangramento digestivo (hematêmese, hematoquezia ou melena) e, eventualmente, outros tipos de sinais hemorrágicos tais como epistaxe, petéquias, períodos menstruais mais intensos e ainda, tromboembolismo (33–35).

Dependendo do surto e de fatores como tamanho do inóculo, cepa do *T. cruzi*, "background" genético do hospedeiro, tempo de diagnóstico entre outros, pacientes infectados vão a óbito durante a fase aguda devido a complicações decorrentes de miocardite, meningoencefalite e ainda hemorragias digestivas (36). A fase aguda da infecção oral geralmente apresenta maior gravidade e mortalidade quando comparada com a via clássica da doença (8-35% e <5-10% respectivamente) (6).

Segundo o II Consenso Brasileiro em DC, o diagnóstico da fase crônica é essencialmente sorológico, uma vez que devido à parasitemia subpatente durante esta fase, os métodos parasitológicos apresentam baixa sensibilidade. Considera-se

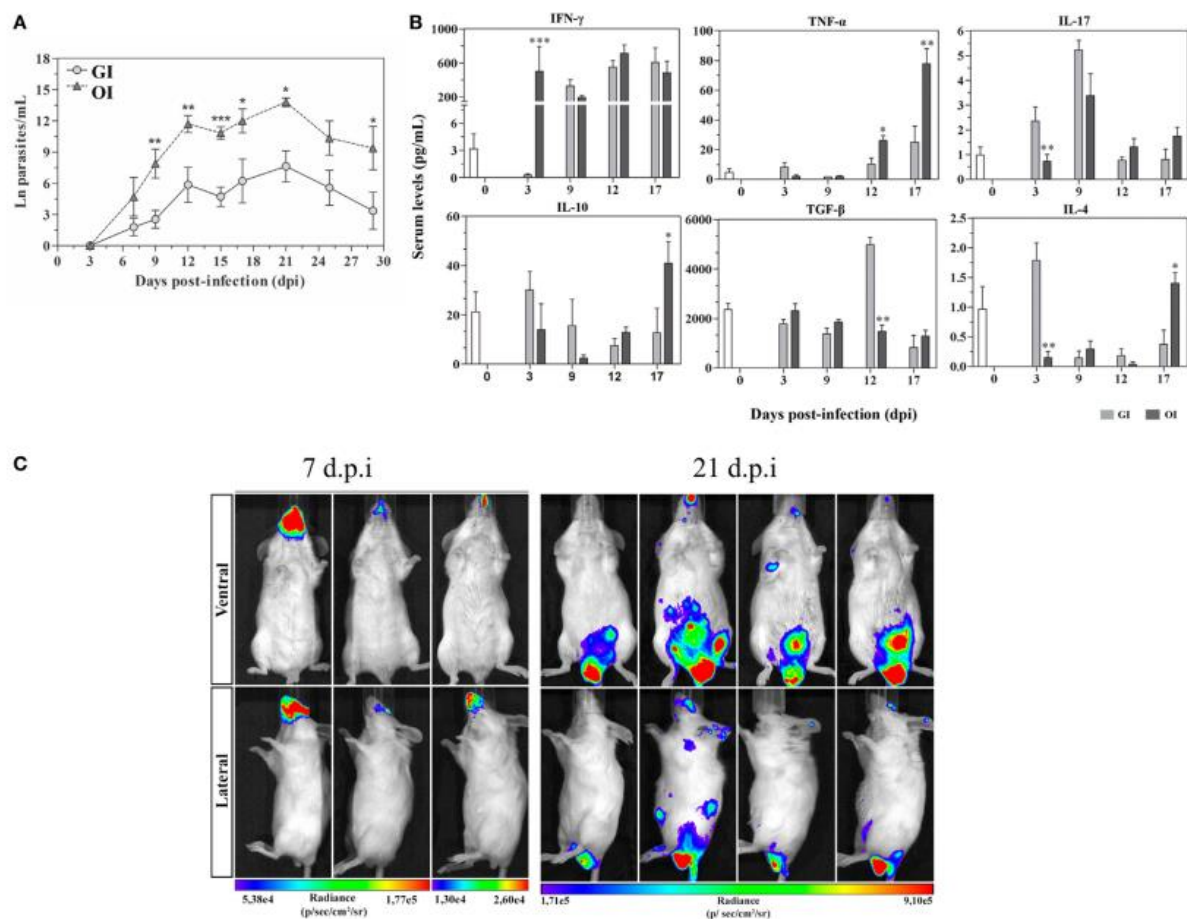
indivíduo infectado na fase crônica aquele que apresenta anticorpos IgG contra *T. cruzi* no soro detectados por meio de dois testes sorológicos com princípios distintos ou com diferentes preparações antigênicas (3). Alguns pacientes não apresentam manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas significativas(6) e permanecem nessa forma indefinidamente, sendo denominada de forma indeterminada. Contudo, cerca de um terço dos portadores da DC infectados pela via vetorial clássica, desconhecendo-se até então o motivo, passados geralmente entre 10-20 anos, evoluem para a fase crônica determinada da doença, com comprometimento cardíaco, digestivo (síndrome megaesôfago e megacólon) e/ou neurológico (6). A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é um dos sintomas mais importantes da doença e a principal causa de morte nos pacientes crônicos. Na maioria dos casos, essa miocardite gera cardiomegalia, complicações tromboembólicas sistêmicas e pulmonares e falência do órgão (6,37). Indivíduos crônicos imunocomprometidos, como por exemplo com coinfeção do HIV ou sob tratamento com corticosteroides, podem apresentar uma reativação da doença (38).

No que refere à patogênese da DC, a maioria do conhecimento adquirido até à atualidade advém de estudos com modelos experimentais, muitos deles utilizando a via de infecção intraperitoneal (IP), que não mimetiza nem a via natural de infecção, a via vetorial clássica, nem a via mais frequente de transmissão no Brasil, a via oral. Camundongos infectados pela via IP apresentam maior parasitemia e mortalidade quando comparados com animais infectados pelas vias de mucosa com o mesmo inóculo (39–41). O nosso grupo demonstrou que a via de infecção pode influenciar diretamente os tecidos alvo da infecção, além da resposta imune, infecção e mortalidade do hospedeiro, podendo assim ser considerada um fator preponderante na patogênese da DC (39,42). No primeiro estudo, camundongos BALB/c infectados pela via oral (OI) com a cepa Tulahuén (TcVI), apresentaram maior parasitemia, maior mortalidade, danos hepáticos mais graves com maiores concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e maior secreção de citocinas pró-inflamatórias Th1 (mais especificamente TNF e IFN- $\gamma$ ) responsáveis pela ativação da resposta inflamatória local e sistêmica, quando comparados com os animais infectados por via intragástrica (IG). Os animais infectados por IG, por sua vez, apresentaram uma miocardite mais grave e maiores concentrações da citocina Th2 reguladora IL-10 permitindo um controle da resposta inflamatória e de TGF- $\beta$ , um mediador fundamental no reparo tecidual (Figura 1.5 A, B). Tanto IL-10 como TGF- $\beta$  inibem a função microbicida dos macrófagos (43,44).

No coração e no fígado de animais infectados por IG ou OI podem ser encontrados neutrófilos, macrófagos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> sendo que os macrófagos constituem a principal fonte de TNF tecidual (41).

O bloqueio de TNF nos animais oralmente infectados a partir dos 14 dpi reduziu significativamente a mortalidade sem alterar a parasitemia, mostrando o importante papel de TNF no curso da infecção oral (39). As citocinas Th1, como TNF, IL-6 e IFN- $\gamma$ , são cruciais na fase inicial da infecção, uma vez que apresentam um efeito protetor na resposta imunológica contra este parasito, mas quando produzidas em excesso podem contribuir para danos teciduais (39). Camundongos deficientes em IL-6 e inoculados pela via subcutânea (SC) com 3000 tripomastigotas da cepa Tulahuén apresentaram maior parasitemia e foram a óbito dias antes dos animais selvagens demonstrando que uma deficiência em IL-6 aumenta a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (45). As citocinas Th17, como IL-17A, também têm um papel importante em infecções por vias de mucosa, uma vez que estão envolvidas na formação da barreira gastrointestinal (46) e conforme esperado, animais OI e GI apresentam concentrações séricas elevadas desta citocina (39).

Em outro trabalho com a via de inoculação oral, observou-se por bioluminescência que, no início da infecção, a região nasomaxilar é o principal local de invasão, interação e replicação do *T. cruzi* (Figura 1.5 C). A partir deste local, o parasito dissemina-se para outros órgãos alvo, tais como coração, linfonodos mandibulares, fígado, baço, cérebro, órgãos sexuais masculinos, estômago, esófago, entre outros, sendo possível detectar o parasito por bioluminescência e por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) nestes órgãos aos 7, 14 e 21 dpi (42).



**Figura 1.5 Parasitemia, análise de citocinas e tecidos alvo durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi*.** (A) Camundongos BALB/c foram infectados com  $5 \times 10^4$  formas tripomastigotas derivadas de cultura de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) por gavagem (GI) ou pela cavidade oral (OI). A parasitemia (média e erro padrão da média) foi quantificada durante a fase aguda e expressa em Ln parasitos por mL. (B) Análise de citocinas em camundongos GI e OI. Durante o curso da fase aguda da infecção, foram medidas as concentrações séricas das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17, IL-10, e TGF- $\beta$  nos controles e nos animais infectados por uma análise multiplex. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn, \* $p = 0.05$ ; \*\* $p = 0.01$ ; \*\*\* $p = 0.001$ . (C) Distribuição do parasito durante a infecção oral. Camundongos BALB/c foram infectados pela via oral (OI) com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* expressando luciferase (cepa Dm28c-luc). As imagens representativas de bioluminescência foram adquiridas do mesmo animal ( $n=6$ ) a 7 e 21 dpi, após 15 min da injeção intraperitoneal com D-luciferina (150 mg/kg), usando o sistema IVIS® Lumina (Xenogen). Adaptado de (47).

## 1.2. Aspectos gerais sobre hemostasia

A palavra hemostasia tem origem do grego *hemo* (sangue) + *stasis* (fazer parar) e consiste no processo de manter o sangue dentro do vaso após uma injúria além de

manter o sangue livre de coágulos em condições fisiológicas (48). Isto é possível através da formação de coágulo, sua subsequente dissolução e por fim reparo do tecido que sofreu o dano. A hemostasia é mantida por um balanço entre a ativação da coagulação e a fibrinólise e é dividida em dois estágios: primário e secundário. Resumidamente, o estágio primário envolve a vasoconstrição, a ativação e agregação das plaquetas. Por sua vez, o estágio secundário envolve a ativação dos mecanismos de coagulação, formação do coágulo e sua subsequente dissolução e fibrinólise (49).

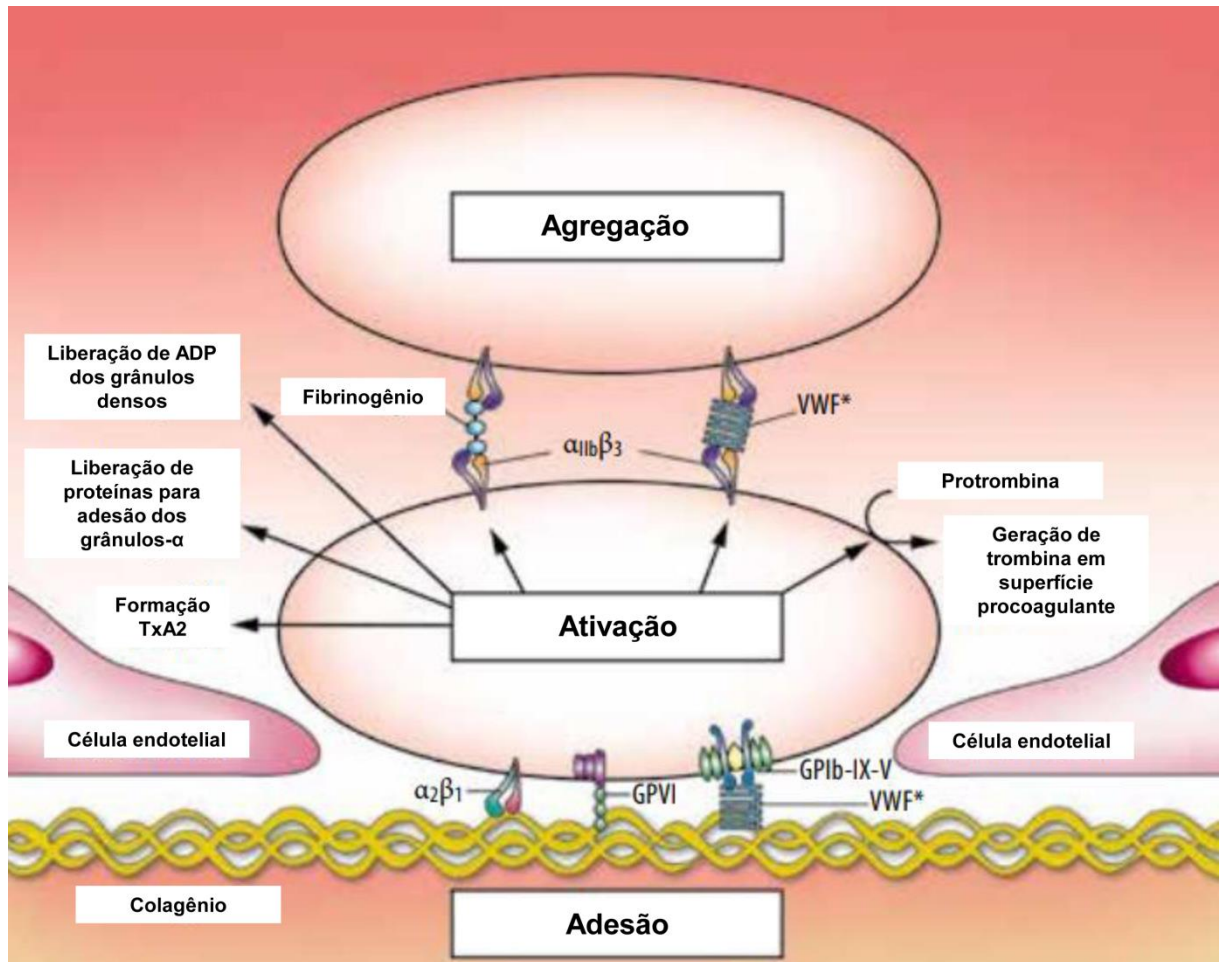
### **1.2.1. Hemostasia primária**

A hemostasia primária baseia-se na formação do tampão plaquetário no local do dano vascular. É constituída fundamentalmente por quatro etapas: i) vasoconstrição; ii) adesão plaquetária; iii) ativação plaquetária; iv) agregação plaquetária (50). A primeira etapa do estágio primário consiste na constrição do vaso que sofreu um dano que irá reduzir o fluxo sanguíneo no local, evitando perdas de sangue. A matriz extracelular (ECM), composta majoritariamente por colágeno e elastina, torna-se altamente trombogênica promovendo a adesão e agregação de plaquetas (51). Uma das moléculas responsáveis pela adesão das plaquetas ao colágeno é a glicoproteína fator von Willebrand (vWF) produzida pelas células endoteliais e pelos megacariócitos. Contudo, essa adesão é influenciada pelo “shear stress”, isto é, pela força tangencial do sangue circulando na superfície endotelial. Quando este estresse é baixo, a ligação ao colágeno ocorre através dos receptores integrina  $\alpha 2\beta 1$  (GPIIb/IIIa) e GPVI das plaquetas. Quando é alto, via ligação do receptor GPIIb-IX-V das plaquetas ao vWF (50). À medida que aderem à parede do vaso e ao colágeno, as plaquetas mudam dramaticamente a sua forma de disco achatado para a forma de esferas, sofrendo uma dilatação e centralização das organelas com surgimento de pseudópodes aumentando a sua superfície de contato (Figura 1.6).



**Figura 1.6** Plaquetas humanas observadas em microscopia eletrônica de varredura. A morfologia de disco achatado das plaquetas em repouso quando circulam normalmente pelo sangue pode ser vista; parcialmente ativadas com alterações morfológicas e formação de pseudópodes e totalmente ativadas formando agregados (da esquerda para a direita) (52).

O processo de ativação é mediado por uma complexa interação entre o citoesqueleto, efetores intracelulares e influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  que promove a formação desses pseudópodes(53). Como é possível observar na Figura 1.7, durante esta mudança morfológica, as plaquetas liberam agonistas para estimular a agregação de mais plaquetas, tais como o a adenosina difosfato (ADP) e serotonina dos seus grânulos densos, e ativam a via da cicloxigenase-1 (COX-1) que desencadeia a síntese das prostaglandinas. A enzima tromboxano-sintetase age sobre a prostaglandina, realizando assim a síntese do tromboxano A2 (TXA2). O TXA2 age como um potente agregador de plaquetas e vasoconstritor (54).



**Figura 1.7 Esquema simplificado de etapas da hemostasia primária.** Representação da adesão das plaquetas, ativação e agregação em resposta ao dano no vaso sanguíneo e exposição do subendotélio. Asteriscos representam interações que ocorrem com alto “shear stress”. Adaptado de (55).

As plaquetas uma vez ativadas expõem à sua superfície fosfatidilserina carregada negativamente. Esses fosfolípidos formam a superfície ideal para a ativação dos fatores da cascata de coagulação e geração de trombina, o fator mais potente de agregação plaquetária. A trombina aciona todos os mecanismos anteriormente mencionados aumentando ainda mais a ativação plaquetária (50).

### 1.2.2. Hemostasia secundária

Após a etapa de hemostasia primária, é necessária a estabilização do tampão plaquetário para interromper qualquer possível sangramento. Esse processo consiste em uma série de reações bioquímicas envolvendo proteínas denominadas de fatores de coagulação. Essas interações complexas culminam na conversão de

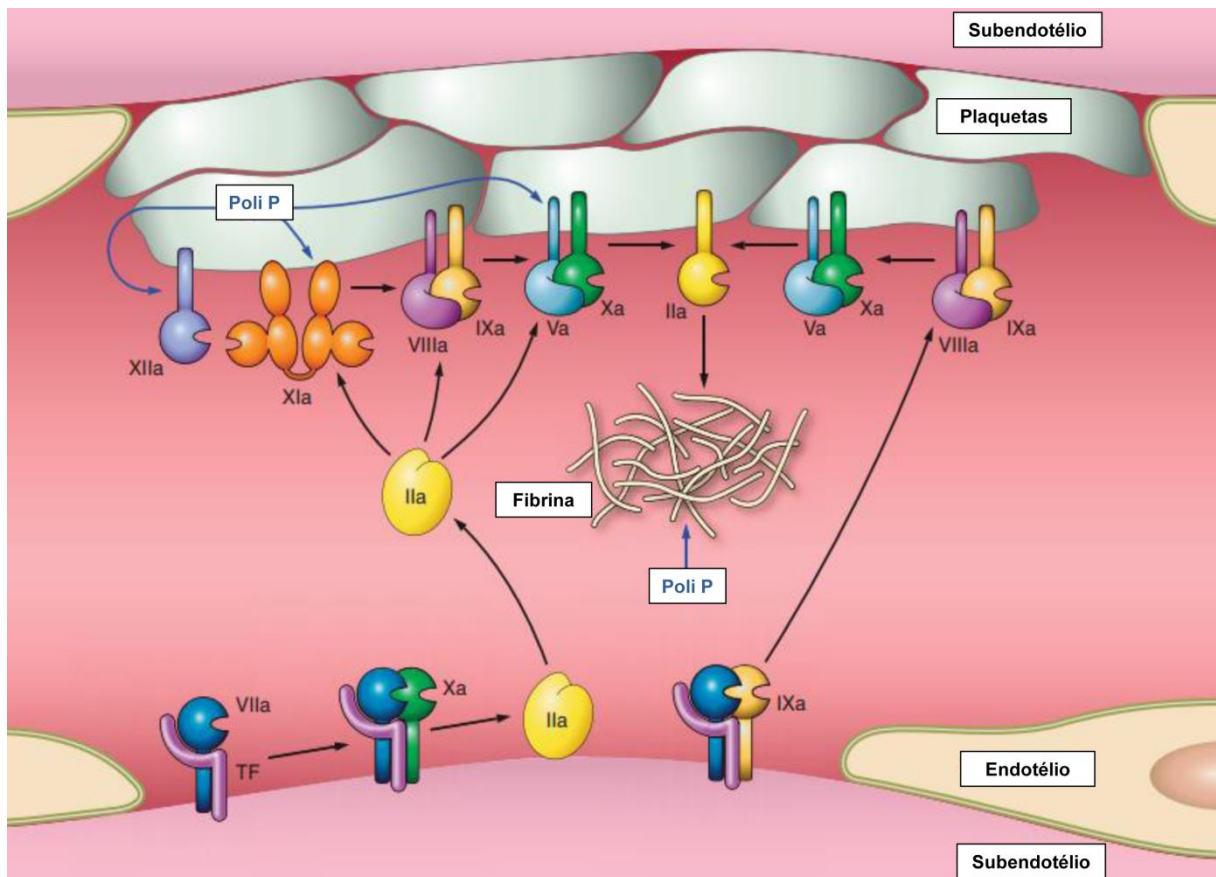
uma proteína solúvel, o fibrinogênio, em uma proteína insolúvel, a fibrina, que forma a estrutura do coágulo. O modelo *in vivo* para a hemostasia secundária enfatiza a interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas e será explicado de seguida.

#### **1.2.2.1. Hemostasia secundária *in vivo*: modelo baseado em superfícies celulares**

O modelo de ativação em superfícies celulares (Figura 1.8), amplamente utilizado na atualidade (56), é dividido em três fases: i) iniciação; ii) amplificação; iii) propagação (57) ou estabilização (58). Os intervenientes nestas fases são fatores de coagulação, várias pró-enzimas que são convertidas a enzimas ativas através de outros fatores de coagulação e seus cofatores. A primeira fase inicia-se quando ocorre um dano na vasculatura e as células subendoteliais como fibroblastos e células do músculo liso ficam expostas à corrente sanguínea. Estas células expressam à sua superfície o Fator Tecidual (TF), o cofator do Fator VII (FVII). Após ligação do TF ao FVII ocorre uma clivagem proteolítica e o FVII é convertido em FVIIa ativado (FVIIa). A atividade do FVIIa é dependente do TF, isto é, sem a sua ligação, o FVIIa apresenta baixa atividade uma vez que apresenta um resíduo de metionina [156] que o mantém na sua conformação de zimogênio (59). O complexo TF/FVIIa é responsável pela conversão do Fator IX (FIX) e Fator X (FX) em FIXa e em FXa. Nesta fase são geradas baixas concentrações de fatores de coagulação ativados. Posteriormente, na superfície das plaquetas ativadas, ocorre a formação do complexo protrombinase, constituído pelo FXa associado ao cofator Fator V ativado (FVa) que culminará na conversão da protrombina a trombina (57) e liberação do peptídeo fragmento 1+2 da protrombina ( $F_{1+2}$ ). Na fase de amplificação, como o nome indica, a concentração dos fatores de coagulação aumenta substancialmente. Uma vez que a trombina formada na fase de iniciação não é suficiente para a formação de um coágulo estável, existem vários "feedbacks" positivos responsáveis pela ligação da trombina às plaquetas que aderiram ao local do dano que irão contribuir para a sua ativação. Essa trombina ativa o FV e o Fator VIII (FVIII) que serve como cofator do complexo protrombinase e acelera a ativação da protrombina pelo FXa e do FXa pelo FIXa, respetivamente (57). Ao contrário da fase de iniciação, que ocorre à superfície de células que expressam o TF, a última fase do modelo de ativação em superfícies celulares, a fase de propagação, ocorre em superfícies



contendo fosfolipídeos procoagulantes, como as plaquetas ativadas. Nesta fase, os fatores de coagulação ligam-se às membranas procoagulantes das plaquetas para formação dos coágulos de fibrina. O Fator XI (FXI) converte FIX em FIXa que depois se associa ao FVIII que foi clivado pela trombina. A trombina é também responsável pela ativação do Fator XIII (FXIII) que faz o "cross-linking" dos polímeros de fibrina com ligações covalentes conferindo dessa forma estabilidade e elasticidade ao tampão de plaquetas. A trombina ainda ativa o TAFI (inibidor da fibrinólise ativado pela trombina) que protege o coágulo do processo de fibrinólise (57).



