Lívia Mendes Carvalho

Perfil leucocitário sistêmico e lesões no trato gastrointestinal de camundongos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* por via oral

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto - 2017

Lívia Mendes Carvalho

Perfil leucocitário sistêmico e lesões no trato gastrointestinal de camundongos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* por via oral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Profª Drª. Paula Melo de Abreu Vieira

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto - 2017

C253p Carvalho, Lívia Mendes .
Perfil leucocitário sistêmico e lesões no trato gastrointestinal de camundongos infectados experimentalmente pelo Trypanosoma cruzi por via oral [manuscrito] / Lívia Mendes Carvalho. - 2017.
57f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

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

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

1. Chagas, Doença de. 2. Infecção . 3. Trypanosoma cruzi. I. Vieira, Paula Melo de Abreu. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Titulo.

CDU: 616.937

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

UFOP

nupeb

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Perfil leucocitário sistêmico e lesões no trato gastrointestinal de camundongos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* por via oral ".

Aos catorze dias do mês de março de 2017, às 09 horas , no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Lívia Mendes Carvalho**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por .....Aprovar..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva
Examinador (UFOP)

Prof.ª Dr.ª Wanja Maria Veloso
Examinadora(UFOP)

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **14/03/2017**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559 1681
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sempre guiar meus passos, por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho e que muito contribuíram para a concretização deste trabalho.

À minha mãe, que nunca mediu esforços para ver meu sucesso e minha felicidade e que sempre confiou na minha capacidade.

Aos meus irmãos, Henrique, Flávia e Marcela, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando, me apoiando e acreditando em mim.

À Família Mendes. Indispensáveis em minha caminhada.

Ao Gabriel, pela paciência, apoio, dedicação e carinho, deixando meus dias sempre mais alegres, cheios de amor. Agradeço também Márcia, Francisco e Igor por me apoiarem e acolherem, fazendo com que eu me sentisse parte da família.

Às queridas da 'Doce Ilusão', em especial, Alice, Ceres e Virgínia que me acolheram em sua casinha e em seus corações. À linda amiga que o mestrado me deu, Ana Carolina, que tanto que me ajudou e fez meus dias mais leves.

A todos do Laboratório de Morfopatologia, onde passei momentos de grande aprendizado e muita alegria. À Wanessa e George pelas contribuições essenciais e, principalmente, pela amizade construída. Em especial aos professores Wanderson e Evandro, que contribuíram fortemente para o sucesso desse trabalho, seja com sugestões, ensinamentos ou com conselhos.

A todos do Laboratório de Imunopatologia, pelas contribuições, carinho e amizade que se tornou ainda mais forte nesses dois anos de mestrado. Pelos momentos de alegria nas confraternizações e conversas na cozinha rs. Não posso deixar de citar Kátia, Levi, Lu, João, Thays, Fê, Portuga, Joseja, Luísa, Dian, Claudia, Alexandre e Bruno. Local em que descobri ombros amigos tão especiais como Jam, Carol, Thais Ostolin e Rory Brito.

Agradeço fortemente à Thaís Carvalho, sem você este trabalho não seria realizado. Só a gente sabe o quanto foi difícil e o tanto que apoiamos uma à outra e, por isso, deu tão certo. Muito obrigada pela amizade, conselhos e por sempre estar ao meu lado.

Em especial à Paula Melo, que me acolheu desde a iniciação científica, acreditando em mim e me apoiando na busca dos meus sonhos. Obrigada pelos ensinamentos e pela incrível orientação!

À UFOP, NUPEB, PPGCBIOL e DECBI pela incrível oportunidade e qualidade de ensino condição de trabalho.

E, por fim, não posso deixar de agradecer a Ouro Preto, cidade linda que me acolheu há 7 anos, local que escolhi para ser minha morada!

Muito obrigada a todos!

Laboratório de Morfopatologia

Departamento de Ciências Biológicas – UFOP

Prof. Evandro Marques de M. Machado

Ms. Thais Vieira de Carvalho