**Figura 1.8 Cascata de coagulação modelo de ativação em superfícies celulares.** Após dano endotelial, o fator tecidual (TF) é exposto na corrente sanguínea e liga-se ao fator VII (FVII), tornando-se fator VII ativado (FVIIa). O complexo fator tecidual: fator VII ativado (TF:FVIIa) formado, permite a consequente ativação do fator X (FX) a fator X ativado (FXa) e da protrombina. Ao mesmo tempo, pequenas quantidades geradas de trombina (representada na figura por FIIa) (fase de iniciação) alimentam o "feedback" ativando o fator FXI (FXIa) e fator IX (FIXa) na superfície das plaquetas. O FIXa vai ativar o FX e em simultâneo, a trombina irá ativar o fator VIII (FVIII) (cofator do FIX) e fator V (FV) (cofator do FX) iniciando a fase de amplificação o que aumenta drasticamente a atividade catalítica dos FIX e FX. Por último, a formação da trombina culminará na deposição da fibrina. Em paralelo, os polifosfatos (Poli P) liberados pelos grânulos densos das plaquetas ativadas podem estimular adicionalmente a ativação dos fatores FXII, FV e FXI. Adaptado de (57).

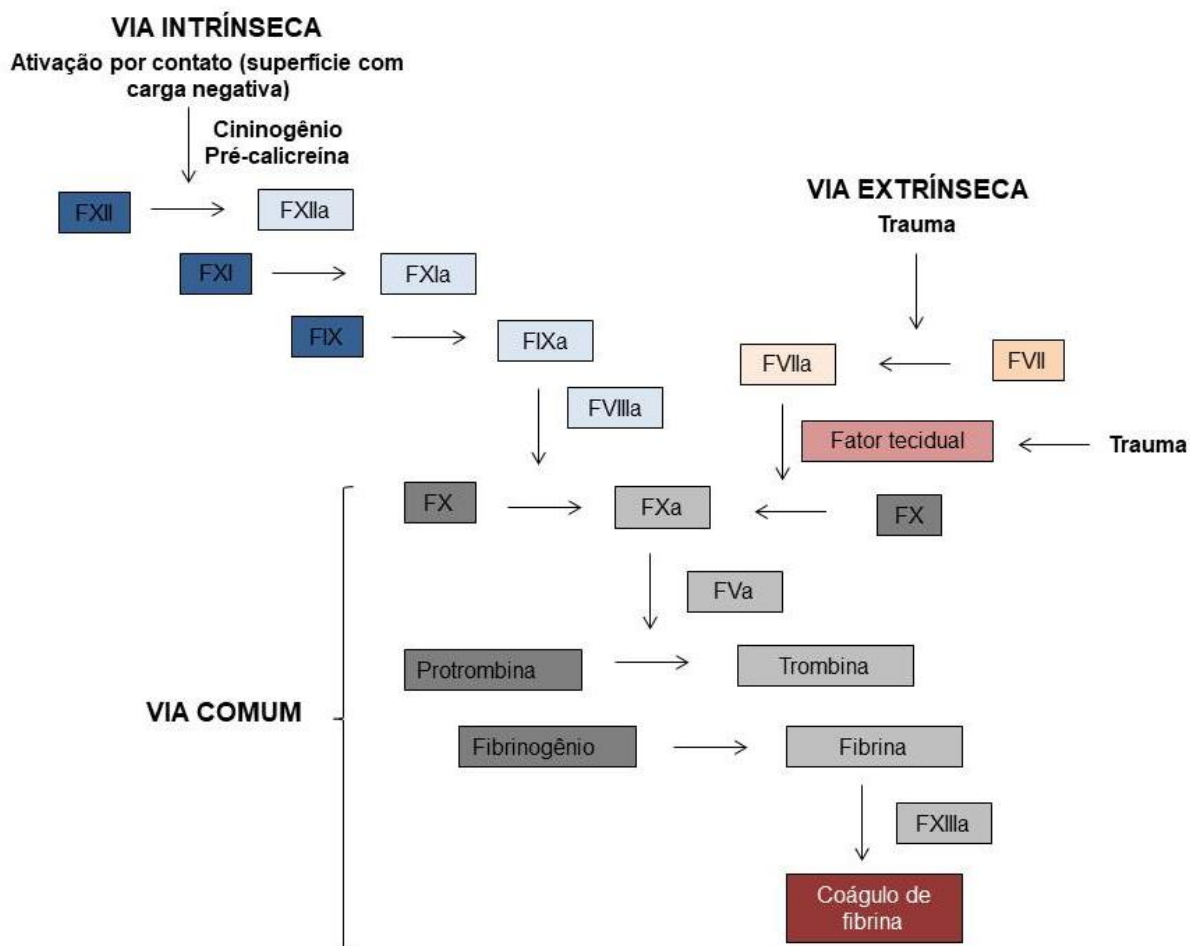
### 1.2.2.2. Ativação da hemostasia secundária *in vitro*

É possível avaliar laboratorialmente a coagulação sanguínea. Contudo, é necessário o entendimento do primeiro modelo de coagulação proposto em 1964, o modelo clássico da cascata de coagulação. Este modelo é composto por três vias: a via intrínseca e a via extrínseca que convergem na via comum (Figura 1.9). A denominação de via intrínseca está relacionada ao fato dos seus constituintes estarem presentes no sangue enquanto que no caso da via extrínseca, é necessário um fator externo ao sangue, o TF, que provem do tecido extravascular (57).

Na via intrínseca, a ativação do FXII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma, a pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O FXIIa ativa o FXI que, por sua vez, ativa o FIXa. O FIXa, na presença de FVIIIa e de íons cálcio (complexo tenase), ativa o FX da coagulação (elemento da via comum) que juntamente com o FVa e cálcio, desencadeia a geração de trombina e, subseqüentemente, formação de fibrina (60).

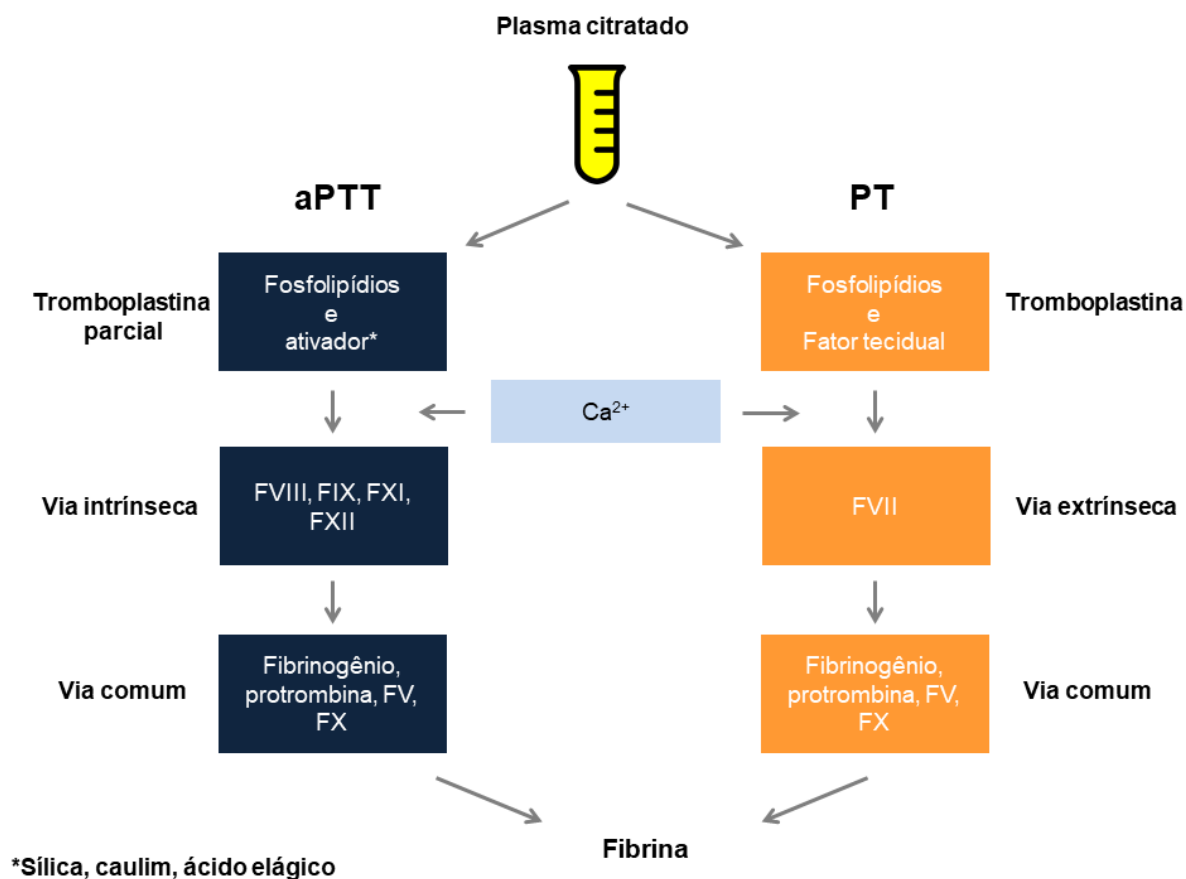
Na via extrínseca, o FVII plasmático é ativado na presença de seu cofator, o TF, formando o complexo FVIIa/TF, responsável pela ativação do FX.

Na via comum, a protrombina é ativada pelo FXa (tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca) formando-se a trombina. A trombina converte fibrinogênio em fibrina, mas também ativa o FXIII, responsável pela polimerização ("cross-linking") da fibrina (60).



**Figura 1.9 Modelo clássico da cascata de coagulação.**

Os distúrbios da via intrínseca e extrínseca podem ser avaliados clinicamente, através da medição do tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e do tempo de protrombina (PT), respectivamente (61). No primeiro teste, o plasma citratado é incubado com um reagente contendo fosfolipídios e um ativador plasmático, por exemplo, sílica, caulim, ácido elágico, que irá ativar o FXII da via intrínseca. Após a adição de cálcio, faz-se a medição do tempo de formação do coágulo. Quanto maior for esse tempo, maior será o tempo necessário para converter a protrombina em trombina e gerar a fibrina (Figura 1.10). Em relação ao PT, procede-se à adição de um excesso de TF e cálcio ao plasma citratado e mede-se o tempo de coagulação do plasma (Figura 1.10). O PT estará aumentado em casos de deficiência de FVII, FX, FV, protrombina e fibrinogênio, em indivíduos que fazem uso de anticoagulantes ou apresentem doenças hepáticas e deficiência de vitamina K, pois a protrombina e os FVII e FX são dependentes desta vitamina (62).



**Figura 1.10 Mecanismo de coagulação medido laboratorialmente através dos tempos de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e de protrombina (PT).**

### 1.2.3. Reguladores fisiológicos da coagulação

O processo de coagulação sanguínea é extremamente complexo e potencialmente danoso e por isso, altamente regulado em cada via de ativação. Existem três proteínas inibitórias principais que atuam como anticoagulantes naturais: inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a antitrombina (AT) e o sistema da proteína C.

#### 1.2.3.1. Inibidor da via do fator tecidual

O TFPI é o inibidor primário do início do processo de coagulação e a sua expressão modula a gravidade de várias doenças. Esta proteína é secretada pelo endotélio e tem a capacidade de inibir o complexo TF-FVIIa e o fator Xa. Não existem casos de pacientes com deficiência em TFPI o que parece indicar que uma deficiência homozigótica deste regulador é uma condição letal (63). Camundongos

"knockout" para TFPI têm um fenótipo letal com ativação descontrolada da coagulação e com consumo exacerbado dos fatores citados anteriormente (64).

### **1.2.3.2. Antitrombina**

A AT é o inibidor primário da trombina e também exerce um papel inibitório sobre os fatores FXIa, FXa e FIXa. A AT neutraliza a trombina formando um complexo estequiométrico denominado de trombina-antitrombina (TAT). As concentrações de TAT refletem a geração de trombina e por esse motivo, a quantificação deste complexo é utilizada como marcador de ativação de coagulação intravascular e também no diagnóstico de eventos tromboembólicos (65).

O efeito da heparina como anticoagulante é o resultado da aceleração do efeito da AT através de uma mudança conformacional no seu centro reativo o que a torna uma inibidora de coagulação muito mais eficiente (em concentrações ótimas de heparina, a atividade da AT pode aumentar 2000 a 4000 vezes). Concentrações baixas de AT estão relacionadas com um risco aumentado de trombose (66).

### **1.2.3.3. Sistema da proteína C**

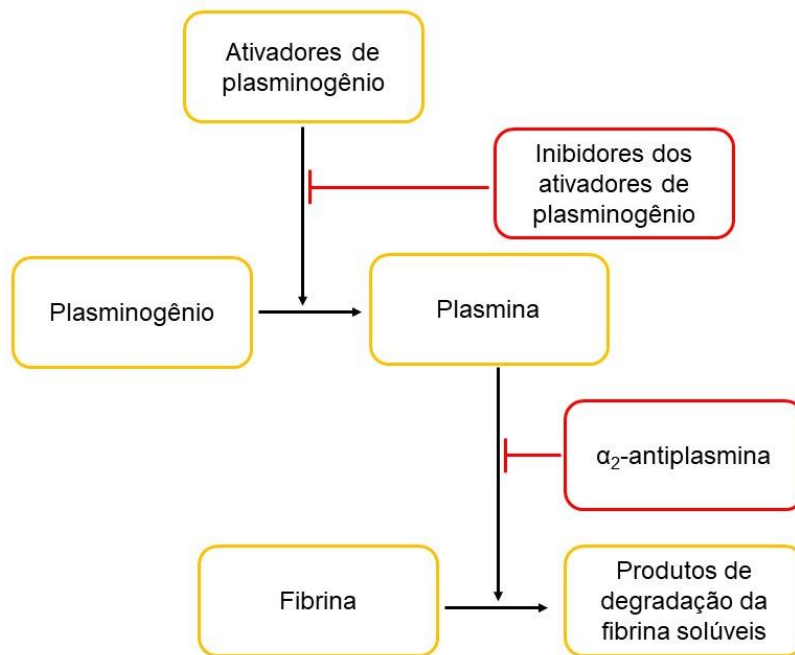
A proteína C é uma glicoproteína plasmática dependente de vitamina K com capacidade anticoagulante, pró-fibrinolítica e anti-inflamatória, responsável pela regulação da fase de propagação, ativada pela trombina ligada à proteína de membrana endotelial, trombomodulina. Após a sua ativação e conversão em proteína C ativada (APC) ela atua, juntamente com os seus cofatores, a proteína S e fosfolípidos, na degradação dos fatores FVa e FVIIIa (66). Uma molécula de trombina tem a capacidade de ativar várias moléculas de proteína C, levando a um efeito de amplificação na clivagem dos fatores FVa e FVIIIa. A proteína S é uma glicoproteína dependente de vitamina K, cofator da APC e é sintetizada pelos hepatócitos e pelas células endoteliais (58). A baixa expressão de APC, proteína S ou mutações que provoquem resistência à APC (FV Leiden) estão associadas a riscos elevados de trombose (66).

### **1.2.4. Fibrinólise**

A degradação de um coágulo é denominada de fibrinólise e pode ocorrer na superfície do trombo contendo fibrina ou em células que expressam receptores

profibrinolíticos (67). Após a recuperação do dano no vaso sanguíneo, o trombo necessita ser lisado através de uma enzima denominada plasmina. A plasmina é gerada através da conversão do zimogênio plasminogênio que se encontra na superfície do coágulo ou na superfície de células pelas serina proteases tPA (ativador do plasminogênio tecidual) e uroquinase (uPA) (67). Desta proteólise resultam produtos de degradação da fibrina (FDP), como o fibrinopéptido B e o D-dímero que resultam da clivagem pela plasmina no sítio do fragmento D. O D-dímero reflete a atividade da plasmina e é utilizado amplamente como marcador de coagulação intravascular disseminada (DIC) (68), embolia pulmonar, trombose venosa profunda(69) e trombose associada ao câncer (70).

O tPA é produzido e liberado pelas células endoteliais enquanto que a uPA é sintetizada por monócitos, macrófagos e pelo epitélio urinário (67). Ambas as enzimas têm tempos de vida extremamente curtos (4 a 8 min) devido às altas concentrações dos seus inibidores, tais como o inibidor do ativador do plasminogênio (Tipo 1) (PAI-1). A plasmina por sua vez também possui uma enzima inibidora denominada de  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -AP). O risco de uma potencial trombose vascular depende, portanto, de um balanço entre a ativação do plasminogênio e a atividade da plasmina e de todos os inibidores mencionados anteriormente na circulação. A Figura 1.11 representa um esquema simplificado dos intervenientes no processo de fibrinólise.



**Figura 1.11 Esquema simplificado do sistema fibrinolítico e seus intervenientes.**

Após ativação do plasminogênio pelos seus ativadores (tPA e uPA), a plasmina é gerada. Os ativadores de plasminogênio por sua vez, são regulados pelo PA-1. A atividade enzimática da plasmina é inibida pela  $\alpha$ 2-antiplasmin ( $\alpha$ 2-AP) (66).

### **1.3. "Cross-talk" entre inflamação e coagulação**

Infecções graves causam, normalmente, alterações no equilíbrio hemostático. Diferentes estudos demonstram que as citocinas pró-inflamatórias são intervenientes nesse desequilíbrio uma vez que influenciam tanto as vias procoagulantes como as vias anticoagulantes. O TF, desencadeador da coagulação, é super-expresso em condições de inflamação aguda majoritariamente em monócitos e células endoteliais (71,72). As citocinas que têm a capacidade de aumentar a expressão do TF são TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e a quimiocina CCL2 (71,73).

Em um trabalho abordando endotoxemia, os autores injetaram pequenas quantidades de lipopolissacarídeo (LPS) (4 ng/kg) em indivíduos saudáveis e coletaram o seu sangue entre 0,5- 24 h após a o estímulo. Foi verificado um aumento progressivo com pico entre as 3 e 4 h de cerca de 125 vezes da expressão mRNA TF/monócito. Após 24 h, os valores retomaram o nível basal de expressão. Vale ressaltar que as concentrações de TAT e F<sub>1+2</sub> acompanharam a cinética do TF corroborando a ativação da coagulação (74). Por sua vez, a administração de TNF recombinante (50  $\mu$ g/m<sup>2</sup> de área superfície corporal) em humanos sadios induziu a ativação do fator X após 45 min, seguida de uma ativação progressiva de protrombina reflexo das altas quantidades de fragmento F<sub>1+2</sub> durante 6-12 h (75). Do mesmo modo, uma injeção de IL-6 recombinante (150  $\mu$ g/indivíduo) em pacientes com câncer renal levou a um aumento significativo das concentrações de TAT e F<sub>1+2</sub> no plasma (76). O bloqueio de IL-6 com um anticorpo monoclonal (30 mg/indivíduo) em um modelo primata não humano de sepse, preveniu a indução da coagulação causada pelo LPS uma vez que diminuiu significativamente as concentrações do F<sub>1+2</sub> e TAT (77). Inesperadamente, o mesmo tratamento em humanos não reduziu as concentrações desses marcadores nem do mRNA do TF (78). A IL-6 está também envolvida na trombogenicidade das plaquetas, uma vez que após adição desta citocina (15 pg/mL) em amostras de sangue total de indivíduos saudáveis, as plaquetas ficaram em um estado de ativação exacerbado, com alterações morfológicas formando pseudópodes e agregados visualizados através de microscopia eletrônica de varredura (79). Contrariamente, citocinas anti-inflamatórias

tais como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-13 diminuíram a expressão de TF induzida por vários estímulos incluindo LPS, TNF, IL-1, CCL2 e proteína C reativa (80–82).

Para além da interferência na ativação da cascata de coagulação, as citocinas pró-inflamatórias também alteram os mecanismos anticoagulantes, como por exemplo na via reguladora da APC. A disponibilidade desta proteína reguladora é de suma importância de forma a prevenir a formação excessiva de fibrina. Quando primatas não humanos receberam injeção letal de *Escherichia coli* ( $4 \times 10^{10}$  unidades de formação de colônias de *E. coli*/kg) e posteriormente uma infusão de APC, foi possível prevenir o estado de hipercoagulabilidade e morte dos indivíduos. Todos os primatas não humanos que receberam a injeção de APC, tiveram concentrações superiores de fibrinogênio quando comparados com o grupo que não recebeu o tratamento, maior número de plaquetas e menor quantidade de  $F_{1+2}$ . Nenhum dos indivíduos apresentou evidências de complicações hemorrágicas (83). Já o bloqueio desta proteína com um anticorpo monoclonal teve o efeito inverso conforme esperado, exacerbou a letalidade à *E coli* sendo que as concentrações subletais (10% da concentração letal) passaram a ser letais (83).

As plaquetas além de mediadoras da trombose, também intervêm diretamente na resposta imune. Elas são capazes de induzir respostas de fase aguda, uma vez que, após estímulo, ocorre o *splicing* do pré-mRNA de IL-1 $\beta$ , tradução do mRNA em pro-IL-1 $\beta$  e processamento da caspase-1, resultando na liberação da IL-1 $\beta$  funcional pelas mesmas (84). Em modelo murinho de malária cerebral, foi observada no início da infecção, a ativação das plaquetas e liberação de IL-1 $\beta$ , envolvida na produção de proteína C reativa, proteínas do complemento, entre outras (85). Além disso, as plaquetas também possuem receptores do tipo Toll (TLR), incluindo TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR8, e TLR9. A sinalização através desses receptores, leva à ativação de plaquetas e tem um papel importante na trombose (86). As plaquetas também estão envolvidas na resposta imune adaptativa, nomeadamente ao nível do “*trafficking*” de linfócitos T, sua ativação e diferenciação. Um exemplo disso é a expressão de CD154 (CD40L) pelas plaquetas, molécula fundamental para ativação de células dendríticas e aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão, que aumentarão a apresentação de antígenos (86).

Por último, a inflamação também parece ter uma interação com a fibrinólise. Em um estudo de 120 pacientes com tuberculose ativa, foi obtida uma forte correlação entre a produção de IFN- $\gamma$  e ativação da fibrinólise, medida pela concentração de FDP. Esses valores baixaram conforme os pacientes foram tratados (87). Infusão de



TNF recombinante em indivíduos saudáveis inibiu a produção de plasmina assim como observado em humanos com endotoxemia (88).

#### **1.4. Distúrbios hemostáticos em doenças infecciosas**

Modificações em diversos parâmetros relacionados com hemostasia primária ou secundária podem apontar para uma manifestação patológica, seja ela inflamatória, infecciosa ou ambas. Um desses inúmeros casos é a infecção pelo vírus da dengue em humanos. Esta infecção pode apresentar uma forma moderada da doença ou uma forma mais grave, dengue hemorrágica/síndrome do choque da dengue (89). Pacientes com dengue hemorrágica apresentam baixa quantidade de plaquetas no sangue (trombocitopenia), prolongamento do aPTT e aumento de tPA na fase aguda da doença (89). Estes dados indicam a ativação da cascata de coagulação e da fibrinólise (90). Na infecção pelo vírus Ebola, também são relatadas hemorragias em 18% dos casos (91), trombocitopenia (45%), aumento do hematócrito (15%) e ainda granulocitose (42%) (92). Resultados obtidos em modelo experimental de Ebola com primatas não humanos, demonstraram expressão aumentada de TF nos monócitos e macrófagos desses animais assim como maior quantidade de mRNA do TF nas suas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (93). Pacientes com infecções bacterianas, como é o caso da leptospirose, também podem apresentar distúrbios hemostáticos tais como trombocitopenia, anemia e leucocitose (94). Em um estudo longitudinal com 52 pacientes infectados pela *Leptospira*, todos os pacientes apresentaram prolongamento do PT, aumento do TAT, F<sub>1+2</sub> e D-dímero, concentrações reduzidas de proteínas anticoagulantes tais como AT e proteína C e atividade aumentada de PAI-1. Estes parâmetros encontravam-se mais alterados nos pacientes que foram a óbito. Além disso, cerca de 60% dos pacientes apresentaram hemorragias (95).

Em relação às infecções parasitárias, a infecção pelo *Plasmodium falciparum* causador da malária tem como sintomas desorientação, sonolência, convulsões (no caso da malária cerebral), dificuldades respiratórias, disfunção hepática e alterações hemostáticas com uma anemia grave e, por vezes, sangramentos anormais (96). Nos casos mais graves e com maior mortalidade alguns pacientes (varia entre menos de 10% a 25%) apresentam coagulação intravascular disseminada (DIC) com quadro de trombocitopenia, consumo de fatores de coagulação e distúrbios na

síntese dos mesmos (96). Na Tabela 1.1 são representados os mecanismos patofisiológicos de coagulopatia em malária causada pela espécie *P. falciparum*.

**Tabela 1.1 Mecanismos patofisiológicos de coagulopatia em malária**

Trombocitopenia	Diminuição do tempo de vida das plaquetas por consumo ou destruição imune, aumento do seu “uptake” pelo baço ou diminuição da sua produção pela medula (96–98)
Ativação da coagulação	Aumento da expressão de TF; diminuição das concentrações plasmáticas de AT e aumento das concentrações de TAT (97) Gravidade da doença está frequentemente associada ao grau das alterações de coagulação e em alguns estudos, ambos estão correlacionados com a parasitemia (96)
Desregulação da fibrinólise	Altas concentrações de PAI-1 e baixas de tPA; quantidades elevadas de FDP (97)
Citocinas	Concentrações séricas de TNF e IL-6 elevadas antes do tratamento com antimalárico (96,97)
Ativação das células endoteliais	Identificação por imunohistoquímica de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), E-selectina, factor inibitório de migração de macrófagos (MIF), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), receptor de uPA e TF no endotélio; aumento das concentrações plasmáticas de thrombomodulina e vWF e das formas solúveis de moléculas de adesão sICAM-1, sVCAM-1 e sE-selectina (96,97)

Cães naturalmente infectados com Leishmaniose canina podem exibir manifestações hemorrágicas tais como epistaxe e hematúria. Em um trabalho com amostras de 33 cães naturalmente infectados, foram encontradas deficiências na

agregação plaquetária em todos os grupos, oligossintomáticos (Grupo I), sintomáticos (Grupo II) e fortemente sintomáticos (Grupo III). Foi também observada trombocitopenia no grupo III e prolongamentos de aPTT nos Grupos II e III. Desta forma, concluiu-se que as alterações na hemostasia primária e secundária estavam diretamente relacionadas com o comprometimento clínico dos animais (99).

Pacientes infectados com o helminto *Schistosoma mansoni* podem apresentar complicações clínicas associadas a alterações do sistema de coagulação e da fibrinólise, tais como episódios de hemorragia digestiva, dano hepático e hipertensão portal (100). Dados de um estudo com 55 pacientes de Pernambuco revelaram uma diminuição de 50% do número de plaquetas e concentrações significativamente menores de FVII, proteína C e PAI-1 (um terço das concentrações do grupo controle) quando comparados com os controles. Além disso, a quantidade de D-dímero medida foi 2,2 vezes maior que a dos indivíduos saudáveis (100).

Estes achados demonstram que doenças causadas por agentes infecciosos podem originar coagulopatias e conseqüentemente aumentar a morbidade destas doenças.

### **1.5. Alterações hematológicas descritas em doença de Chagas**

Existem poucos trabalhos sobre hemostasia em DC, principalmente acerca da hemostasia secundária. Em relação aos hemogramas, é relatado um decréscimo no número de plaquetas tanto em humanos na fase aguda da doença (34,101) quanto em modelos experimentais (101–104). Essa trombocitopenia foi mais intensa em camundongos infectados pela via intraperitoneal com cepa Y (DTU II) do que com cepa CL (DTU VI) e reversível quando os valores de parasitemia baixavam (54). Em estudos de transmissão vertical com ratos Wistar, ocorreram alterações hematológicas durante a fase aguda da DC (102). Dentre essas alterações destacam-se anemia, leucocitose pronunciada, linfopenia, neutrofilia, trombocitopenia e hipoglicemia. Outro trabalho sugeriu um mecanismo para trombocitopenia envolvendo a enzima transialidase do parasito que depleta o ácido siálico das plaquetas induzindo uma remoção acelerada das plaquetas o que resulta na trombocitopenia (102). Estas alterações ao nível das plaquetas são transientes e são prevenidas quando ocorre o tratamento com uma droga tripanocida (105).

No que se refere ao estudo da coagulação, não existe nenhum trabalho em modelo experimental nem com pacientes na fase aguda. Os poucos trabalhos da literatura existentes abordam a fase crônica da DC (106–109). Herrera e seus colaboradores nos seus primeiros estudos (106,107) observaram que pacientes crônicos com poucas ou nenhuma limitação de atividade física, apresentavam aumentos significativos de marcadores de trombose tais como F1+2, ATM, FDP e D-dímero sugerindo a existência de um estado pró-trombótico nesses pacientes. Mais tarde, o mesmo grupo verificou que pacientes crônicos assintomáticos apresentavam um estado inflamatório (com alta produção de IL-6) e um estado pró-trombótico (maiores concentrações de PAI-1, F<sub>1+2</sub>, D-dímero e fibrinogênio). Um outro estudo abordando hemostasia secundária, comparou pacientes com insuficiência cardíaca (fração de ejeção do ventrículo esquerdo <45%) não portadores da DC com pacientes com CCC (105). Os primeiros apresentaram concentrações significativamente mais altas de fibrinogênio (343,2 mg/dl ± 69,63 vs 315,0 mg/dl ± 70,41; p =0.02). Além disso, parâmetros da tromboelastografia também estavam significativamente mais elevados nos pacientes com insuficiência cardíaca. Deste modo, os autores afirmam que não existem evidências de um estado pró-trombótico nos pacientes portadores da DC quando comparados com indivíduos cardiopatas não portadores da DC (105).

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a transmissão oral pelo *T. cruzi* representa a via preponderante de infecção no Brasil e em outros países da América Latina. Interessantemente, esta rota de infecção apresenta, durante a fase aguda, sintomas distintos das vias de transmissão vetorial, congênita e transfusional, tais como edema de face e membros superiores e inferiores e, em alguns casos, manifestações hemorrágicas e risco de tromboembolismo.

O modelo experimental de infecção oral com a aplicação do inóculo do parasito diretamente na cavidade oral dos animais se mostra mais próximo do que ocorre na natureza e se encontra bem estabelecido pelo grupo. Nesse modelo foi demonstrada a presença de concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IFN- $\gamma$  no soro dos camundongos infectados pela via oral. Essas citocinas Th1 estão envolvidas num intenso "crosstalk" com o sistema hematológico uma vez que durante a inflamação aguda, ocorre ativação da cascata de coagulação e alterações nas vias anticoagulantes e de fibrinólise. Não obstante, existem poucos estudos que abordem esta via de infecção e mais especificamente, a interação entre o sistema imunológico e hemostático na DC. Até ao momento, não existe nenhum trabalho que descreva esta interface durante a fase aguda da DC.

Desse modo, este estudo visa esclarecer se existem ou não distúrbios hematológicos durante a infecção oral e a relação das citocinas inflamatórias com a hemostasia no contexto DC para compreensão da sua participação na patogênese da doença.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Estudar alterações na hemostasia primária e secundária na fase aguda da DC em modelo murino de transmissão oral e os mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- i) Quantificar a presença de tripomastigotas sanguíneos em animais infectados pelo *T. cruzi* por via oral durante a fase aguda;
- ii) Determinar o perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 após infecção oral pelo *T. cruzi*;
- iii) Analisar hemograma e avaliar a função hemostática das plaquetas dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* pela via oral;
- iv) Estudar tempos de coagulação do plasma sanguíneo e o perfil de expressão de fatores de coagulação após a infecção oral;
- v) Bloquear as vias de sinalização de TNF e IL-6 e verificar os seus efeitos nos testes hematológicos e suas consequências biológicas em animais infectados pelo *T. cruzi* por via oral;
- vi) Avaliar as alterações hematológicas dos animais infectados em outra via de inoculação (subcutânea) e comparar com via de infecção oral.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais e infecção

Para a infecção oral foram utilizados camundongos BALB/c machos com idade entre 6 a 8 semanas. Os animais foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). O projeto foi realizado sob licença pela Comissão de Ética de Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA) (L-028/16). Para obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* (cepa Tulahuén), foram infectados triatomíneos (*T. infestans*) e coletadas as suas fezes após alimentação com sangue de camundongo (a cada 20 dias). As formas tripomastigotas metacíclicas presentes na excreta foram contadas em câmara de Neubauer e posteriormente centrifugadas. Os animais foram oralmente infectados com um inóculo de  $5 \times 10^4$  formas tripomastigotas metacíclicas - volume final 50  $\mu$ L de excreta. Antes da infecção, os animais foram mantidos sem água e comida por cerca 4 h e cerca de 15 min depois do inóculo. No caso da infecção pela via subcutânea (SC), os animais foram inoculados na região dorsal com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas em 50  $\mu$ L de meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich, EUA) com 10% soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil).

### 4.2. Parasitemia e sobrevivência

A quantificação das formas tripomastigotas sanguíneas foi feita isolando 5  $\mu$ L de sangue da porção distal da cauda de camundongos infectados e contando as formas presentes em 50 campos entre lâmina e lamínula (18x18mm) utilizando o microscópio óptico de campo claro (aumento 400x). O número de parasitos/mL de sangue foi calculado através do método de Pizzi-Brener e usando as seguintes fórmulas:

$$f = \left( \frac{A_{\text{lamínula}}}{A_{\text{campo}}} \right) \times 200$$

Sendo f=Fator f,  $A_{\text{lamínula}}$  = área da lamínula e  $A_{\text{campo}}$ = área do campo

$$\text{Parasitos/mL} = \left( \frac{n}{50} \right) \times f$$

Sendo n o número de parasitos contados em 50 campos com um aumento de 400x.

A sobrevivência dos camundongos infectados foi determinada através da observação diária dos animais durante o período de infecção.

#### **4.3. “Cytometric bead array” (CBA)**

Para realização do CBA foram coletadas amostras de plasma citrado de camundongos controle e infectados. As amostras foram armazenadas a -70°C até o momento da análise. As concentrações de citocinas foram obtidas por citometria de fluxo no citômetro FACSCanto II utilizando o kit CBA Th1, Th2 e Th17 (BD, EUA) e o “software” “FCAP Array” (versão 3.0) (BD, EUA) de acordo com as orientações do fabricante.

#### **4.4. Hemogramas e análises bioquímicas**

As amostras de sangue total para exames hematológicos foram coletadas por punção cardíaca de camundongos infectados e colocadas em microtubos com anticoagulante K2EDTA e invertidas 5 a 8 vezes logo após a coleta do sangue, evitando assim a formação de microcoágulos. As amostras foram então entregues na Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz. A contagem foi feita utilizando um analisador hematológico automático Poch 100- iV DIFF (Sysmex, Kobe, Japão).

Para a realização de análises bioquímicas, mais especificamente, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina, fosfatase alcalina e proteínas totais, 500 µL de sangue foram colocados em microtubos com gel separador e após coagulação da amostra (cerca de 10 min), procedeu-se à centrifugação (1500g por 10 min) e coleta do soro.

#### **4.5. Quantificação dos fatores de coagulação**

As concentrações dos Fatores V, VII, VIII e D-dímero no soro foram determinadas com a utilização de kits de ELISA específicos (Elabscience Biotechnology, China) de acordo com as especificações do fabricante.



#### **4.6. Tempos de coagulação aPTT e PT**

aPTT e TP foram medidos em um coagulômetro SStart® 4 stago (Diagnostica Stago, EUA). No caso do aPTT, 50 µL de plasma murino citrado foram incubados em cubetas apropriadas e colocados no coagulômetro durante 2 min a 37°C. Depois, adicionaram-se 50 µL do reagente aPTT pré-aquecido (STA® PTT; Diagnostica Stago, França) e incubou-se por 2 min. De forma a começar a reação, foram adicionados 50 µL de CaCl<sub>2</sub> (25 mM). No caso do PT, 50 µL de plasma foram incubados durante 2 min a 37°C sendo adicionados posteriormente 100 µL do reagente PT (NEO plastine CI plus; Diagnostica Stago, EUA). O tempo de formação do coágulo foi analisado em triplicata.

#### **4.7. Ensaio de sangramento da cauda**

Os camundongos foram anestesiados com xilazina intramuscular (16 mg/kg) (Syntec, Brasil) seguida de quetamina (100 mg/kg) (Syntec, Brasil). Após 15 min depois foram cortados 2 mm da sua cauda e esta foi imediatamente imersa em 40 mL de água destilada pré-aquecida a 37°C. As amostras foram homogeneizadas e a absorbância a 540 nm foi determinada de forma a estimar o conteúdo de hemoglobina. Não foi permitido que nenhum animal sangrasse mais do que 30 min. A perda de sangue foi determinada como função da concentração de hemoglobina presente na água (absorbância a 540 nm).

#### **4.8. Tratamento *in vivo* com anticorpos contra IL-6R e TNF**

Camundongos dos grupos controle e infectados pela via oral foram tratados intraperitonealmente com anticorpos monoclonais contra o receptor da interleucina-6 (IL-6R) (8mg/kg Tocilizumabe, Actemra®, Roche, Suíça) ou uma proteína quimérica contra TNF (0,83 mg/kg Etanercept Enbrel®, Wyeth Pharmaceuticals, EUA). Ambos os tratamentos começaram no 14 dpi. No caso do anticorpo contra IL-6R foram aplicadas doses subsequentes a cada 48h, assim como no grupo controle de isotipo (8mg/kg Chrompure IgG Jackson Immunoresearch Labs, EUA). Em relação à proteína contra TNF, foi feito somente outro tratamento aos 18 dpi. Os grupos controle receberam o mesmo volume de solução salina (100 µL) e na mesma frequência de tratamento dos camundongos infectados.

#### **4.9. Análise estatística**

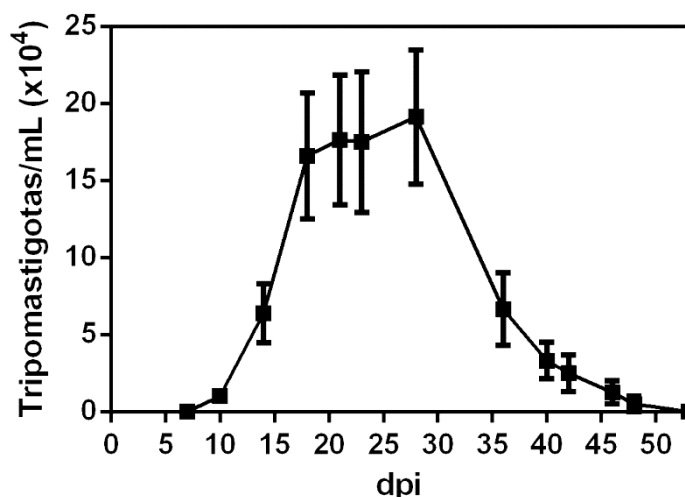
As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 6, aplicando-se, primeiramente, os testes de D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk para verificar se os resultados seguiam uma distribuição Gaussiana. Foi aplicado um teste paramétrico (one-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey's) quando os dados seguiam esta distribuição. Caso as amostras se desviassem da distribuição Gaussiana, foi aplicado um teste não paramétrico (Kruskal–Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn's). Valores  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Foram consideradas as seguintes hipóteses nula e alternativa:

comparação de animais não infectados (NI) com grupo infectado pela via oral (OI):  
 $H_0, OI=NI$ ;  $H_1, OI \neq NI$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. A produção de citocinas pró-inflamatórias ocorreu concomitantemente ao aumento da parasitemia após a infecção oral

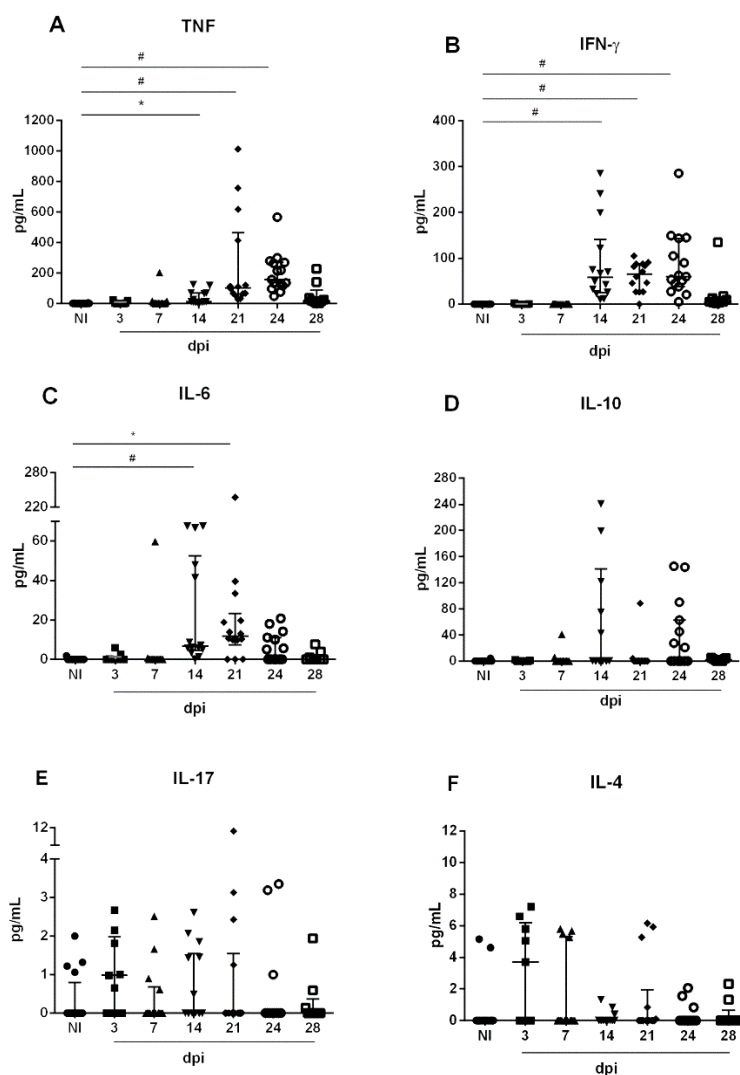
Com o objetivo de caracterizar o estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* pela via oral, foram quantificadas as formas tripomastigotas sanguíneas nos animais infectados. Os parasitos circulantes foram detectados aos 10 dpi correspondendo ao período pré-patente da infecção e atingiram os seus valores mais altos entre os 21-28 dpi (Figura 5.1). Após os 28 dpi, a parasitemia decresceu até não serem detectados mais parasitos, entre os 48-52 dpi dando início à fase crônica da infecção. No decorrer da cinética não foram observados óbitos nos camundongos oralmente infectados.



**Figura 5.1** Curva de parasitemia durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi*. Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. A parasitemia (média e erro padrão da média) foi medida durante a fase aguda. Os parasitos foram contados em microscópio óptico de campo claro e a parasitemia calculada pelo método de Pizzi-Brener. n: 7 dpi=21, 10 e 14 dpi=15, 18 dpi=18, 21 dpi=11, 23 dpi=6, 28 dpi=8; 36, 40, 42, 46, 48 e 53 dpi=4.

Posteriormente, avaliou-se se a infecção causava alterações transientes nas concentrações séricas de citocinas Th1, Th2 e Th17. Como era esperado, os animais oralmente infectados (OI) apresentaram concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias (Th1), no decorrer da infecção, quando comparados com os animais não infectados, NI (Figura 5.2 A-C). Os resultados mais elevados foram obtidos concomitantemente ao pico de parasitemia. No início da infecção, entre os 3-

7 dpi, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações destas citocinas, o que coincide com o período em que a parasitemia não foi detectada. Em relação às citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e IL-4 (Th2) não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com os controles assim como IL-17 (Th17) (Figura 5.2 D-F).



**Figura 5.2** Quantificação de citocinas durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi*. Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. Durante a fase aguda da infecção, foram coletados os soros dos animais NI e OI e posteriormente quantificadas as citocinas Th1, Th2 e Th17 através do método CBA. Os valores representam a mediana com a amplitude interquartil para cada grupo/dias após infecção (dpi) e são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn. \*  $0,0001 < p < 0,05$ , #  $p < 0,0001$ . Diferenças significativas não representadas no gráfico: TNF: 3,7 dpi  $\neq$  21, 24 dpi; IFN- $\gamma$ : 3,7

dpi ≠ 14, 21, 24 dpi; IL-6: 3 dpi ≠ 14 dpi e 7 dpi ≠ 14, 21 dpi. n: NI=16; 3 e 28 dpi=9; 7, 14 e 21 dpi=14; 24 dpi=15.

## 5.2. A infecção oral pelo *T. cruzi* causa trombocitopenia e aumento de sangramento nos camundongos

Foram analisados os hemogramas e parâmetros bioquímicos dos grupos NI e OI aos 7, 14, 21 e 28 dpi. Conforme demonstrado na Tabela 5.1, os animais OI apresentaram um número de plaquetas significativamente mais baixo do que os NI aos 14 e 21 dpi ( $775,4 \pm 62,54 \times 10^3$  e  $840,8 \pm 83,74 \times 10^3/\mu\text{L}$ , respectivamente). Não foram observadas alterações significativas ao nível dos eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio. Além disso, os animais OI apresentaram leucocitose aos 21 e 28 dpi (Tabela 5.1).

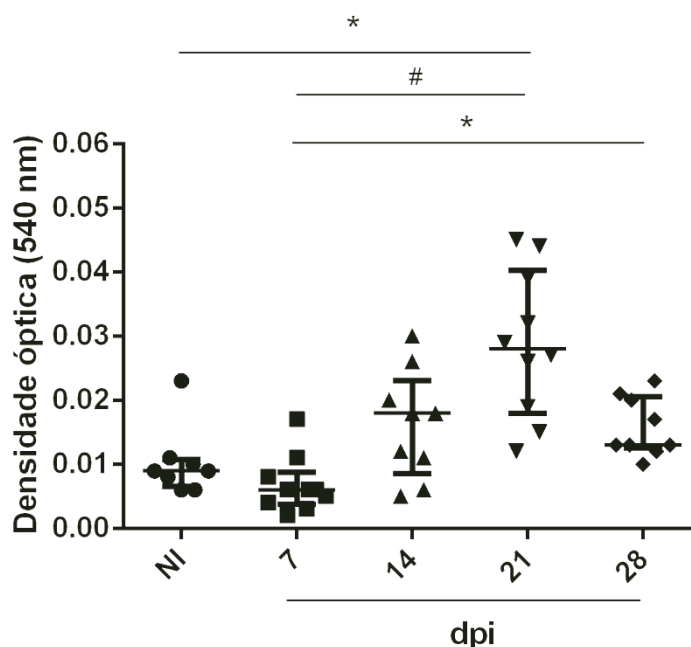
**Tabela 5.1 Hemogramas dos animais não infectados (NI) e infectados oralmente (OI) aos 7, 14, 21 e 28 dpi**

	NI	7	14	21	28
Leucócitos $10^3/\mu\text{L}$	6,6±0,86	9,1±0,41	7,3±0,60	16±2,1*	18±1,4*
Eritrócitos $10^6/\mu\text{L}$	9,8±0,27	11±0,20	9,5±0,21	9,1±0,27	10±0,46
HMG g/dL	14±0,33	16±0,35	14±0,41	13±0,45	13±0,49
VCM fL	52±0,97	52±0,42	49±0,47	53±0,35	49±0,69
HMT	51±0,58	58±1,1	47±1,3	48±1,6	49±1,6
Plaquetas $10^3/\mu\text{L}$	1195±81, 71	1313±101, 0	775,4±62,54*	840,8±83,74*	1282±17,44

Os hemogramas foram obtidos utilizando um analisador hematológico Poch 100- iV DIFF. Os valores representam a média e erro padrão da média para cada grupo/dpi e são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn (\* ≠ NI e  $0,0001 < p < 0,05$ ). Diferenças significativas não representadas na tabela: Leucócitos: 7, 14 dpi ≠ 21, 28 dpi; Eritrócitos: 7 dpi ≠ 21 dpi; HMG: 7 dpi ≠ 21, 28 dpi; VCM: 14 dpi ≠ 21, 28

dpi; HMT: 7 dpi ≠ 14, 21 dpi. n=5). HMG, hemoglobina; VCM, volume corpuscular médio; HMT, hematócrito.

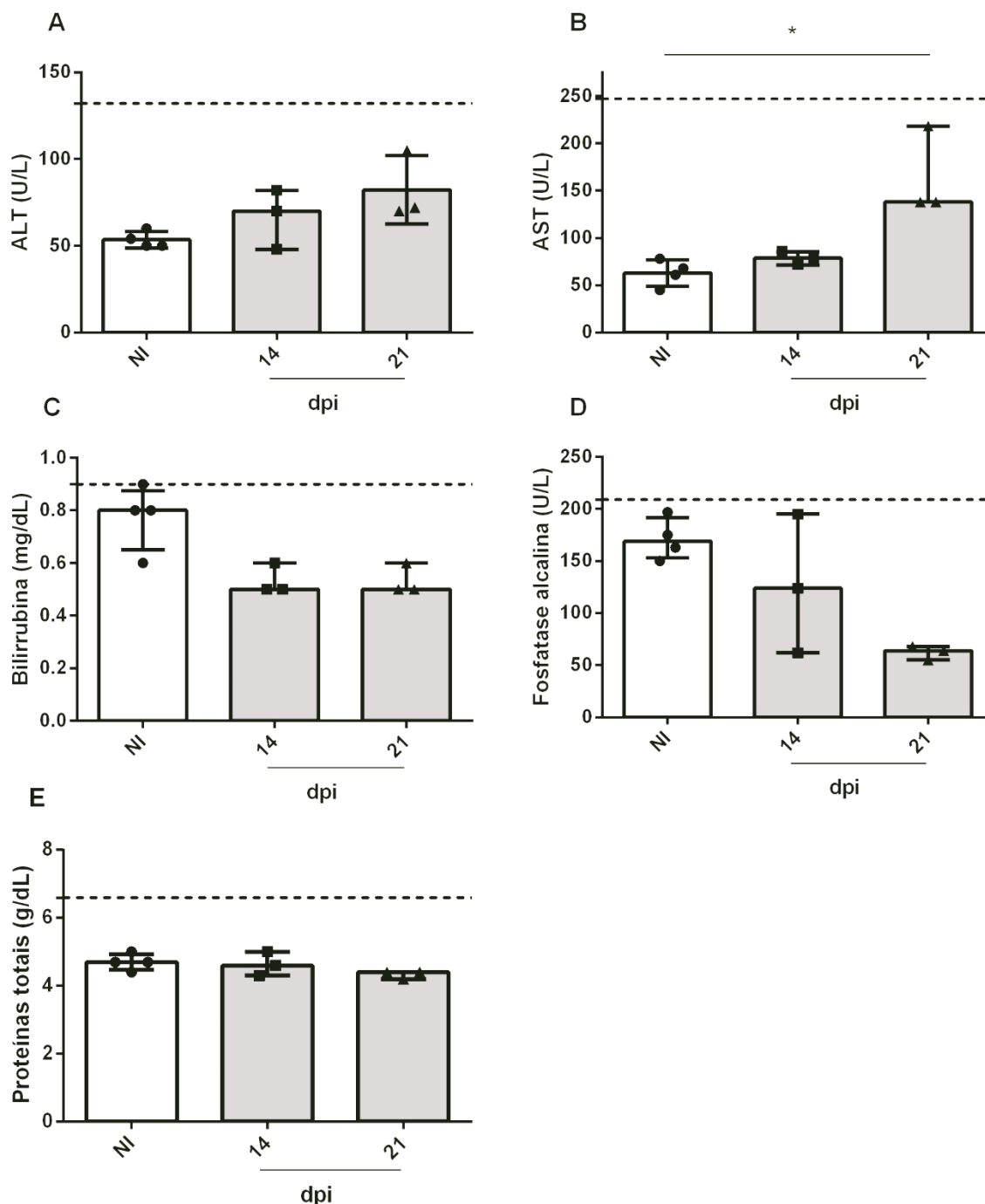
Uma vez que foi observado um decréscimo na contagem de plaquetas, procedeu-se a um ensaio que visa avaliar a sua função *in vivo*. O teste de sangramento consiste no corte da cauda do camundongo, de forma a lesar apenas pequenos vasos e verificar aspetos da hemostasia primária. Na Figura 5.3 é possível observar que os animais OI sangraram significativamente mais aos 21 dpi quando comparados com os NI, ou seja, demoraram mais a formar o tampão plaquetário. Aos 28 dpi, o sangramento diminuiu, coincidindo com contagem de plaquetas no hemograma semelhante à dos animais NI (Tabela 5.1).



**Figura 5.3 Ensaio de sangramento da cauda efetuado aos animais NI e OI 7, 14, 21 e 28 dpi.** Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. Foi medida absorvância a 540 nm de forma a estimar a perda de sangue/concentração de hemoglobina. Os valores representam a mediana com a amplitude interquartil para cada grupo/dpi e são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn (\*  $0,0001 < p < 0,05$ , #  $p < 0,0001$ ).

O fígado é um dos órgãos alvo para o parasito e responsável pela síntese da maioria dos fatores de coagulação. Não se verificaram alterações significativas dos

marcadores de dano hepático como ALT, bilirrubina, fosfatase alcalina e proteínas totais (Figura 5.4 A, C-E) com exceção da AST que teve um aumento significativo aos 21 dpi com a mediana abaixo do limite de referência para *Mus musculus* (110) (Figura 5.4).

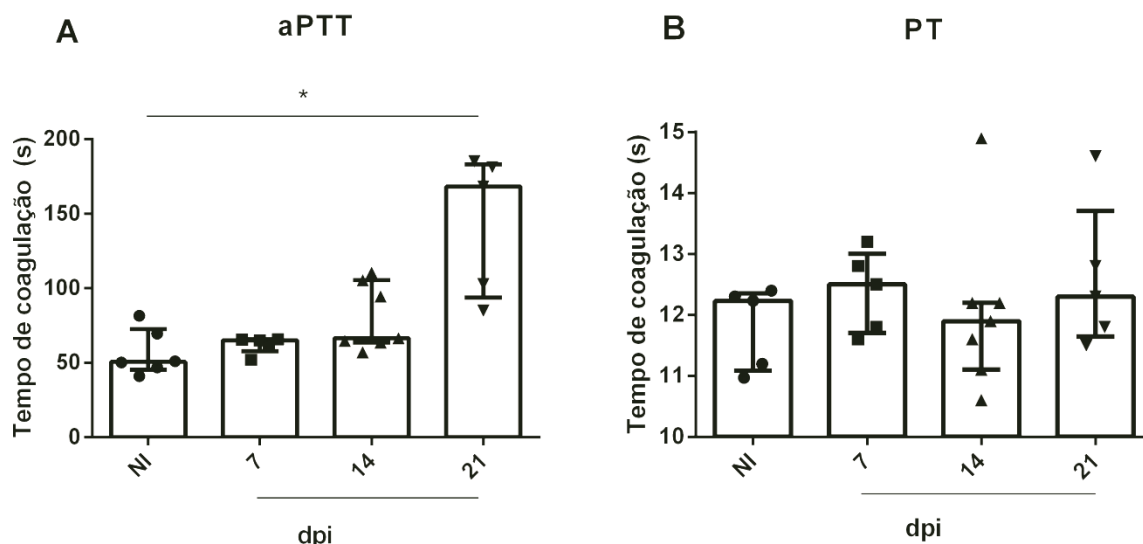


**Figura 5.4** Quantificação de parâmetros bioquímicos relacionados a dano hepático. Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. Os soros dos animais obtidos após punção cardíaca foram analisados utilizando o equipamento Vitros 250. Os valores

representam a mediana com a amplitude interquartil para cada grupo/dpi e são representativos de um experimento. A linha tracejada (- -) corresponde ao valor máximo de referência (110). Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn (\* 0,0001<p<0,05). ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase.

### 5.3. Camundongos OI apresentam sinais de coagulação intravascular disseminada

A coagulação intravascular disseminada (DIC) envolve geração anormal e excessiva de trombina e fibrina no sangue circulante. Durante o processo, ocorre uma diminuição do número de plaquetas e um perfil elevado de citocinas pró-inflamatórias, fenômenos observados no nosso modelo experimental de infecção oral. De forma a testar a hipótese da ocorrência desta coagulopatia, foram coletados plasmas de animais OI e foram determinados os tempos de coagulação aPTT e PT uma vez que em DIC, devido ao consumo de fatores de coagulação, os tempos de coagulação sofrem um aumento assim como os produtos de degradação da fibrina, como é o caso do D-dímero. Como é possível observar na Figura 5.5, a infecção pelo *T. cruzi* resultou em um aumento do aPTT aos 21 dpi contudo não afetou o PT. Este fenômeno é compatível com um desarranjo na via intrínseca da cascata de coagulação, uma vez que o aPTT avalia a atividade funcional desta via.

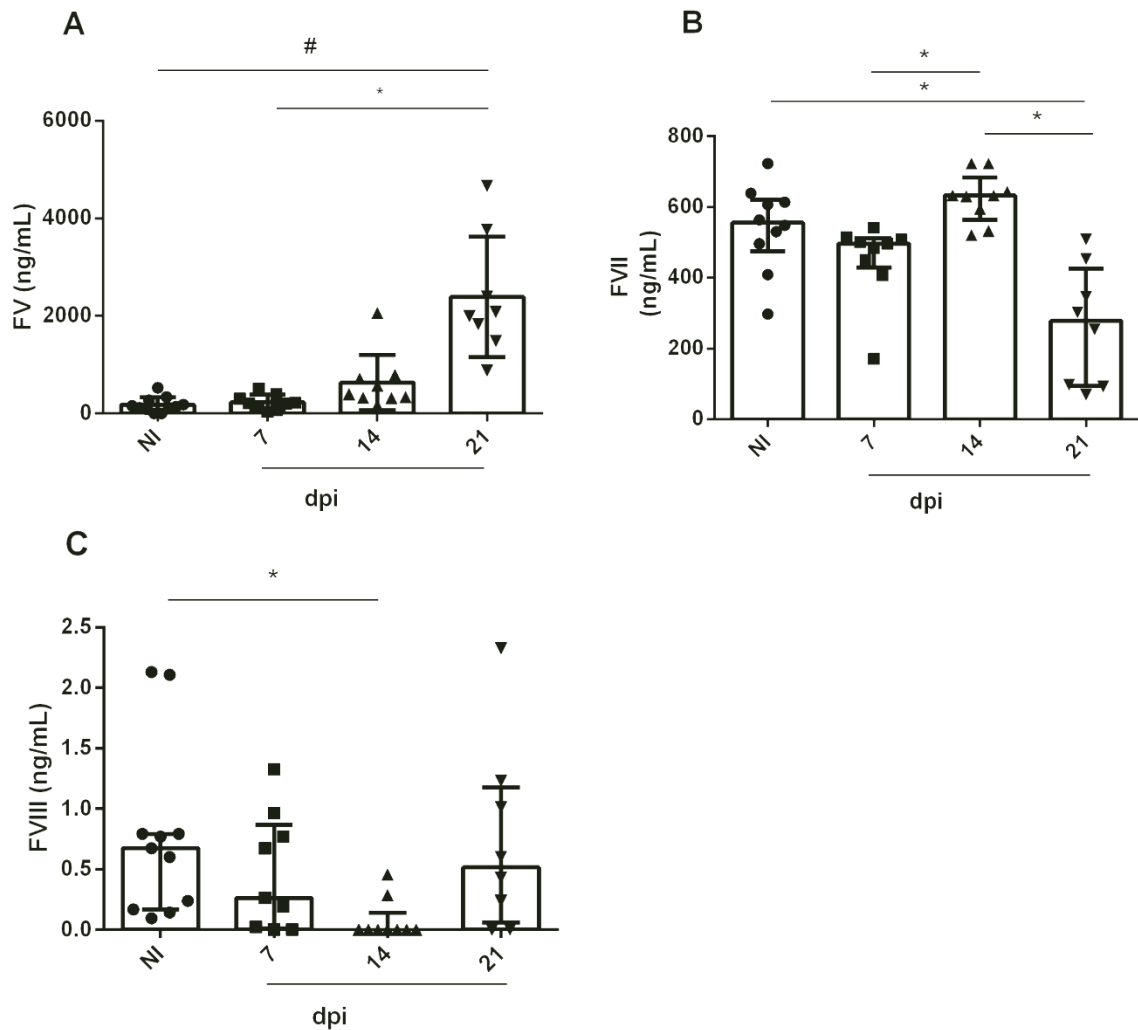


**Figura 5.5** Quantificação de aPTT e PT após infecção oral pelo *T. cruzi*. Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. Foram adicionados às amostras de plasma os reagentes do ensaio aPTT e PT conforme descrito na secção de “Material e métodos” e os



tempos de coagulação foram posteriormente medidos em um coagulômetro. Os valores representam a mediana com a amplitude interquartil para cada grupo/dia após infecção e são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn (\*  $0,0001 < p < 0,05$ ).

Foram medidas também as concentrações dos fatores de coagulação, FV, FVII e FVIII (Figura 5.6). Verificou-se um aumento expressivo do FV aos 21 dpi e uma diminuição significativa do FVII no mesmo dia, quando comparados com os NI (Figura 5.6 A e B). Interessantemente, a quantificação de FVIII (Figura 5.6 C) aos 14 dpi sofreu uma queda significativa, com valores abaixo do limite de detecção do kit para os animais OI. Também se observaram alterações na concentração do D-dímero, marcador da geração e degradação de fibrina, sendo possível detectar este produto aos 14 e 21 dpi (Tabela 5.2).



**Figura 5.6 Alterações nas concentrações séricas dos fatores de coagulação durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi*.** (A) FV ; (B) FVII ; (C) FVIII. Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. Os soros dos animais foram obtidos após punção cardíaca e utilizados para quantificação dos fatores de coagulação por ELISA. Os valores representam a mediana com a amplitude interquartil para cada grupo/dia após infecção e são representativos de dois experimentos independentes. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn (\*  $0,0001 < p < 0,05$ , #  $p < 0,0001$ ).

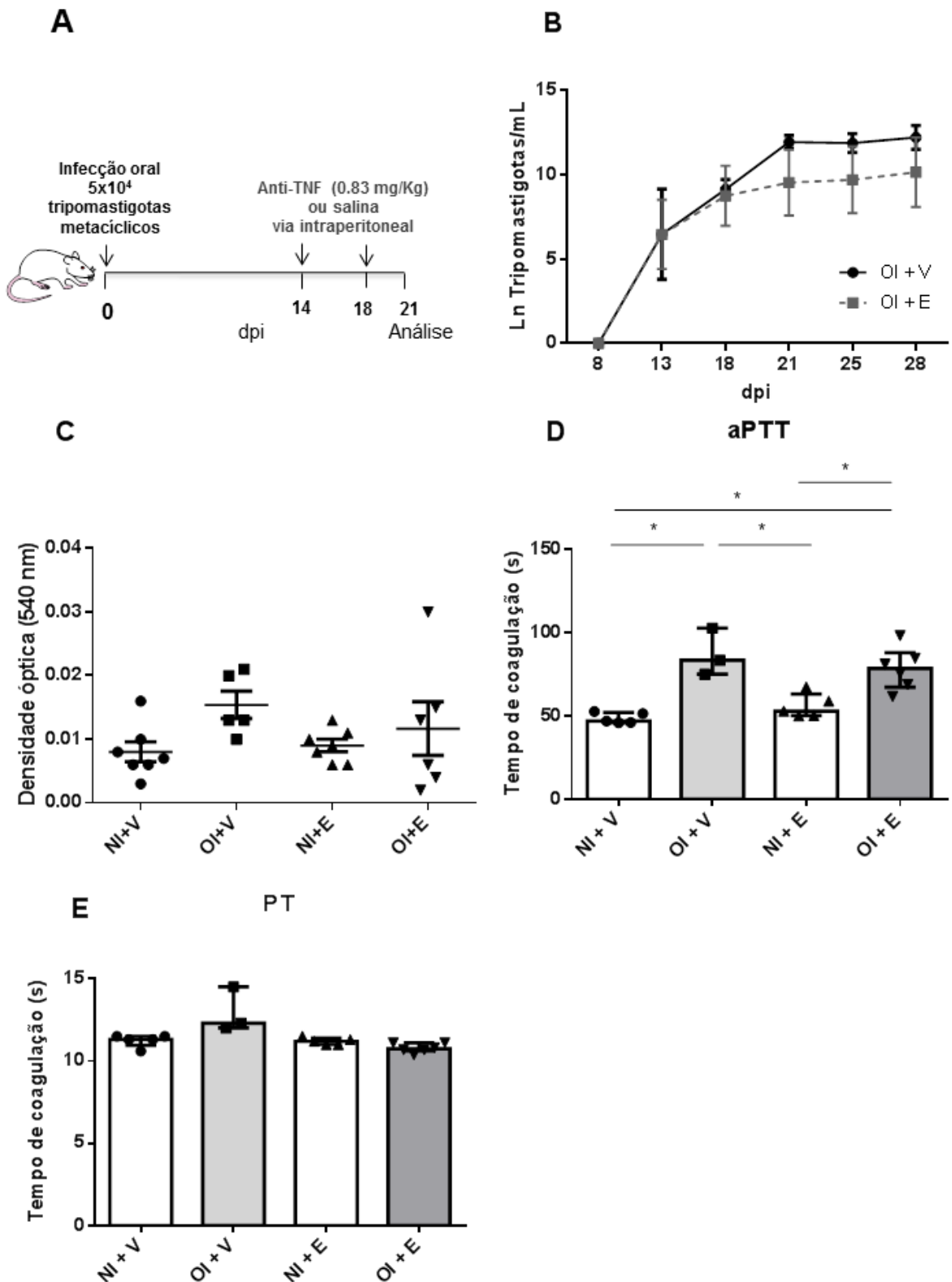
**Tabela 5.2 Quantificação do produto de degradação da fibrina D-dímero no soro durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi***

<b>Grupo</b>	<b>Animais com D-dímero (&gt;0 ng/mL)</b>
NI	0/6
7 dpi	0/5
14 dpi	3/6
21 dpi	2/6

Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. O soro dos animais NI e OI foi utilizado para quantificação do D-dímero através de um ELISA. A média e erro padrão da média nos animais com valores detectáveis de D-dímero foram  $25,7 \pm 7,6$  e  $45,1 \pm 11,0$  ng/mL para 14 e 21 dpi, respectivamente.

#### **5.4. A citocina IL-6 é responsável pelas alterações hematológicas durante a infecção oral pelo *T. cruzi***

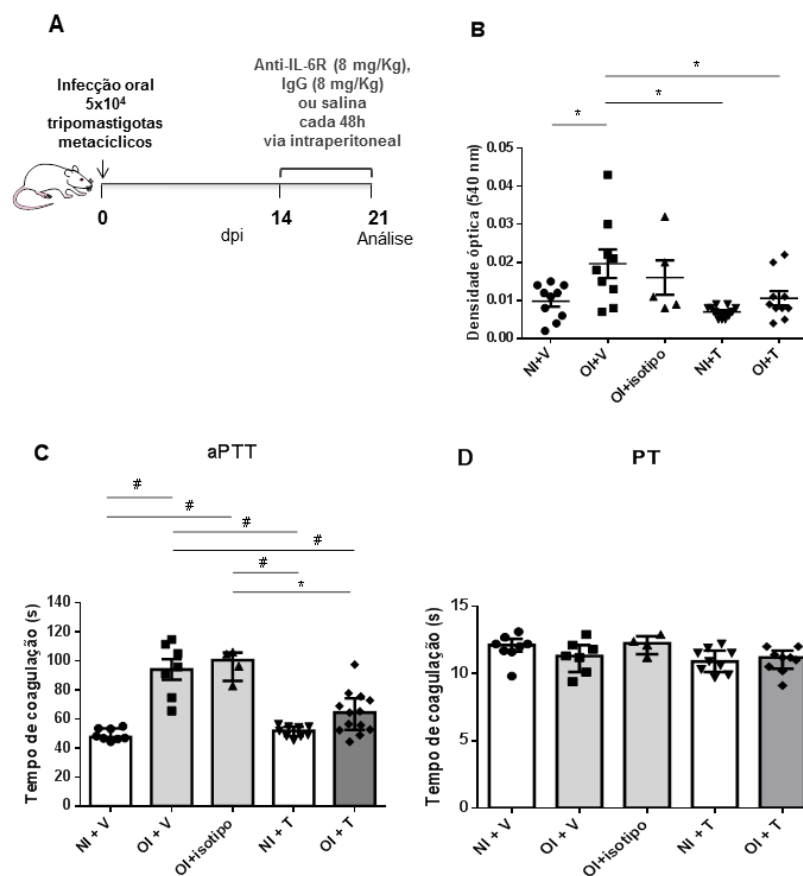
Como demonstrado anteriormente, os camundongos OI secretaram mais citocinas pró-inflamatórias do que os animais NI, principalmente entre os dias 14-24 dpi (Figura 5.2). Dessa forma pretendeu-se testar a hipótese de que o bloqueio de uma dessas citocinas reverteria as alterações hematológicas descritas devido ao intenso "crosstalk" entre sistema imune e sistema hemostático. Foram bloqueadas as vias de sinalização das citocinas TNF e IL-6 utilizando para o efeito uma proteína quimérica para bloqueio de TNF solúvel, Enbrel®, e um anticorpo monoclonal contra o receptor de IL-6, Tocilizumabe/Actemra®. Ambos os tratamentos tiveram início aos 14 dpi (Figura 5.7 A). O tratamento com Enbrel® não afetou a parasitemia conforme já tinha sido demonstrado pelo nosso grupo (Figura 5.7 B). Camundongos OI tratados com Enbrel® (OI+E) não apresentaram alterações no ensaio de sangramento, aPTT e PT em relação aos OI não tratados (OI+V) (Figura 5.7 C- E).



**Figura 5.7 Tratamento com anticorpo contra TNF e alterações hematológicas.** (A) Desenho experimental. Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. O tratamento com Enbrel® teve início aos 14 dpi e foi efetuado novamente aos 18 dpi. (B) Parasitemia (média e erro padrão da média) foi medida até aos 28 dpi. (C) Sangramento. A absorbância foi

medida a 540 nm de forma a estimar a perda de sangue/concentração de hemoglobina. (D) aPTT e (E) PT. (D,E) Valores representam a média e erro padrão da média para cada grupo/ dpi e são representativos de dois experimentos independentes. NI+V: Animais não infectados tratados com veículo. OI+V: Animais oralmente infectados tratados com veículo. NI+E: Grupo não infectado e tratado com Enbrel®. OI+E: Grupo oralmente infectados e tratados com Enbrel®. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste ANOVA com comparação múltipla de Tukey (\* 0,0001<p<0,05).

Notavelmente, o bloqueio do IL-6R teve resultados distintos. Observou-se que os animais tratados com o anticorpo contra IL-6R (OI+T) tiveram valores significativamente mais baixos de sangramento e de aPTT quando comparados com os OI+V e não tiveram diferenças em relação aos camundongos NI tratados com veículo ou com Tocilizumabe (NI+V e NI+T) (Figura 5.8). Estes resultados sugerem que o bloqueio de IL-6R é capaz de atenuar as alterações no sistema hemostático causadas pela infecção pelo *T. cruzi* enquanto que o bloqueio de TNF não consegue reproduzir o mesmo efeito.



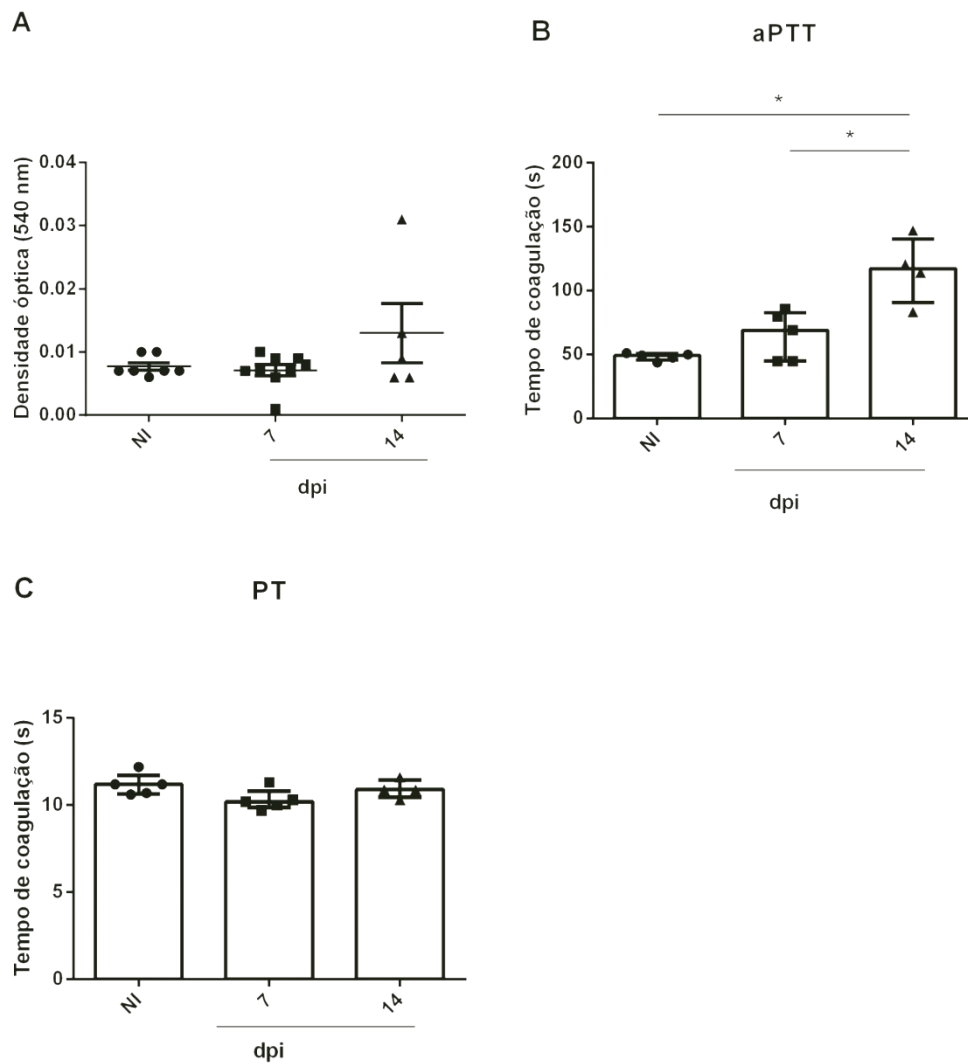
**Figura 5.8 Tratamento com anticorpo contra IL-6R e alterações hematológicas.** (A) Desenho experimental. Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via oral com

$5 \times 10^4$  tripomastigotas metacíclicos derivados de excreta de *T. infestans*. O tratamento com Tocilizumabe ou com IgG teve início aos 14 dpi e foi efetuado a cada 48h. (B) Sangramento. A absorvância foi medida a 540 nm de forma a estimar a perda de sangue/concentração de hemoglobina. (C) aPTT e (D) PT. (B, C e D) Valores representam a média e erro padrão da média para cada grupo/dia após infecção (dpi) e são representativos de dois experimentos independentes. NI+V: Animais não infectados tratados com veículo. OI+V: Animais oralmente infectados tratados com veículo. OI+isotipo: Animais oralmente infectados tratados com IgG. NI+T: Grupo não infectado e tratado com anticorpo contra IL-6R. OI+T: Grupo oralmente infectados e tratados com anticorpo contra IL-6R. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste ANOVA com comparação múltipla de Tukey (\*  $0,0001 < p < 0,05$ ; #  $p < 0,0001$ ).

### **5.5. A infecção pela via subcutânea também causa alterações hemostáticas**

Observou-se que a infecção oral promove alterações hemostáticas dependentes da via de sinalização de IL-6. Contudo, pretendeu-se verificar se essas mudanças estariam relacionadas à via de transmissão oral ou à presença do parasito na corrente sanguínea. Por esse motivo, camundongos foram infectados com o mesmo inóculo ( $5 \times 10^4$  tripomastigotas) por uma via de inoculação parenteral, mais especificamente pela via SC.

Estes resultados demonstraram que os distúrbios hematológicos não são específicos da via de inoculação oral uma vez que os animais SC também apresentaram aumento significativo de aPTT, mas não de sangramento e PT (Figura 5.9). Diferentemente dos camundongos OI, as alterações nos animais SC começaram aos 14 dpi, previamente às alterações dos animais OI (21 dpi). Não foram analisados pontos posteriores a 14 dpi, uma vez que todos os animais morreram entre 15 e 16 dpi.



**Figura 5.9 Ensaio hemostático após infecção subcutânea pelo *T. cruzi*.** (A) Sangramento da cauda. Camundongos machos BALB/c foram infectados pela via subcutânea com  $5 \times 10^4$  tripomastigotas derivados de cultura. Foi medida absorvância a 540 nm de forma a estimar a perda de sangue/concentração de hemoglobina. (B) aPTT (C) PT. Os valores representam a média e erro padrão da média para cada grupo/dia após infecção (dpi). Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste ANOVA com comparação múltipla de Tukey (\*  $0,0001 < p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

No Brasil, a incidência da transmissão oral da DC tem aumentado nos últimos anos, sendo a via preponderante no país (representando aproximadamente 70% dos casos) (3,16,17,27). Durante a fase aguda alguns pacientes apresentam sintomas tais como edema de face e de membros inferiores, sinais hemorrágicos (epistaxe, períodos menstruais mais intensos, petéquias) e ainda, risco de tromboembolismo (3,34–36,111). Casos críticos que resultam em óbito dos pacientes estão na maioria das vezes relacionados a miocardite aguda e a manifestações hemorrágicas digestivas graves (3).

Apesar de não existirem dados com pacientes na fase aguda da DC, foi demonstrado que a infecção oral pelo *T. cruzi* em modelo experimental gera uma resposta imune sistêmica com elevadas concentrações séricas de citocinas Th1, de caráter pró-inflamatório, essenciais para o controle do parasitismo (39,112). Essas mesmas citocinas, estão envolvidas em um intenso “crosstalk” com o sistema hemostático, amplamente descrito na literatura (53,71,76,77,88,113–115). Desta forma, é de grande interesse estudar a interação entre o sistema imunológico e o sistema hemostático no modelo infecção oral aguda para melhor compreender a patogênese da doença.

Neste trabalho, observou-se que os animais OI secretaram concentrações mais altas de TNF, IL-6 e IFN- $\gamma$  do que os camundongos NI, mostrando que a infecção oral desencadeia uma potente resposta pró-inflamatória sistêmica. Estes achados são consistentes com estudos prévios onde foi mostrado que a cepa Tulahuén induz produção de TNF e IFN- $\gamma$  em camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados pela via subcutânea (116) ou pela via oral (39). As quantidades elevadas de TNF também estão envolvidas no choque tóxico observado em camundongos deficientes para IL-10 infectados intraperitonealmente com 50 tripomastigotas sanguíneos desta mesma cepa (43) assim como nos danos cardíacos, hepáticos e esplênicos (39,117). Os pacientes portadores da DC na fase crônica também apresentam concentrações mais elevadas de IL-6 e TNF- $\alpha$  quando comparados com indivíduos saudáveis (108,118,119). Interessantemente, as citocinas pró-inflamatórias exercem efeito sobre as vias de coagulação e de fibrinólise. O TF é fortemente induzido e expresso na superfície de células endoteliais e monócitos após estímulos inflamatórios (72). As citocinas com capacidade para induzir esta expressão são TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$



e a quimiocina CCL2 (71)(73). Quando indivíduos saudáveis foram sujeitos a injeções de doses baixas de LPS em um estudo de sepse, observou-se um aumento do mRNA do TF de 125 vezes no sangue total (120). Nesse sentido, seria interessante quantificar o mRNA do TF neste modelo de infecção oral assim como o TF circulante.

Ademais, o bloqueio de IL-6 com um anticorpo monoclonal em um modelo experimental de primatas não humanos, preveniu a ativação da coagulação uma vez que ocorreu uma diminuição significativa do  $F_{1+2}$  e do TAT (77). Contrariamente ao que era esperado, o mesmo tratamento em humanos saudáveis injetados com LPS não originou resultados semelhantes, dado que o mRNA do TF não sofreu alterações nem as concentrações plasmáticas de  $F_{1+2}$ , TAT e D-dímero (78). A IL-6 também está relacionada à trombogenicidade das plaquetas uma vez que após a adição desta citocina a amostras de sangue de indivíduos sadios, ocorreu um espalhamento e agregação das mesmas indicando um estado de ativação exacerbada (77). Seria de extrema relevância neste trabalho, proceder a uma análise da funcionalidade das plaquetas nos animais infectados, verificar o seu estado de ativação, quer através de análises morfológicas ou por ensaios de ativação/agregação plaquetária.

Também já foi demonstrado que a infecção pelo *T. cruzi* causa anemia, trombocitopenia e leucocitose na fase aguda da doença (1,3,34,121). Em modelo experimental, camundongos inoculados pelas vias intraperitoneal ou subcutânea com diferentes cepas, também tiveram um decréscimo significativo no número de plaquetas durante a fase aguda da infecção (105,122). Os mecanismos moleculares envolvidos ainda não são completamente conhecidos e estabelecidos, mas uma das hipóteses é uma supressão da hematopoese na medula óssea (105). Outros autores defendem que a trombocitopenia se deve a um remoção acelerada das plaquetas depois da depleção do seu ácido siálico pela transialidase do parasito (104). Em uma revisão de 31 trabalhos publicados acerca de mudanças hematológicas em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi*, 50% dos estudos reportaram anemia (123). A anemia pode estar associada a perda de sangue, supressão da hematopoese ou patologias da medula óssea (123). Apesar de não terem sido observadas alterações significativas nos hemogramas dos animais infectados quando comparados com os controles, as concentrações mais baixas de eritrócitos e hemoglobina foram obtidas em 21 dpi, coincidindo com o maior sangramento. Várias

hipóteses podem justificar esta diferença: i) na revisão foram analisados trabalhos com diferentes espécies de animais e de cepas; ii) inóculos distintos ; iii) nenhum dos trabalhos da revisão abordou a via de inoculação oral (123). Esta via já mostrou ter bastante diferença em relação à resposta imune, infectividade, parasitemia e mortalidade quando comparada com vias sistêmicas (IP) ou outras vias de mucosa (IG) (119). Adicionalmente, números elevados de leucócitos também foram observados no nosso estudo aos 21 e 28 dpi. Alterações no número de leucócitos são frequentes em infecções virais, bacterianas ou por protozoários (124). Este resultado também já foi descrito tanto em pacientes na fase aguda da DC como em modelos experimentais (102,104,123,125,126). Na revisão anteriormente citada, 68.2% dos estudos considerados referiram leucocitose nos animais, entretanto o trabalho não analisou diferenças nas contagens de plaquetas (123). Aos 21 dpi, o número de plaquetas quantificado foi significativamente mais baixo nos animais OI quando comparado com os NI e além disso, observou-se um comprometimento da função plaquetária pelo ensaio de sangramento de cauda. A trombocitopenia em humanos com plaquetas funcionais raramente resulta em sintomas hemorrágicos com a exceção de algumas hemorragias que apresentam risco de vida (127,128). Em contraste, camundongos com trombocitopenia grave e inflamação apresentam hemorragias espontâneas em diferentes órgãos (129). Futuramente, pretendem-se analisar histologicamente os pulmões e outros órgãos dos animais OI, a fim de verificar a existência de hemorragias nesses órgãos.

Além das alterações de sangramento, também foram observadas alterações de coagulação, através do aumento do aPTT. Os resultados deste ensaio indicam anomalias na via intrínseca da coagulação, mais especificamente, nos fatores necessários para a formação do ativador intrínseco da protrombina, ou seja, nos fatores VIII, IX, XI e XII. Corroborando este resultado, foi observada uma diminuição significativa do FVIII aos 14 dpi e foi possível detectar neste ponto e em 21 dpi, o marcador de ativação da cascata e degradação da fibrina, o D-dímero. Todas as alterações acima mencionadas, caracterizam a síndrome clínica da DIC. Esta síndrome corresponde a um desarranjo da hemostasia relacionada a uma inflamação sistêmica, sendo composta por trombose e hemorragia simultaneamente, devido à liberação desregulada de trombina na circulação. Isso leva à formação de microcoágulos disseminados na circulação, podendo ocasionar isquemia tecidual e dano aos órgãos (130). Com efeito, o nosso grupo mostrou previamente a formação

de massas trombóticas no fígado dos camundongos OI (39). Perante este quadro, numa tentativa de recuperar a hemostasia, ocorre uma ativação exacerbada do sistema fibrinolítico com produção de plasmina, degradação da fibrina e liberação do D-dímero e outros fragmentos resultando em hemorragias (71). Pacientes com DIC apresentam maiores quantidades de IL-6, sendo o aumento proporcional à gravidade da doença (114). Também foi observada uma alta concentração desta citocina nos nossos animais OI. Contudo, quanto é do nosso conhecimento, não existem relatos de DIC em DC. As manifestações da DIC incluem hemorragias gastrointestinais (130) e de fato, ocorreram óbitos por este tipo de hemorragias no surto de Navegantes, no Estado de Santa Catarina (3,17) e em um surto no Estado do Pará (36) ainda que a sua causa esteja mais associada à presença de infiltrado inflamatório contendo amastigotas nesses tecidos (114).

Com a finalidade de prevenir toda esta desregulação do sistema hemostático, testou-se a hipótese de que o bloqueio da sinalização de IL-6 ou de TNF protegeria ou minimizaria os distúrbios hematológicos observados na fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi*. No caso do bloqueio de IL-6R, observou-se uma redução significativa no tempo de coagulação, aPTT e no sangramento sendo que em ambos os ensaios, os valores referentes aos animais OI não diferiram dos NI. Uma vez que o tratamento começou aos 14 dpi, momento em que a resposta imune adaptativa já foi iniciada, o bloqueio não interferiu no controle do parasitismo nos primeiros momentos da infecção onde a IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias têm um papel fundamental (39,112).

No entanto, o mesmo não foi verificado relativamente ao tratamento com anticorpo contra TNF, sugerindo que o TNF não está a afetar diretamente os distúrbios hemostáticos decorrentes da DC experimental, diferentemente do que é observado na endotoxemia experimental (77,115). Quando analisada a bula do Enbrel® (131), é listada nas reações incomuns (0,1% e 1% dos pacientes que utilizam o medicamento) uma diminuição das plaquetas e nas reações raras (0,01% e 0,1% dos pacientes que utilizam o medicamento), anemia, trombocitopenia e leucopenia. Não foram efetuados hemogramas dos animais tratados com o anticorpo monoclonal mas aparentemente estas reações não ocorreram nos animais uma vez que os controles tratados com veículo e controles tratados com Enbrel® não apresentaram diferenças significativas (Figura 5.7). Em relação ao Tocilizumabe/Actemra®, é descrito que o tratamento causa redução no número de

plaquetas (132). Esse fenômeno não foi verificado uma vez que não se realizaram os hemogramas dos animais tratados. Ainda assim, os animais controle tratados com o anticorpo monoclonal contra IL-6R, não apresentaram diferenças significativas dos animais controle tratados com veículo. Pelo que, caso tenha ocorrido a redução no número de plaquetas, esta não influenciou o ensaio de sangramento nem os tempos de coagulação.

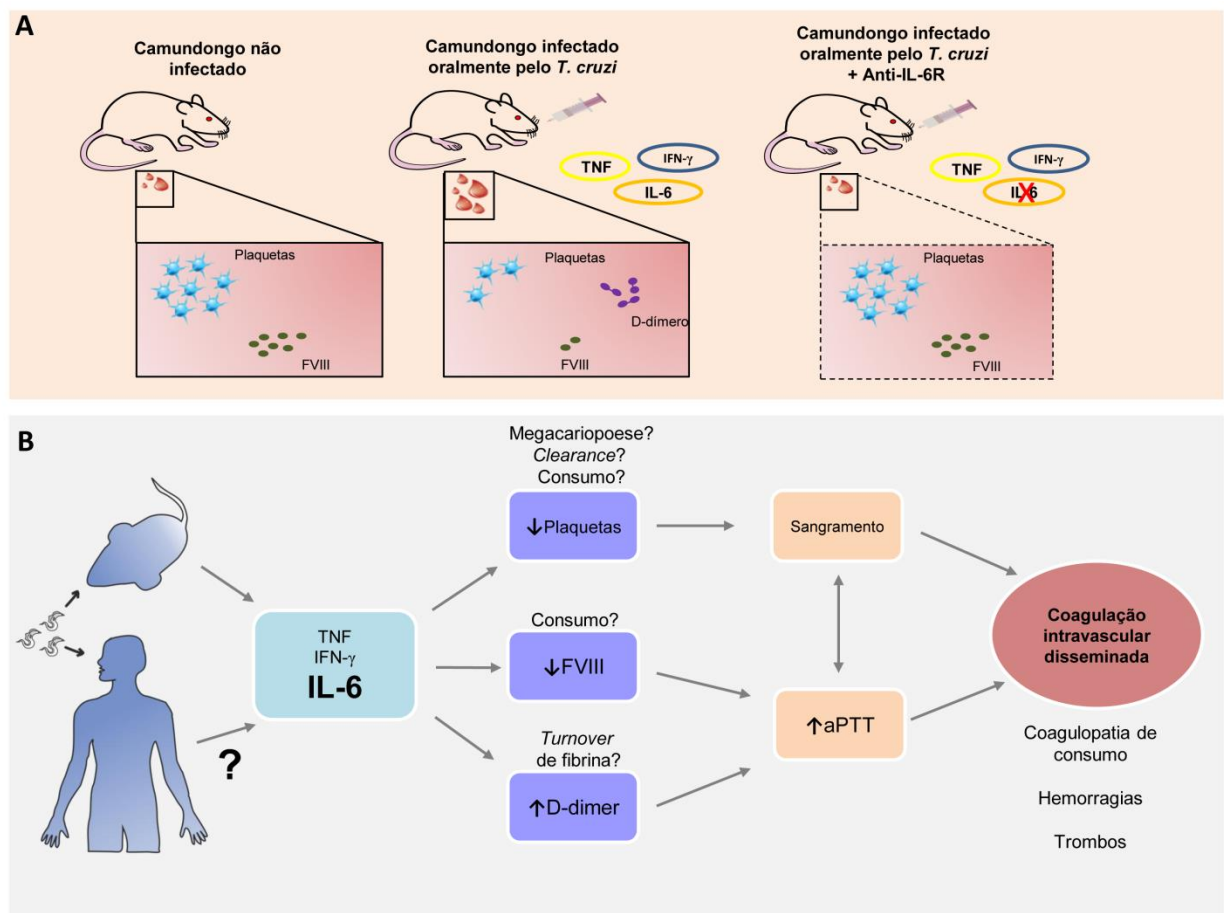
Com base nestes achados, podemos concluir que o bloqueio de IL-6R, durante a fase aguda da infecção oral, foi capaz atenuar as alterações hemostáticas (Figura 6.1A). Este tratamento trouxe também benefícios em modelos experimentais de outras patologias, tais como nefropatia diabética e desordens cognitivas perioperatórias (133,134).

Vale ressaltar que não foram estudadas as vantagens e desvantagens da intervenção com o anticorpo monoclonal a longo prazo, mais precisamente, na fase crônica da infecção.

Além disso, foi demonstrado que camundongos SC também apresentam distúrbios hematológicos, com prolongamento do aPTT aos 14 dpi anteriormente animais OI, com aumento significativo aos 21 dpi. Possivelmente, a maior parasitemia, concentrações de citocinas pró-inflamatórias mais altas aos 14 dpi e maior taxa de mortalidade no modelo SC possam explicar esta diferença. Desta forma, ressalta-se que a presença do parasito na corrente sanguínea induz modificações no sistema hemostático, não sendo este fenômeno característico da via de transmissão oral. Várias hipóteses podem ser conjecturadas para explicar os sintomas diferenciados (tais como sinais hemorrágicos) nos pacientes infectados pela via oral: “background” genético do hospedeiro e acesso ao tratamento, considerando que a maioria dos surtos de infecção oral ocorrem no estado do Pará; a variabilidade genética do parasito, isto é, diferentes DTUs podendo estar correlacionadas com alterações hematológicas mais graves e inóculo, ainda que seja extremamente difícil estimar a concentração de parasitos ingeridos na ocorrência de um surto.

Em suma, este trabalho mostra pela primeira vez que durante a fase aguda da DC ocorre um distúrbio hemostático ligado à inflamação sistêmica principalmente a IL-6, com: (i) diminuição do número de plaquetas, não estando esclarecido o motivo, se por desregulação da megacariopese, remoção e/ou consumo exacerbado, ou

todos os fenômenos em conjunto; (ii) decréscimo nas concentrações de FVIII aos 14 dpi mostrando um consumo deste fator; (iii) detecção de D-dímero indicando um maior “turnover” da fibrina. Estas alterações resultaram em aumentos no sangramento dos animais e no tempo de coagulação aPTT sinais de coagulação intravascular disseminada, uma coagulopatia de consumo associada a hemorragias e trombos paralelamente (Figura 6.1B). Por último, chama-se a atenção para a necessidade de vigilância e avaliação do sistema hematológico dos pacientes agudos infectados mesmo não sabendo se estes resultados são transferíveis a humanos.



**Figura 6.1 Infecção oral pelo *T. cruzi* resulta em anormalidades hematológicas ligadas a uma inflamação sistêmica.** (A) Camundongos oralmente infectados apresentam trombocitopenia, depleção do FVIII e valores aumentados de D-dímero relacionados com a inflamação sistêmica. O bloqueio de IL-6R foi capaz de restaurar a hemostasia nos animais tratados. (B) Hipótese do trabalho: A infecção aguda pelo *T. cruzi* leva a um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias em modelo experimental e hipoteticamente, em humanos. A IL-6 está associada ao decréscimo de plaquetas, possivelmente devido a distúrbios na megacariopoese, “clearance” de plaquetas e/ou consumo; redução da concentração sérica de FVIII e quantidades altas de D-dímero devido ao “turnover”

exacerbado da fibrina. No conjunto, estes processos levam ao aumento do sangramento e do aPTT, sinais de coagulação intravascular disseminada que tem como sintomas hemorragias e microtrombos, que já foram previamente reportados na DC aguda (3,34,39,111).

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstrou, pela primeira vez, que a infecção oral pelo *T. cruzi* promoveu um desequilíbrio hemostático relacionado à inflamação sistêmica. O grupo OI apresentou um decréscimo no número de plaquetas, aumento de sangramento e aumento do tempo de coagulação aPTT, em paralelo com a alta parasitemia. O bloqueio da via de sinalização de IL-6 preveniu estas modificações, contrariamente ao uso do anticorpo contra TNF.

Camundongos infectados pela via SC também apresentaram prolongamento do tempo de coagulação, em momentos anteriores aos animais OI, não sendo este fenômeno específico da via de transmissão oral.

Como perspectiva pretende-se fazer uma avaliação dos megacariócitos em vários órgãos (medula, baço, fígado e pulmão) e da sua contribuição para a trombocitopenia observada de forma a entender se a infecção oral pelo *T. cruzi* está associada a anormalidades na megacariopoese. Além disso, pretende-se verificar até que grau os resultados obtidos no nosso modelo experimental mimetizam a DC aguda por transmissão oral em humanos analisando mediadores inflamatórios e parâmetros hematológicos nas amostras dos portadores da enfermidade, projeto em colaboração com grupos do norte do país.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chagas C, Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (1909);1(2):159–218. doi:10.1590/S0074-02761909000200008
2. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) (2018). Disponível em [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) [Acesso em 04 jan 2019]
3. Carlos Pinto Dias J, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde.* (2016);25(21):1–10. doi:10.5123/S1679-49742016000500002
4. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Jr VDL, et al. ATLAS ICONOGRÁFICO DOS TRIATOMÍNEOS DO BRASIL (VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS) [Internet]. Rio de Janeiro; 2014. Rio de Janeiro, Inst Oswaldo Cruz; (2014):1-58.
5. DNDi. Chagas disease background. Disponível em <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-disease-background/> [Acesso em 04 jan 2019].
6. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* (2010);375(9723):1388–402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
7. Müller Kratz J, Garcia Bournissen F, Forsyth CJ, Sosa-Estani S. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease Expert Review of Clinical Pharmacology. (2018);11:943-957 doi: 10.1080/17512433.2018.1509704.
8. Inst Oswaldo Cruz M, Zingales B, Andrade S, Briones M, Campbell D, Chiari E, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz;* (2009);104(7).
9. L. R. Bases da parasitologia médica. Guanabara Koogan. (2014); p.2002.
10. Epting CL, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* (2010); doi:10.1016/j.exppara.2010.06.023
11. de Meis, Juliana; Castro RSS. Manual para diagnóstico em doença de Chagas para microscopistas de base do Estado do Pará. Rio de Janeiro. (2017):26-27.
12. Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. The challenges of Chagas disease - Grim outlook or glimmer of hope? *PLoS Medicine* (2007) 4(12):e332. doi: 10.1371/journal.pmed.0040332.
13. Araujo PF, Almeida AB, Pimentel CF, da Silva AR, Sousa A, Valente SA, et al. Sexual transmission of american trypanosomiasis in humans: A new potential pandemic route for chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*

- (2017);112(6):437–46. doi:10.1590/0074-02760160538.
14. ENSP. Brasil elimina transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. (2006); Disponível em <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/614> [Acesso em 06 jan 2019].
  15. Coura JR. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2013); doi:10.1590/0074-0276130565.
  16. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013 (2015). Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>. [Acesso em 06 jan 2019].
  17. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. *Clin Infect Dis*. (2012);54(6):845–52. doi:10.1093/cid/cir956.
  18. Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F, et al. Congenital transmission of chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis*. (2009);15(4):601–3. doi:10.3201/eid1504.080438.
  19. Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM. Control of transfusional transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*. (2011);44:64-7.
  20. Bern C, L.Martin D, Gilman RH. Acute and Congenital Chagas Disease. *Advances in Parasitology*. (2011);75:19–47. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2.
  21. A.M. C, R. H. Chagas' disease: Pregnancy and congenital transmission. *Biomed Res Int*. (2014);2014. doi: 10.1155/2014/401864.
  22. Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, et al. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus*. (2015);13(4):540–50. doi:10.2450/2015.0040-15.
  23. Agostinho F, Machado FB, Paulino TDP, Miguel CB. SM Gr up Chagas Disease and Transfusion. *SM Tropical*. (2017);2(1):1–9.
  24. Pierrotti LC, Carvalho NB, Amorin JP, Pascual J, Kotton CN, López-Vélez R. Chagas Disease Recommendations for Solid-Organ Transplant Recipients and Donors. *Transplantation*. (2018);102(2):S1–7. doi:10.1097/TP.0000000000002017.
  25. Belkisyolé de Noya, Oscar González LJR. Trypanosoma cruzi as a Foodborne Pathogen. *Springer*. (2015):92.
  26. da Silva, Newton Neves; Clausell, Domingos; Nolibos, Hedi; de Mello, Abdias Leite; Ossanai, Jorge; Rapone, Tulio; Snell T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. (1968);10(5):265–76.
  27. Santos VRC dos, Meis J de, Savino W, Andrade JAA, Vieira JR dos S, Coura JR, et al. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2018);113(5). doi:10.1590/0074-02760170298.
  28. Pará GG. Médico com doença de Chagas morre em hospital particular de Belém. (2015); Disponível em



- <http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2015/07/medico-com-doenca-de-chagas-morre-em-hospital-particular-de-belem.html> [Acesso em 08 jan 2019].
29. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. *J Food Prot.* (2009);72(2):441–6. PMID: 19350996.
  30. Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* (2010); doi:10.1086/651608.
  31. Norman FF, López-Vélez R. Chagas disease and breast-feeding. *Emerg Infect Dis.* (2013); doi:10.3201/eid1910.130203.
  32. Andrade D V., Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* (2014); doi:10.1371/journal.pntd.0003010.
  33. Saúde M da. DOENÇA DE CHAGAS AGUDA Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Disponível em <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/viewFile/10738/7137>. [Acesso em 08 jan 2019].
  34. Pamplona De Góes Cavalcanti L, Rolim DB, Da Justa R, Neto P, Lima DC, Vilar F, et al. Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. *Cad Saúde Colet, Rio Janeiro.* (2009);17(4):911–21.
  35. Souza PFP de, Pine RCD, Ramos FL de P, Pinto AY das N. Atrial fibrillation in acute Chagas disease acquired via oral transmission: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2018);51(3):397–400. doi:10.1590/0037-8682-0296-2017.
  36. Pinto AY das N, Valente SA, Valente V da C, Ferreira Junior AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2008);41(6):602–14. doi:10.1590/S0037-86822008000600011.
  37. Oliveira JSM, Correa De Araujo RR, Navarro MA, Muccillo G. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic chagas' heart disease. *Am J Cardiol.* (1983); doi:10.1016/0002-9149(83)90085-1.
  38. Braz LMA, Amato Neto V, Okay TS. Reactivation of Trypanosoma cruzi infection in immunosuppressed patients: Contributions for the laboratorial diagnosis standardization. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (2008); 50(1):65-6.
  39. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet E de, Farias-de-Oliveira DA, et al. Trypanosoma cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? Santiago H da C, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* (2015);9(6):e0003849. doi:10.1371/journal.pntd.0003849.
  40. Camandaroba ELP, Pinheiro Lima CM, Andrade SG. Oral transmission of Chagas disease: importance of Trypanosoma cruzi biotome in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* (2002); 44(2):97–103.

41. Dias GBM, Gruending AP, Araújo SM, Gomes ML, Toledo MJ de O. 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. doi:10.1016/j.exppara.2013.08.013.
42. Silva-dos-Santos D, Barreto-de-Albuquerque J, Guerra B, Moreira OC, Berbert LR, Ramos MT, et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl Trop Dis.* (2017);11(4):1–26. doi:10.1371/journal.pntd.0005507.
43. Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* (2000);68(7):4075–83.
44. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* (1994); 153:3135-3140.
45. Gao W, Pereira MA. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* (2002);32(2):167–70.
46. Blaschitz C, Raffatellu M. Th17 Cytokines and the Gut Mucosal Barrier. *J Clin Immunol.* (2010);30(2):196–203. doi:10.1007/s10875-010-9368-7.
47. Barreto de Albuquerque J, Silva dos Santos D, Stein J V., de Meis J. Oral Versus Intra-gastric Inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection? From Target Tissues, Parasite Evasion, and Immune Response. *Front Immunol.* (2018);9:1734. doi:10.3389/fimmu.2018.01734.
48. Sira J, Eyre L. Physiology of haemostasis. *Anaesth Intensive Care Med.* (2016); doi:10.1016/j.mpaic.2015.11.004.
49. Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol.* (2011);39(1):273–80. doi:10.1177/0192623310389474.
50. Revel-Vilk S, Rand ML, Israels SJ. Primary and Secondary Hemostasis, Regulators of Coagulation, and Fibrinolysis: Understanding the Basics. In: Handbook of Pediatric Thrombosis and Hemostasis. 2013. p. 5–13. doi: 10.1159/000346907.
51. Periyah MH, Halim AS, Saad AZM. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in Hemostasis. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research.* (2017) 11(4):319-327. PMID: 29340130.
52. Litvinov RI, Vilaire G, Shuman H, Bennett JS, Weisel JW. Quantitative Analysis of Platelet  $\alpha\beta 3$  Binding to Osteopontin Using Laser Tweezers. *J Biol Chem.* (2003); doi:10.1074/jbc.M304581200.
53. Azeredo EL de, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM. Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators. *Mediators Inflamm.* (2015);2015:1–16. doi:10.1155/2015/313842.
54. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal.*

- (2014):2014. doi: 10.1155/2014/781857.
55. Israels SJ, Rand ML. What we have learned from inherited platelet disorders. *Pediatric Blood and Cancer*. 2013. doi:
  56. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006. doi:
  57. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev*. (2013); doi:10.1152/physrev.00016.2011.
  58. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*. (2014) 58(5):515-23. doi: 10.4103/0019-5049.144643.
  59. Petrovan RJ, Ruf W. Residue Met156 Contributes to the Labile Enzyme Conformation of Coagulation Factor VIIa. *J Biol Chem*. (2001); doi:10.1074/jbc.M004726200.
  60. Handin R, Lux S, Stossel T. *Blood: principles and practice of hematology*. 2<sup>a</sup>. *Lippincott Williams & Wilkins*; (2003). p. 2304.
  61. Krzych LJ, Czempik PF. Association between standard laboratory and functional tests of coagulation in dilutional coagulopathy: an in vitro study. *J Physiol Pharmacol*. (2017);68(4):637–45. PMID: 29151081.
  62. Horsti JE. The progress of prothrombin time measurement. *Hematol Rep*. (2009);1(2):19. doi:10.4081/hr.2009.e19.
  63. Dahlbäck B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: Genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine*. (2005) 257(3):209-23.
  64. Huang ZF, Higuchi D, Lasky N, Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood*. (1997); 90(3):944-51.
  65. Negreva M, Georgiev S, Prodanova K, Nikolova J. Early Changes in the Antithrombin and Thrombin-Antithrombin Complex in Patients With Paroxysmal Atrial Fibrillation. *Cardiol Res*. (2016); doi:10.14740/cr469w.
  66. Revel-vilk S, Rand ML, Israels SJ. Primary and Secondary Hemostasis, Regulators of Coagulation, and Fibrinolysis: Understanding the Basics. *Sick Handb Pediatr Thromb Hemost*. (2013);13:5–13. doi:10.1159/000346907.
  67. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. (2015). 29(1):17-24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.
  68. Khalafallah A, Jarvis C, Morse M, Albarzan AM, Stewart P, Bates G, et al. Evaluation of the innovance d-dimer assay for the diagnosis of disseminated intravascular coagulopathy in different clinical settings. *Clin Appl Thromb*. (2014); doi:10.1177/1076029612454936.
  69. Van der Hulle T, den Exter PL, Erkens PGM, van Es J, Mos ICM, ten Cate H, et al. Variable D-dimer thresholds for diagnosis of clinically suspected acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost*. (2013); doi:10.1111/jth.12394.
  70. Gomes M, Khorana AA. Risk assessment for thrombosis in cancer. *Semin Thromb Hemost*. (2014); doi:10.1055/s-0034-1370770.
  71. Levi M, Keller TT, Van Gorp E, Ten Cate H. Infection and inflammation and the

- coagulation system. Vol. 60, Cardiovascular Research. 2003. p. 26–39.
72. Osterud B, Bjorklid E. Tissue factor in blood cells and endothelial cells. *Front Biosci (Elite Ed)*. (2012);4:289–99.
  73. Chen JP, Cosgriff TM. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis*. (2000);11(5):461–83.
  74. Franco RF, de Jonge E, Dekkers PE, Timmerman JJ, Spek CA, van Deventer SJ, et al. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood*. (2000); doi:
  75. van der Poll T, Büller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, et al. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med*. (1990);322(23):1622–7. doi:10.1056/NEJM199006073222302.
  76. Stouthard JML, Levi M, Hack CE, Veenhof CHN, Romijn HA, Sauerwein HP, et al. Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemost*. (1996);76(5):738–42.
  77. van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med*. (1994);179(4):1253–9.
  78. Derhaschnig U, Bergmair D, Marsik C, Schlifke I, Wijdenes J, Jilma B. Effect of interleukin-6 blockade on tissue factor-induced coagulation in human endotoxemia. *Crit Care Med*. (2004); doi:10.1097/01.CCM.0000126265.08175.BE.
  79. Bester J, Pretorius E. Effects of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. *Sci Rep*. (2016);6:32188. doi:10.1038/srep32188.
  80. Herbert JM, Savi P, Laplace MC, Lale A. IL-4 inhibits LPS-, IL-1 $\beta$ - and TNF $\alpha$ -induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes. *FEBS Lett*. (1992); doi:10.1016/0014-5793(92)81139-D
  81. Herbert JM, Savi P, Laplace MC, Lalé A, Dol F, Dumas A, et al. IL-4 and IL-13 exhibit comparable abilities to reduce pyrogen-induced expression of procoagulant activity in endothelial cells and monocytes. *FEBS Lett*. (1993); doi:10.1016/0014-5793(93)80941-M.
  82. Schwager I, Jungi TW. Effect of human recombinant cytokines on the induction of macrophage procoagulant activity. *Blood*. (1994); doi:papers3://publication/uuid/EDABF332-69F4-487A-B07E-7D09CA27CFC3.
  83. Taylor FB, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon. *J Clin Invest*. (1987); doi:10.1172/JCI112902.
  84. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. (2014);123(18):2759–67. doi:10.1182/blood-2013-11-462432.
  85. Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. Platelet Induction of the Acute-Phase Response Is Protective in Murine Experimental Cerebral Malaria. *J Immunol*. (2013);190(9):4685–91. doi:10.4049/jimmunol.1202672.

86. Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KWA, Nestel FP, *et al.* Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- production in vivo. *Blood.* (2006);107(2):637–41. doi:10.1182/blood-2005-06-2202.
87. Akpan PA, Akpotuzor JO, Osim EE. The role of cytokines in fibrinolysis: A case study of active tuberculosis. *J Infect Dis Med Microbiol.* (2017);1(1):1–5.
88. van der PT, Levi M, Buller HR, van Deventer SJ, de Boer JP, Hack CE, *et al.* Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subjects. *J ExpMed.* (1991); doi:10.1084/JEM.174.3.729.
89. Rondina MT, Weyrich AS. Dengue virus pirates human platelets. *Blood.* (2015).
90. Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HS, Lin YS, *et al.* Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J Med Virol.* (2001); doi:10.1002/1096-9071(200103)63:3<247::AID-JMV1008>3.0.CO;2-F.
91. Team WER. Ebola virus disease in West Africa—the first 9 months of the epidemic and forward projections. *N Engl J Med* 2014. (2014);371:1481–95. doi: 10.1056/NEJMoa1411100.
92. Hunt L, Gupta-Wright A, Simms V, Tamba F, Knott V, Tamba K, *et al.* Clinical presentation, biochemical, and haematological parameters and their association with outcome in patients with Ebola virus disease: An observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* (2015); doi:10.1016/S1473-3099(15)00144-9.
93. Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, Davis KJ, Kagan E, Hensley LE. Mechanisms Underlying Coagulation Abnormalities in Ebola Hemorrhagic Fever: Overexpression of Tissue Factor in Primate Monocytes/Macrophages Is a Key Event. *J Infect Dis.* (2003); doi:10.1086/379724.
94. De Silva NL, Niloofa M, Fernando N, Karunanayake L, Rodrigo C, De Silva HJ, *et al.* Changes in full blood count parameters in leptospirosis: A prospective study. *Int Arch Med.* (2014); doi:10.1186/1755-7682-7-31.
95. Wagenaar JFP, Goris MGA, Partiningrum DL, Isbandrio B, Hartskeerl RA, Brandjes DPM, *et al.* Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. *Trop Med Int Heal.* (2010); doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02434.x.
96. Francischetti IMB, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood Coagulation, Inflammation, and Malaria. *Microcirculation.* (2008);15(2):81–107. doi:10.1080/10739680701451516.
97. Angchaisuksiri P. Coagulopathy in malaria. *Thrombosis Research.* 2014. doi:
98. Lacerda MVG, Mourão MPG, Coelho HCC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2011);106.
99. Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, *et al.* Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J.* (2005);169(3):465–7. doi:10.1016/j.tvjl.2004.03.009.
100. Leite LAC, Pimenta Filho AA, Martins da Fonseca CS, Santana dos Santos B, Ferreira R de C dos S, Montenegro SML, *et al.* Hemostatic dysfunction is increased in patients with hepatosplenic *schistosomiasis mansoni* and

- advanced periportal fibrosis. Carvalho EM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. (2013);7(7):e2314. doi:10.1371/journal.pntd.0002314.
101. Añez N, Crisante G, Rojas A, Dávila D. Brote de enfermedad de Chagas agudo de posible transmisión oral en Mérida, Venezuela. *Bol Malariol y Salud Ambient*. (2013);53(1):1–11.
  102. Moreno EA, Araujo MA, Alarcón ME, Lugo A, Moreno SC, Borges R. [Hematological and blood glucose alterations in Wistar rats with acute chagasic infection during gestation]. *Invest Clin*. (2007);48(2):187–98.
  103. da Silva R V., Malvezi AD, da Augusto LS, Kian D, Tatakihara VLH, Yamauchi LM, et al. Oral Exposure to *Phytomonas serpens* Attenuates Thrombocytopenia and Leukopenia during Acute Infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. (2013);8(7). doi:10.1371/journal.pone.0068299.
  104. Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS, Campetella O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun*. (2005);73(1):201–7. doi:10.1128/IAI.73.1.201-207.2005.
  105. Marcondes MCG, 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. doi:10.1016/S1286-4579(00)00333-6.
  106. Herrera RN, Díaz E, Pérez R, Chaín S, Sant-Yacumo R, Rodríguez E, et al. The prothrombotic state in early stages of chronic Chagas' disease. *Rev Esp Cardiol*. (2003); 56:377-82.
  107. Herrera RN, Díaz E, Pérez Aguilar R, Bianchi J, Berman S, Luciardi HL. [Prothrombotic state in early stages of chronic Chagas' disease. Its association with thrombotic risk factors]. *Arch Cardiol Mex*. 75 Suppl 3:S3-38–48.
  108. Herrera RN, de Amaya EID, Aguilar RCP, Turoni CJ, Marañón R, Berman SG, et al. Inflammatory and Prothrombotic Activation With Conserved Endothelial Function in Patients With Chronic, Asymptomatic Chagas Disease. *Clin Appl Thromb*. (2011);17(5):502–7. doi:10.1177/1076029610375814.
  109. de Melo LM, Souza GE, Valim LR, Moreira LF, Damico EA, da Rocha TR, et al. Study of pro-thrombotic and pro-inflammatory factors in Chagas cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol*. (2010);95(5):655–62. doi:S0066-782X2010005000146.
  110. Moore D. Hematology of the mouse (*Mus musculus*). Schalm's veterinary hematology. Ames: Wiley–Blackwell (2000); p.856.
  111. ANVISA. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde. Nota técnica: doença de Chagas aguda por transmissão oral. (2005). Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt521270](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt521270).
  112. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2009); doi:10.1590/S0074-02762009000900032.

113. van der Poll T, Boer JD de, Levi M. The effect of inflammation on coagulation and vice versa. *Curr Opin Infect Dis.* (2011);24(3):273–8. doi:10.1097/QCO.0b013e328344c078.
114. van der Poll T, de Jonge E ten C an H. Cytokines as Regulators of Coagulation. *Madame Curie Biosci Database* Landes Bioscience; 2000-2013.
115. van der Poll T, Coyle SM, Levi M, Jansen PM, Dentener M, Barbosa K, *et al.* Effect of a recombinant dimeric tumor necrosis factor receptor on inflammatory responses to intravenous endotoxin in normal humans. *Blood.* (1997);89(10):3727–34.
116. Roggero E, Perez A, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, *et al.* Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol.* (2002); doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01874.x.
117. Andrade ZA, Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol.* (1994);144(6):1403–11.
118. López L, Arai K, Giménez E, Jiménez M, Pascuzo C, Rodríguez-Bonfante C, *et al.* [C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure]. *Rev Esp Cardiol.* (2006);59(1):50–6.
119. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, *et al.* Increased Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Asymptomatic/"Indeterminate" and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro.* (2003);98(3):407–11.
120. Franco RF, Jonge E, Dekkers PE, Timmerman JJ, Spek CA, van Deventer S., *et al.* The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood.* (2000); 96(2):554-9 PMID: 10887118.
121. Shikanai-Yasuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto V BA. Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* (1990);32(1):16–27.
122. Cardoso JE, Brener Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma Cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (1980);75(3–4):97–104. doi:10.1590/S0074-02761980000200009.
123. Villalba-Alemán E, Justinico DL, Sarandy MM, Novaes RD, Freitas MB, Gonçalves R V. Haematological alterations in non-human hosts infected with *Trypanosoma cruzi*: a systematic review. *Parasitology.* (2019);146(02):142–60. doi:10.1017/S0031182018001294.
124. Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology [Internet]. John Wiley & Sons; (2013); 229-322.
125. DIAS E, LARANJA FS, MIRANDA A, NOBREGA G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.* (1956);14(6):1035–

60.

126. Tanowitz HB, Kirchhoff L V, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* (1992);5(4):400–19.
127. Neunert CE, Bright BC, Buchanan GR. Severe chronic refractory immune thrombocytopenic purpura during childhood: A survey of physician management. *Pediatr Blood Cancer.* (2008);51(4):513–6. doi:10.1002/pbc.21621.
128. CHONG BH, HO S-J. Autoimmune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* (2005);3(8):1763–72. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01376.x.
129. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao B-Q, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood.* (2008);111(10):4958–64. doi:10.1182/blood-2007-11-123620.
130. Edgard A, Segura M. Disseminated Intravascular Coagulation. *Pediatric Clinical Advisor Instant Diagnosis and Treatment.* 2nd ed. Elsevier Inc.; (2007).
131. Wyeth Indústria Farmacêutica Ltda. Bula Enbrel® PFS (2016); 1–14. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=24364992016&pIdAnexo=3982923](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=24364992016&pIdAnexo=3982923) [Acesso em 24 jan 2019].
132. Roche. Bula Actemra® (2013) p. 1–8. [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2183002013&pIdAnexo=1539068](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2183002013&pIdAnexo=1539068) [Acesso em 24 jan 2019].
133. Wu R, Liu X, Yin J, Wu H, Cai X, Wang N, et al. IL-6 receptor blockade ameliorates diabetic nephropathy via inhibiting inflammasome in mice [Internet]. Vol. 83, *Metabolism: Clinical and Experimental.* Elsevier Inc; 2018. 18–24 p. doi: 10.1016/j.metabol.2018.01.002.
134. Hu J, Feng X, Valdearcos M, Lutrin D, Uchida Y, Koliwad SK, et al. Interleukin-6 is both necessary and sufficient to produce perioperative neurocognitive disorder in mice. *Br J Anaesth.* (2018);120(3):537–45. doi:10.1016/j.bja.2017.11.096.



## 9. ANEXO

### **Produção científica durante o período de doutorado**

**DINA ANTUNES**, ALESSANDRO MARINS-DOS-SANTOS, MARIANA T. RAMOS, BARBARA A. MASCARENHAS, CARLOS J. MOREIRA, DÉCIO A. FARIAS-DE-OLIVEIRA, WILSON SAVINO, ROBSON Q. MONTEIRO, JULIANA DE MEIS

“Oral route driven acute *Trypanosoma cruzi* infection unravels an IL-6 dependent hemostatic derangement”. *Frontiers in Immunology* (2019); 10: 1073 DOI=10.3389/fimmu.2019.01073.



# Oral Route Driven Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Unravels an IL-6 Dependent Hemostatic Derangement

Dina Antunes<sup>1,2</sup>, Alessandro Marins-Dos-Santos<sup>1,2</sup>, Mariana Tavares Ramos<sup>1,2</sup>, Barbara Angelica S. Mascarenhas<sup>1,2</sup>, Carlos José de Carvalho Moreira<sup>3</sup>, Désio Aurélio Farias-de-Oliveira<sup>1,2</sup>, Wilson Savino<sup>1,2</sup>, Robson Q. Monteiro<sup>4</sup> and Juliana de Meis<sup>1,2\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Soledad Negrotto,  
Academia Nacional de Medicina,  
Argentina

### Reviewed by:

Oscar Campetella,  
National University of General San  
Martin, Argentina  
Bertha Espinoza,  
National Autonomous University of  
Mexico, Mexico

### \*Correspondence:

Juliana de Meis  
jdemeis@ioc.fiocruz.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 26 December 2018

Accepted: 26 April 2019

Published: 14 May 2019

### Citation:

Antunes D, Marins-Dos-Santos A,  
Ramos MT, Mascarenhas BAS,  
Moreira CJdC, Farias-de-Oliveira DA,  
Savino W, Monteiro RQ and de Meis J  
(2019) Oral Route Driven Acute  
*Trypanosoma cruzi* Infection Unravels  
an IL-6 Dependent Hemostatic  
Derangement.  
Front. Immunol. 10:1073.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.01073

<sup>1</sup>Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup>National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup>Parasitic Diseases Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>4</sup>Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, is presently the most important route of infection in Brazilian Amazon. Other South American countries have also reported outbreaks of acute Chagas disease associated with food consumption. A conspicuous feature of this route of transmission is presenting symptoms such as facial and lower limbs edema, in some cases bleeding manifestations and risk of thromboembolism are evident. Notwithstanding, studies that address this route of infection are largely lacking regarding its pathogenesis and, more specifically, the crosstalk between immune and hemostatic systems. Here, BALB/c mice were orally infected with metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* Tulahuén strain and used to evaluate the cytokine response, primary and secondary hemostasis during acute *T. cruzi* infection. When compared with control uninfected animals, orally infected mice presented higher pro-inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-6) serum levels. The highest concentrations were obtained concomitantly to the increase of parasitemia, between 14 and 28 days post-infection (dpi). Blood counts in the oral infected group revealed concomitant leukocytosis and thrombocytopenia, the latter resulting in increased bleeding at 21 dpi. Hematological changes paralleled with prolonged activated partial thromboplastin time, Factor VIII consumption and increased D-dimer levels, suggest that oral *T. cruzi* infection relies on disseminated intravascular coagulation. Remarkably, blockade of the IL-6 receptor blunted hematological abnormalities, revealing a critical role of IL-6 in the course of oral infection. These results unravel that acute *T. cruzi* oral infection results in significant alterations in the hemostatic system and indicates the relevance of the crosstalk between inflammation and hemostasis in this parasitic disease.

**Keywords:** Chagas disease, oral transmission, cytokine, platelet, coagulation, interleukin-6

## INTRODUCTION

The hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease or American trypanosomiasis which is transmitted primarily through contact with feces of triatomine insects after biting (1). Transmission can also occur through blood transfusion (2), organ transplantation (3), congenitally (vertical transmission) (4), laboratory accidents (5) and by ingestion of contaminated food/juices (6, 7). Currently, oral infection is the most frequent route of transmission in Brazil and other Latin American countries (7–9). Mortality rates in these orally infected patients are higher (8–35%) when compared with the classical vectorial transmission (<5–10%) (10). The acute phase of the disease is a critical period often accompanied by non-specific clinical symptoms, such as fever, asthenia, face and limb edema, headache, myalgia, and others. Minor bleeding manifestations, most commonly from nose, skin petechiae, or bruising, are apparent in some patients with oral acute Chagas disease (ACD) and occasionally, risk of thromboembolism is reported and digestive bleeding may cause death (7, 11–13). These clinical/hematological signs have a frequency of 4.9% in orally-transmitted ACD outbreaks (14), although higher values were described in some cases (12, 13). Moreover, the association between anemia and thrombocytopenia in the ACD was already envisioned by Carlos Chagas in 1909 (1).

The knowledge of immunological events that occur during ACD are mainly based on studies using murine models. *Trypanosoma cruzi* experimental infection leads to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) activation in macrophages and dendritic cells with IL-12 secretion. Furthermore, synthesis of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and nitric oxide (NO) by macrophages contributes to parasite clearance (15). In a mouse model of *T. cruzi* oral infection with the Tulahuén strain, it was shown that the major source of TNF in infected tissues are macrophages and high levels of this cytokine are associated to cardiac, hepatic and spleen injuries as well as toxic shock in infected BALB/c (16, 17). IL-6 is also involved in host protective response since IL-6-/- mice presented 3-fold higher parasitemia and died earlier than wild-type *T. cruzi* infected animals, by the subcutaneous route (18). Interestingly, Th1 cytokines are involved in an intense crosstalk between immune and hemostatic systems. Acute inflammation, as a response of an infection can modulate the systemic activation of the coagulation cascade and impair physiological anticoagulant pathways (19–22).

Tissue factor (TF), the integral transmembrane protein that initiates coagulation, is strongly induced by pro-inflammatory cytokines and C reactive protein on monocytes, fibroblasts and endothelial cells surface allowing further interaction with factor VII to form the complex TF-factor-VIIa, ultimately resulting in fibrin formation (19, 23). Under normal conditions, cells in direct contact with circulating blood do not express physiologically active TF (24). The traditional coagulation cascade includes intrinsic and extrinsic pathways that lead to the activation of different coagulation factors converging at the activation of factor X to factor Xa. Factor Xa forms a complex with factor Va to activate prothrombin into thrombin. Thrombin

then converts fibrinogen to a fibrin network forming the clot (22).

Baboons lethally challenged with *Escherichia coli* and infused with recombinant antithrombin (protease inhibitor of thrombin and factor Xa) at high concentrations, had lower IL-6 and IL-8 plasma levels and the mortality was markedly reduced (25). Furthermore, blockade of IL-6 with a monoclonal antibody, in a primate model of sepsis, attenuated the LPS-induced coagulation (26). This effect was independent of TNF, since abrogation of this cytokine with recombinant TNF receptor IgG fusion protein or a neutralizing TNF antibody in healthy humans or LPS injected chimpanzees had no effect in coagulation activation (26, 27). To the best of our knowledge, there are no studies focusing on the inflammatory and hematological crosstalk as well as their mechanisms in oral ACD. The few studies addressing this interaction in Chagas disease in literature focus on chronic *T. cruzi* infection and have controversial results regarding the existence of a prothrombotic status in *T. cruzi*-infected patients (28–30).

Here, by using a pre-established mouse model of oral ACD, we demonstrate that infection leads to a decrease in platelet count, increased bleeding and coagulation time, mainly in the peak of parasitemia. Importantly, circulating IL-6 levels seem to be involved in these hematological changes during oral *T. cruzi* infection. This information may help elucidating the mechanism of oral ACD pathogenesis and provide an additional view on the interaction between inflammation and coagulation in the context of infectious diseases.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Infection

Male BALB/c mice were obtained from ICTB Oswaldo Cruz Foundation animal facilities (Brazil) and maintained in SPF conditions. Mice (6–8 weeks old) were infected via oral cavity by pipetting 50  $\mu$ l of excreta into their mouth with  $5 \times 10^4$  *T. cruzi* insect-vector (*Triatoma infestans*)-derived metacyclic forms (Tulahuén strain, TcVI). A different group of mice received the same number of trypomastigotes by the subcutaneous route (SC) after a single inoculation in the dorsal region. Before the infection, mice were maintained starving 4 h and at least 15 min after inoculation.

### Ethics Statement

This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation and the Federal Law 11.794 (10/2008). The Institutional Ethics Committee for Animal Research of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA-FIOCRUZ, License: L-028/2016) approved all the procedures used in this study.

### Parasitemia

Parasitemia was detected at different dpi by counting trypomastigotes in 5  $\mu$ L of tail blood and parasite number was calculated using the Pizzi-Brener method.

### Cytometric Bead Array (CBA)

Mice were anesthetized, bled by cardiac puncture and euthanized by exsanguination at 3, 7, 14, 21, 24, and 28 dpi. Each bleeding point represents one mouse. To measure IL-6, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  cytokines in the serum, we used the BD Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA kit (BD Biosciences, USA). The assays were performed according to manufacturer's instructions. Sera were stored frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used.

### Blood Cell Analysis

The mice were anesthetized and blood was collected into EDTA BD microtainer<sup>®</sup> tube by cardiac puncture. Blood cell count was automatically determined using the Poch 100- iV DIFF hematology analyzer (Sysmex, Japan).

### Clotting Assays and Measurements of Coagulation Factors

Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) and Prothrombin time (PT) were evaluated on a STart 4 stagoagulometer (DiagnosticaStago, USA). For the aPTT, plasma (50  $\mu\text{L}$ ) was incubated in the coagulometer for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Then, 50  $\mu\text{L}$  of pre-warmed aPTT reagent (STA PTT; DiagnosticaStago, France) was added and further incubated for 2 min.  $\text{CaCl}_2$  (50  $\mu\text{L}$  at 25 mM) was added to start reactions. For determining the PT, plasma (50  $\mu\text{L}$ ) was incubated in the coagulometer for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Then, 100  $\mu\text{L}$  of the PT reagent (NEOplastine CI plus; DiagnosticaStago, France) was added. Time for clot formation was recorded in duplicates.

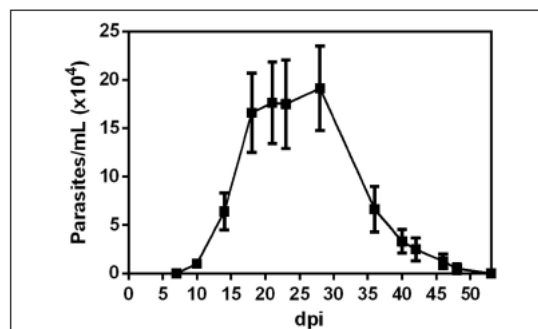
Serum levels of coagulation factors (FV, FVII, FVIII, and APC) and D-dimer were determined using commercial enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) kits according to manufacturer's protocol (ElabScience Biotechnology, China).

### Tail Bleeding Assay

Bleeding propensity was evaluated as previously described (31). Mice were anesthetized with intramuscular xylazine (16 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). After 15 min, the distal 2 mm segment of the tail was removed and immediately immersed in 40 mL distilled water warmed to  $37^{\circ}\text{C}$  during exactly 30 min. The samples were properly homogenized and the absorbance was determined at 540 nm in order to estimate the hemoglobin content.

### Anti-IL6R and Anti-TNF Treatment

Orally infected BALB/c mice were treated intraperitoneally with a monoclonal antibody against the interleukin-6 receptor (IL-6R) (8 mg/kg, Tocilizumab, Actemra<sup>®</sup>, Roche, Switzerland), IgG control antibody (8 mg/kg, chrompure IgG Jackson ImmunoResearch Labs, USA) or with a chimeric anti-TNF protein (0.83 mg/Kg, Etanercept Enbrel<sup>®</sup>, Wyeth Pharmaceuticals, USA). The treatment began at the 14 dpi with 48 h subsequent doses in the case of anti-IL-6R antibody or IgG control antibody and with another dose at 18 dpi for the anti-TNF reagent. The control group received normal saline solution at the same volume (100  $\mu\text{L}$ ) and frequency as described for orally infected mice.



**FIGURE 1 |** Parasitemia development. Male BALB/c mice were infected with  $5 \times 10^4$  insect-derived metacyclic forms of *T. cruzi* within the oral cavity. Parasitemia (mean and SEM) was assessed during the acute phase and is expressed as parasites per milliliter. Parasites were counted by light microscopy and parasitemia calculated by the Pizzi-Brener method. n: 7 dpi = 21, 10, and 14 dpi = 15, 18 dpi = 18, 21 dpi = 11, 23 dpi = 6, 28 dpi = 8; 36, 40, 42, 46, 48, and 53 = 4. The total number of animals in each time point was obtained from different experiments.

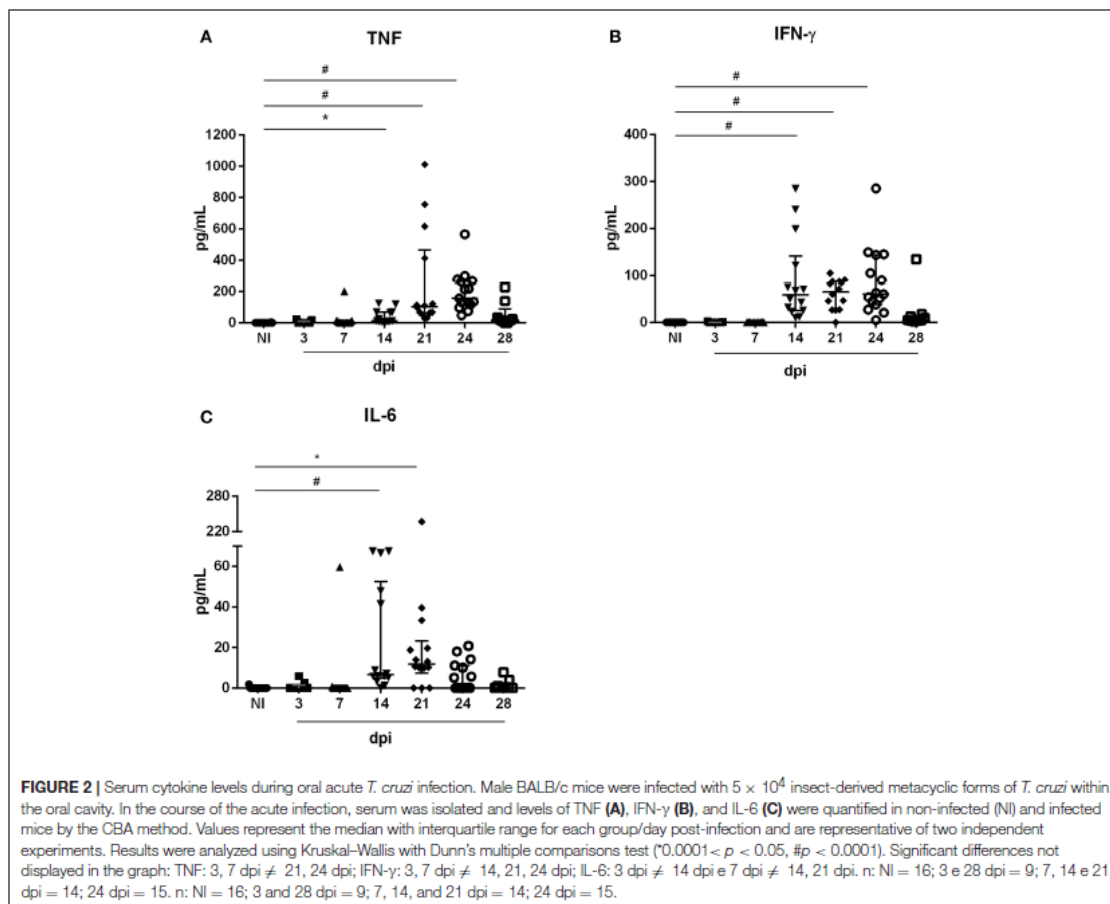
### Statistical Analysis

Data were subjected to the D'Agostino-Pearson normality test to determine whether they were sampled from a Gaussian distribution. If a Gaussian model of sampling was fulfilled, parametric test (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test) was used. If the samples deviated from a Gaussian distribution, non-parametric test (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test) was applied. All statistical analysis was done in GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.).  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### Increased Pro-inflammatory Cytokine Secretion Parallels Parasitemia Elevation in Acute *T. cruzi* Oral Infection

We initially determined the parasitemia of BALB/c mice orally infected (OI) with  $5 \times 10^4$  *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes. As shown in Figure 1, circulating parasites were first detected at 10 dpi. Furthermore, the animals showed higher numbers of parasites between 21 and 28 dpi. We next evaluated if *T. cruzi* infection caused transient changes in serum concentrations of pro-inflammatory cytokines. Accordingly, OI animals presented increased levels of TNF (Figure 2A), IFN- $\gamma$  (Figure 2B) and IL-6 (Figure 2C) when compared with non-infected animals (NI). During 14–24 dpi, all cytokines exhibited high levels concomitantly to the increased numbers of circulating parasites (Figure 1). In contrast, there were no statistically significant differences in concentrations of TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-6 in the initial stages of infection (3–7 dpi), when parasitemia is not detected. Statistically significant differences in the Th2 and Th17 cytokine levels were not detected (Figure S1).



### Mice Orally Infected With *T. cruzi* Exhibit Signs of Disseminated Intravascular Coagulation, Including Thrombocytopenia and Increased Bleeding

We analyzed several hematological parameters in NI and OI mice on 7, 14, 21, and 28 dpi. As shown in Table 1, OI induced thrombocytopenia. On day 14 and 21, the platelet counts were  $775.4 (\pm 62.54) \times 10^3/\mu\text{L}$  and  $840.8 (\pm 83.74) \times 10^3/\mu\text{L}$  for infected mice, respectively. There were no significant changes in red blood cell count, hemoglobin concentration, hematocrit and mean corpuscular volume when compared to NI. In addition, orally infected mice exhibited leukocytosis on 21 and 28 dpi (Table 1).

In order to evaluate the impact of acute infection-induced thrombocytopenia, the tail transection method was employed to evaluate the bleeding tendency. As seen in Figure 3A, OI mice showed a marked increase in bleeding at 21 dpi when compared with the NI counterparts.

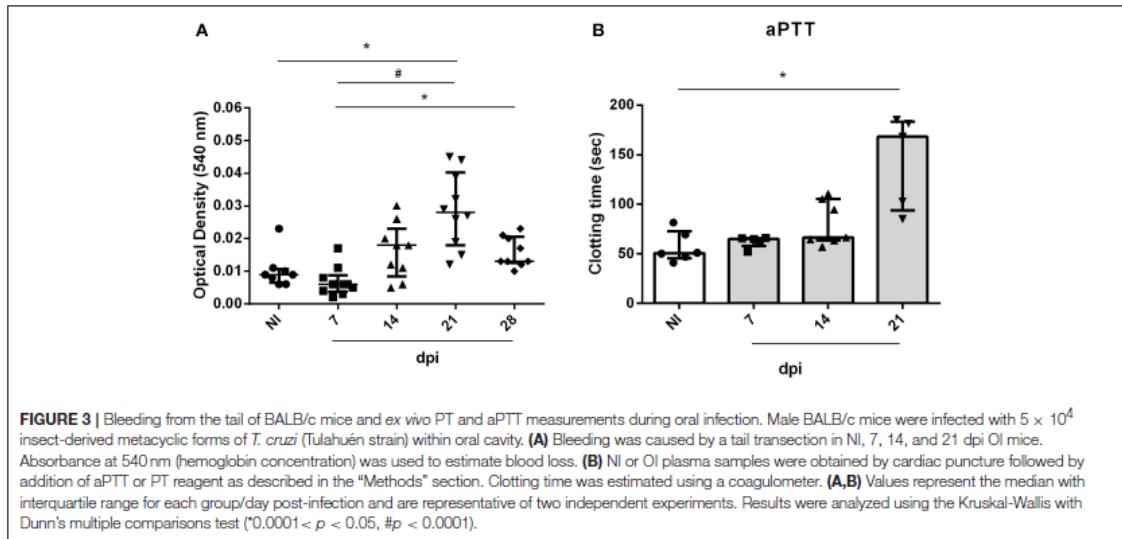
The elevated pro-inflammatory cytokine profile concomitant with the decrease in platelet count suggests that oral infection

**TABLE 1 |** Blood counts of non-infected (NI) and orally *T. cruzi* infected (OI) mice.

	NI	7	14	21	28
WBC	$6.6 \pm 0.86$	$9.1 \pm 0.41$	$7.3 \pm 0.60$	$16 \pm 2.1^*$	$18 \pm 1.4^*$
RBC	$9.8 \pm 0.27$	$11 \pm 0.20$	$9.5 \pm 0.21$	$9.1 \pm 0.27$	$10 \pm 0.46$
HGB	$14 \pm 0.33$	$16 \pm 0.35$	$14 \pm 0.41$	$13 \pm 0.45$	$13 \pm 0.49$
MCV	$52 \pm 0.97$	$52 \pm 0.42$	$49 \pm 0.47$	$53 \pm 0.35$	$49 \pm 0.69$
HMT	$51 \pm 0.58$	$58 \pm 1.1$	$47 \pm 1.3$	$48 \pm 1.6$	$49 \pm 1.6$
PLT	$1195 \pm 81.71$	$1313 \pm 101.0$	$775.4 \pm 62.54^*$	$840.8 \pm 83.74^*$	$1282 \pm 17.44$

Blood cells were measured on the Poch 100-IV DIFF hematology analyzer. Values are presented as mean  $\pm$  SEM for each group/day post-infection and are representative of two independent experiments. Results were analyzed using the Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparisons test ( $^* \neq$  NI and  $0.0001 < p < 0.05$ ). Significant differences not displayed in the graph: WBC: 7, 14 dpi  $\neq$  21, 28 dpi; RBC: 7 dpi  $\neq$  21 dpi; HGB: 7 dpi  $\neq$  21, 28 dpi; MCV: 14 dpi  $\neq$  21, 28 dpi; HMT: 7 dpi  $\neq$  14, 21 dpi. n = 5). HGB, total hemoglobin (g/dL); HMT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume (fL); PLT, number of platelets ( $10^3$  cells/ $\mu\text{L}$ ); RBC, number of red blood cells ( $10^6$  cells/ $\mu\text{L}$ ); WBC, number of white blood cells ( $10^3$  cells/ $\mu\text{L}$ ).

may course with disseminated intravascular coagulation. In order to test this hypothesis, plasma from mice were collected and used for determination of *ex vivo* aPTT and PT coagulation tests. Oral infection with *T. cruzi* prolonged the aPTT (Figure 3B) but did



**TABLE 2 |** Serum contents of D-dimer during acute phase of oral *T. cruzi* infection.

Group	Mice with D-dimer > 0 ng/mL
NI	0/6
7 dpi	0/5
14 dpi	3/6
21 dpi	2/6

Male BALB/c mice were infected with  $5 \times 10^4$  insect-derived metacyclic forms of *T. cruzi* within the oral cavity. NI or OI sera were obtained by cardiac puncture and used to measure levels of D-dimer by ELISA. The mean and SEM of animals with detectable levels of D-dimer were  $25.7 \pm 7.59$  and  $45.1 \pm 11.0$  for 14 and 21 dpi, respectively.

not affect the PT (data not show). This is compatible with a derangement in the intrinsic pathway of the coagulation cascade.

Comparison of the coagulation factor levels between NI and OI showed statistically significant differences for FV, FVII, and FVIII (Figure S2) with a consumption of FVIII at 14 dpi. D-Dimer, a fibrin degradation product that marks fibrin generation, degradation and reflects the turnover of the coagulation system, was also measured in NI and OI. The concentration of this biomarker was detected on 14 and 21 dpi in OI (Table 2).

### Blocking of IL-6 Signaling Prevents Hematological Changes in the Murine Model of *T. cruzi* Oral Infection

Oral infected mice had higher pro-inflammatory cytokine serum levels, especially between 14 and 24 dpi (Figure 2). Therefore, we hypothesized that blockade of IL-6R or soluble TNF could attenuate hemostatic changes observed in OI mice. To test this hypothesis, we treated OI mice with Tocilizumab (T), a monoclonal antibody that targets IL-6 signaling by competing for IL-6R (Figure 4A) or with a quimeric anti-TNF protein,

etanercept (Enbrel®) (Figure S3A). Both treatments started at 14 dpi. Treated OI mice group (OI+T) had a significant drop in bleeding compared with vehicle alone (saline) OI+V (Figure 4B). Moreover, OI+T had lower aPTT than OI+V and OI+isotype and showed no significant differences between non-infected controls (NI+V or NI+T) (Figure 4C). In contrast, values recorded for aPTT and bleeding assays remained unaltered after anti-TNF treatment (Figures S3B,C). These results suggest that blocking the IL-6R attenuates changes in the hemostatic system under *T. cruzi* oral infection whereas TNF blockade did not influence those alterations.

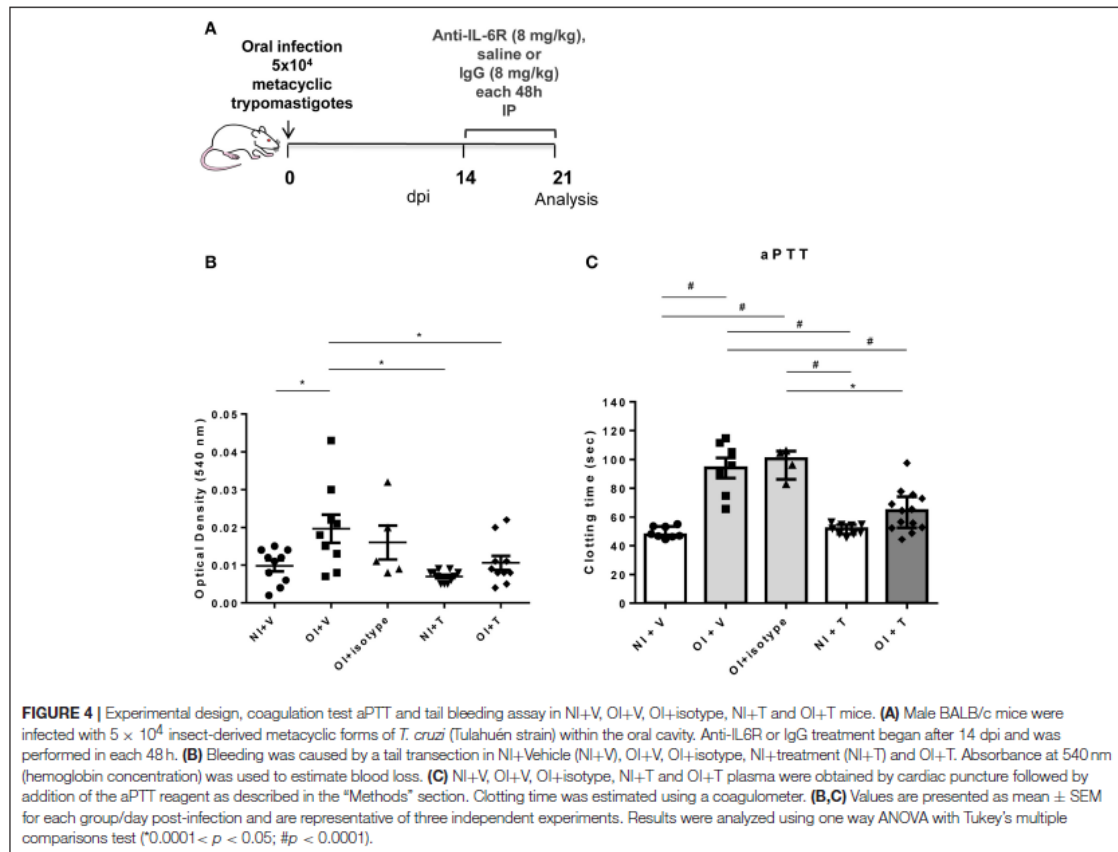
### Hematological Disturbances Are Also Observed in Subcutaneously Infected Mice

Orally infected mice showed hemostatic alterations in the acute phase. However, we wondered whether these changes were related to the oral transmission or with *T. cruzi* presence in the bloodstream. To answer this point, mice were infected with the same inoculum by the SC route. As demonstrated in Figure 5, SC infected mice also showed a significant increase in aPTT (Figure 5B) but not in bleeding tendency or PT (Figures 5A,C). Unlike OI mice, changes in aPTT of SC animals started at 14 dpi, prior to changes in OI animals (21 dpi).

At the SC route, infection killed all animals between 15 and 16 dpi.

## DISCUSSION

Previous studies indicate a relationship between inflammation and coagulation in infection (20, 21). Some patients with oral ACD present symptoms related to hemostatic alterations such as facial and lower limbs edema, minor bleeding manifestations, most commonly from nose, skin petechiae or bruising and risk



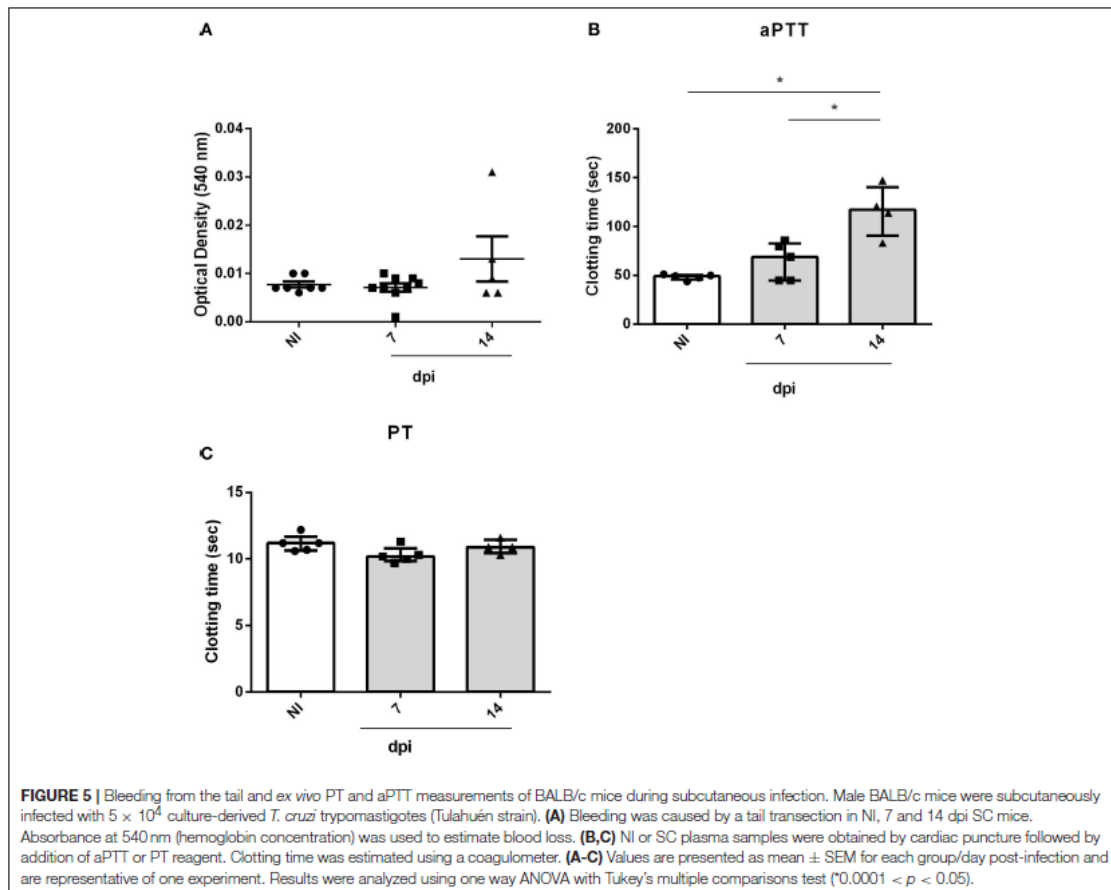
of thromboembolism (7, 11–13) indicating the need of exploring the crosstalk between immune and hemostatic systems. In the present study, we examined if the systemic inflammation led to hemostatic abnormalities in oral ACD and how blocking of IL-6 signaling pathway can modulate these changes.

We found that OI mice had significantly higher TNF, IL-6, and IFN- $\gamma$  circulating levels than controls, thus demonstrating that *T. cruzi* infection leads to a potent pro-inflammatory systemic response. This is consistent with previous data showing that Tulahuén strain of *T. cruzi* induces TNF and IFN- $\gamma$  production in BALB/c and C57BL/6 following subcutaneous (32) or OI (16). Moreover, high levels of TNF are involved in the toxic shock seen in IL-10-deficient mice infected intraperitoneally with 50 blood trypomastigotes of the Tulahuén strain of *T. cruzi* (33) as well as in cardiac, hepatic and spleen injury (16, 17). IFN- $\gamma$  and IL-6 control parasite multiplication and confers host resistance (18, 34, 35). Furthermore, chronic patients with Chagas disease have elevated circulating levels of IL-6 when compared to healthy individuals (29, 36).

Interestingly, proinflammatory cytokines play a central role in the differential effects upon the coagulation and fibrinolysis

pathways. TF is strongly induced after inflammatory stimuli mainly on monocytes and endothelial cells (23). Cytokines that have the ability to increase TF expression are TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and the chemokine CCL2 (19, 37). Injection of low doses of LPS in healthy volunteers induced endotoxemia and TF mRNA had a 125-fold increase in whole blood cells (38). Blocking IL-6 with a monoclonal antibody in a primate model of sepsis, largely prevented LPS-induced coagulation activation once decreased significantly levels of prothrombin fragment 1+2 (F1+2) and thrombin-antithrombin complex (26). Contrarily, the same treatment in humans did not reduce LPS-induced TF mRNA or plasma concentrations of the same markers of coagulation activation showing that results obtained from primates may not automatically be transferable into humans. IL-6 is also involved in platelet thrombogenicity, once after addition of this cytokine to whole blood samples of healthy individuals, a marked spreading and clumping of the platelets was induced indicating an hyper-activation state (39).

Although the coagulation alterations mentioned above have been demonstrated to occur *in vivo* as a general response to pro-inflammatory stimuli, it is likely that other hematological changes



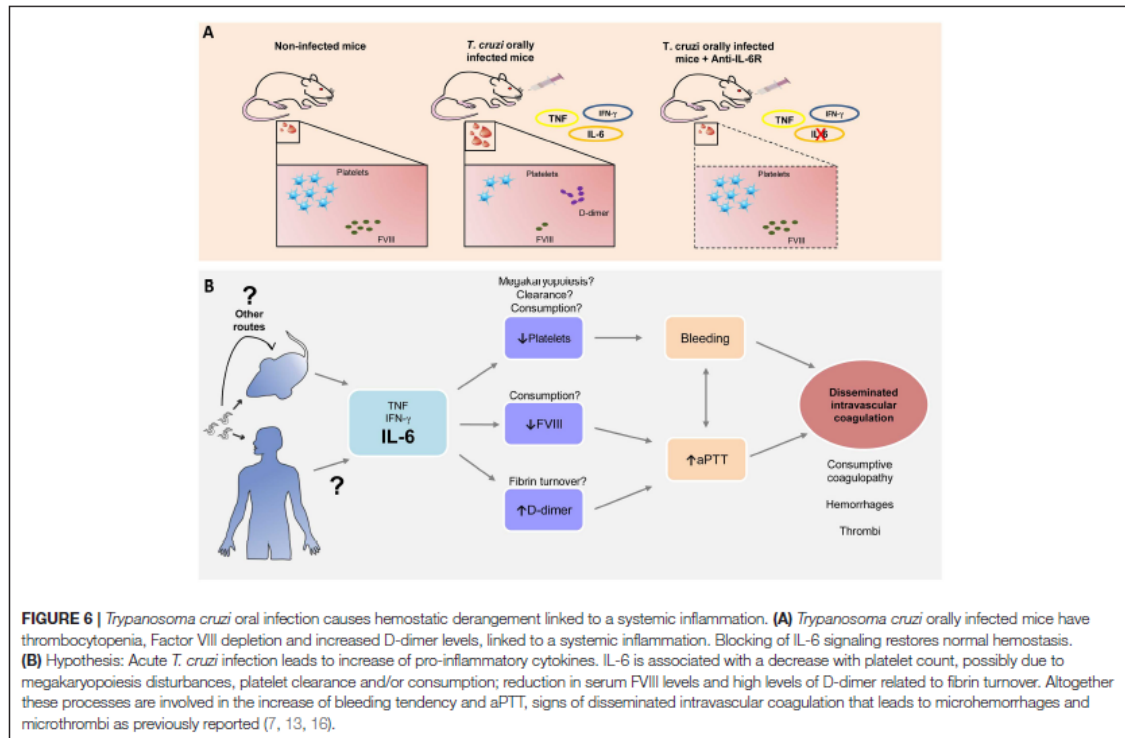
may occur. *Trypanosoma cruzi* infection in humans is associated with anemia, thrombocytopenia and leukocytosis, mainly during the acute phase of disease (1, 40). Studies in inoculated mice with different *T. cruzi* strains also revealed anemia and thrombocytopenia during the acute phase of infection (41, 42). The mechanisms underlying these changes in blood count are not fully understood, but bone marrow suppression in hemopoiesis may be involved (42). In a second vein, the parasite transsialidase may induce the accelerated clearance of the platelets after depleting their sialic acid content that could lead to the thrombocytopenia observed during ACD (43). In a review of 31 published studies concerning hematological alterations in non-human hosts infected with *T. cruzi* (44), half of the studies reported anemia. However, we did not find significant changes in the erythrogram. An explanation could be the different route of inoculation.

Additionally, increased numbers of leukocytes were observed on 21 and 28 dpi. This alteration is also described in patients and in animal models (44–47). At 21 dpi, when

platelet counts were still significantly lower, the normal platelet plug formation was affected as ascertained by tail bleeding assay. Notwithstanding, thrombocytopenia in humans with functional platelets generally does not induce or induces only minor bleeding symptoms, with the exception of life-threatening hemorrhages (48, 49). By contrast, mice with severe thrombocytopenia and inflammation resulted in spontaneous hemorrhage in different organs (50). Also at 21 dpi, beyond reduction in platelet plug formation, coagulation changes were seen with increased aPTT. Interestingly, production of D-dimer was evaluated and was detected at 14 and 21 dpi and FVIII levels were very low at 14 dpi.

Taken together, the disturbances mentioned above characterize the clinical syndrome of disseminated intravascular coagulation (DIC). This syndrome corresponds to a derangement of hemostasis with hemorrhage being the most common presentation consisting of widespread production of thrombin, which in turn leads to microvascular thrombosis, organ failure, and a consumptive coagulopathy related to a systemic





inflammation (19). In fact, we previously showed formation of thrombotic masses in the liver of OI mice (16). Patients with DIC have higher IL-6 levels with the cytokine increase being paralleled by the severity of the disease (51). Therefore, we hypothesized that blockade of the IL-6 signaling would protect or minimize the hematological disturbances observed at 21 dpi. Yet, there was an impressive reduction in inflammation associated changes comprising significant reduction in coagulation time, aPTT and bleeding time. Both did not differ from control levels. However, anti-TNF treatment did not change these parameters, suggesting that TNF is not affecting directly the coagulation cascade, as observed in sepsis (26, 27).

Thus, based on these early findings, targeting the immune system, more specifically IL-6R, during the acute phase of oral infection, can prevent a hemostatic derangement (Figure 6A). Since any long-term benefits and liabilities of the intervention still remain uncertain, it will be interesting to explore whether long-term benefits are also gained in our model of *T. cruzi* oral infection.

This study instigates many questions to explore. The hematological disturbances also develop in a parenteral route of transmission such as subcutaneously, suggesting that inflammatory response to parasite presence in the blood triggers this process. Moreover, whether there is an influence of the genetic variability of the parasite, i.e.,

*T. cruzi* DTUs (named as TcI to TcVI) correlated with more severe hematological changes. TcI, TcII, TcIII, TcIV, and TcVI genotypes had been reported in oral outbreaks (52–54) even though in the Brazilian Amazon prevails TcI (55) and in this study we used Tulahuén strain (TcVI). Ultimately, if there is any dysregulation of megakaryopoiesis leading to thrombocytopenia, changes in platelet clearance or consumption, deep alterations in fibrinolytic system remains undetermined (Figure 6B).

In conclusion, we show for the first time that oral ACD promotes a hemostatic derangement linked to systemic inflammation. This process is associated to low platelet count, bleeding and increased coagulation time, in parallel with high parasitemia. Blocking IL-6 signaling pathway ameliorates all these changes. Our studies open a new paradigm of looking to the hemostatic system when evaluating a patient infected with *T. cruzi* and suggest that translation of these results may be possible in the near future.

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of

Animal Experimentation and the Federal Law 11.794 (10/2008) Institutional Ethics Committee for Animal Research of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA-FIOCRUZ). The protocol was approved by CEUA-FIOCRUZ, License: L-028/16.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: DA, RM, and JdM. Performed the experiments: DA, AM-D-S, MR, BM, CM, and DF-d-O. Analyzed the data: DA, WS, and JdM. Wrote the manuscript: DA, WS, RM, and JdM. All authors read and revised the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Oswaldo Cruz Foundation, the Brazilian National Council for Development of Science and Technology (CNPq),

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), State of Rio de Janeiro Foundation for Funding Research (FAPERJ) and the Mercosur Program for Structural Convergence (FOCEM).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Ernesto de Meis (*in memoriam*) for conceiving the first study that gave rise to the project, Dr. Daniella Mizurini for first guidance with hematological tests, Dr. Igor Lima for clarifying some statistical doubts and the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01073/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Chagas C, Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (1909) 1:159–218. doi: 10.1590/S0074-02761909000200008
- Moraes-Souza H, Ferreira-Silva MM. O controle da transmissão transfusional. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2011) 44(suppl 2):64–7. doi: 10.1590/S0037-86822011000800010
- Márquez E, Crespo M, Mir M, Pérez-Sáez MJ, Quintana S, Barbosa F, et al. Chagas' disease and kidney donation. *Nefrologia.* (2013) 33:128–33. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2012.Sep.11636
- Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2015) 110:363–8. doi: 10.1590/0074-02760140405
- Hofflin JM, Sadler RH, Araujo FG, Page WE, Remington JS. Laboratory-acquired chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (1987) 81:437–40. doi: 10.1016/0035-9203(87)90162-3
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot.* (2009) 72:441–6. doi: 10.4315/0362-028X-72.2.441
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. *Clin Infect Dis.* (2012) 54:845–52. doi: 10.1093/cid/cir956
- Coura JR. The main sceneries of chagas disease transmission: the vectors, blood and oral transmissions - a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2014) 110:277–82. doi: 10.1590/0074-0276140362
- Santos VRC dos, Meis J de, Savino W, Andrade JAA, Vieira JR dos S, Coura JR, et al. Acute chagas disease in the state of pará, Amazon region: is it increasing? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2018) 113:e170298. doi: 10.1590/0074-02760170298
- Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* (2010) 375:1388–402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Souza PFP de, Pine RCD, Ramos FL de P, Pinto AY das N. Atrial fibrillation in acute chagas disease acquired via oral transmission: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2018) 51:397–400. doi: 10.1590/0037-8682-0296-2017
- Pinto AY, das N, Valente SA, Valente V, da C, Ferreira Junior AG, et al. Fase aguda da doença de chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2008) 41:602–14. doi: 10.1590/S0037-86822008000600011
- Pamplona De Góes Cavalcanti L, Rolim DB, Da Justa R, Neto P, Lima DC, Vilar F, et al. Microepidemia de doença de chagas aguda por transmissão oral no Ceará. *Cad Saúde Colet, Rio Janeiro.* (2009) 17:911–21.
- Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Enfermedad de chagas de transmisión oral. *Med Clin (Barc).* (2017) 148:125–31. doi: 10.1016/j.medcli.2016.10.038
- Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* (1995) 63:4862–7.
- Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet E de, Farias-de-Oliveira DA, 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:e0003849. doi: 10.1371/journal.pntd.0003849
- Andrade ZA, Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol.* (1994) 144:1403–11.
- Gao W, Pereira MA. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* (2002) 32:167–70. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00322-8
- Levi M, Keller TT, Van Gorp E, Ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovas Res.* (2003) 60:26–39. doi: 10.1016/S0008-6363(02)00857-X
- Azeredo EL de, Monteiro RQ, de-Oliveira Pinto LM. Thrombocytopenia in dengue: interrelationship between virus and the imbalance between coagulation and fibrinolysis and inflammatory mediators. *Med Inflamm.* (2015) 2015:1–16. doi: 10.1155/2015/313842
- van der Poll T, Boer JD de, Levi M. The effect of inflammation on coagulation and vice versa. *Curr Opin Infect Dis.* (2011) 24:273–8. doi: 10.1097/QCO.0b013e328344c078
- Francischetti IMB, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation.* (2008) 15:81–107. doi: 10.1080/10739680701451516
- Osterud B, Björkklid E. Tissue factor in blood cells and endothelial cells. *Front Biosci (Elite Ed).* (2012) 4:289–99. doi: 10.2741/e376
- Butenas S, Mann KG. Active tissue factor in blood? *Nat Med.* (2004) 10:1155–6. doi: 10.1038/nm1104-1155b
- Minnema MC, Chang AC, Jansen PM, Lubbers YT, Pratt BM, Whittaker BG, et al. Recombinant human antithrombin III improves survival and attenuates inflammatory responses in baboons lethally challenged with *Escherichia coli*. *Blood.* (2000) 95:1117–23.
- van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in

- experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med.* (1994) 179:1253–9. doi: 10.1084/jem.179.4.1253
27. van der Poll T, Coyle SM, Levi M, Jansen PM, Dentener M, Barbosa K, et al. Effect of a recombinant dimeric tumor necrosis factor receptor on inflammatory responses to intravenous endotoxin in normal humans. *Blood.* (1997) 89:3727–34.
  28. de Melo LM, Souza GE, Valim LR, Moreira LE, Damico EA, da Rocha TR, et al. Study of pro-thrombotic and pro-inflammatory factors in chagas cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* (2010) 95:655–62. doi: 10.1590/S0066-782X2010005000146
  29. Herrera RN, de Amaya EID, Aguilar RCP, Turoni CI, Marañón R, Berman SG, et al. Inflammatory and prothrombotic activation with conserved endothelial function in patients with chronic, asymptomatic chagas disease. *Clin Appl Thromb.* (2011) 17:502–7. doi: 10.1177/1076029610375814
  30. Herrera RN, Diaz E, Pérez Aguilar R, Bianchi J, Berman S, Luciardí HL. Prothrombotic state in early stages of chronic Chagas' disease. Its association with thrombotic risk factors. *Arch Cardiol Mex.* (2005) 75 (Suppl 3):S3–38–48.
  31. Ma D, Mizurini DM, Assumpção TCF, Li Y, Qi Y, Kotsyfakis M, et al. Desmolaris, a novel factor XIa anticoagulant from the salivary gland of the vampire bat (*Desmodus rotundus*) inhibits inflammation and thrombosis *in vivo*. *Blood.* (2013) 122:4094–106. doi: 10.1182/blood-2013-08-517474
  32. Roggero E, Perez A, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol.* (2002) 128:421–8. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01874.x
  33. Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* (2000) 68:4075–83. doi: 10.1128/IAI.68.7.4075-4083.2000
  34. Gutierrez FRS, Mineo TWP, Pavanelli WR, Guedes PMM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2009) 104(Suppl 1):236–45. doi: 10.1590/S0074-02762009000900030
  35. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2009). 104(Suppl 1):252–8. doi: 10.1590/S0074-02762009000900032
  36. López L, Arai K, Giménez E, Jiménez M, Pascuzo C, Rodríguez-Bonfante C, et al. C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as chagas disease progresses towards cardiac failure. *Rev Esp Cardiol.* (2006) 59:50–6. doi: 10.1016/S1885-5857(06)60048-0
  37. Chen JP, Cosgriff TM. Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis.* (2000) 11:461–83. doi: 10.1097/00001721-200007000-00010
  38. Franco RF, Jonge E, Dekkers PE, Timmerman JJ, Spek CA, van Deventer S, et al. The *in vivo* kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation. *Blood.* (2000) 96:554–9.
  39. Bester J, Pretorius E. Effects of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. *Sci Rep.* (2016) 6:32188. doi: 10.1038/srep32188
  40. Shikanai-Yasuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto VBA. Doença de chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* (1990) 32:16–27. doi: 10.1590/S0036-46651990000100004
  41. Cardoso JE, Brenner Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma Cruzii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (1980) 75:97–104. doi: 10.1590/S0074-02761980000200009
  42. Marcondes MCG, 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) 2:347–52. doi: 10.1016/S1286-4579(00)00333-6
  43. Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS, Campetella O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun.* (2005) 73:201–7. doi: 10.1128/IAI.73.1.201-207.2005
  44. Villalba-Alemán E, Justinico DL, Sarandy MM, Novaes RD, Freitas MB, Gonçalves RV. Haematological alterations in non-human hosts infected with *Trypanosoma cruzi*: a systematic review. *Parasitology.* (2019) 146:142–60. doi: 10.1017/S0031182018001294
  45. Moreno EA, Araujo MA, Alarcón ME, Lugo A, Moreno SC, Borges R. Hematological and blood glucose alterations in Wistar rats with acute chagas infection during gestation. *Invest Clin.* (2007) 48:187–98.
  46. Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.* (1956) 14:1035–60. doi: 10.1161/01.CIR.14.6.1035
  47. Tanowitz HB, Kirshhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* (1992) 5:400–19. doi: 10.1128/CMR.5.4.400
  48. Neunert CE, Bright BC, Buchanan GR. Severe chronic refractory immune thrombocytopenic purpura during childhood: a survey of physician management. *Pediatr Blood Cancer.* (2008) 51:513–6. doi: 10.1002/pbc.21621
  49. Chong BH, Ho S-J. Autoimmune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* (2005) 3:1763–72. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01376.x
  50. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao B-Q, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood.* (2008) 111:4958–64. doi: 10.1182/blood-2007-11-123620
  51. Seo JW, Kim HK, Lee DS, Cho HI. Clinical usefulness of plasma interleukin-6 and interleukin-10 in disseminated intravascular coagulation. *Korean J Lab Med.* (2007) 27:83–8. doi: 10.3343/kjlm.2007.27.2.83
  52. Steindel M, Kramer Pacheco I, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2008) 60:25–32. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016
  53. Meza SKL, Kaneshima EN, Silva S de O, Gabriel M, Araújo SM de, Gomes ML, et al. Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Exp Parasitol.* (2014) 146:34–42. doi: 10.1016/j.exppara.2014.08.014
  54. Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Floréz AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular epidemiology of human oral chagas disease outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* (2013) 7:e2041. doi: 10.1371/journal.pntd.0002041
  55. Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruendling AP, dos Reis D, Gomes ML, Marques de Araújo S, et al. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. *PLoS Negl Trop Dis.* (2013) 7:e2069. doi: 10.1371/journal.pntd.0002069

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Antunes, Marins-Dos-Santos, Ramos, Mascarenhas, Moreira, Farias-de-Oliveira, Savino, Monteiro and de Meis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.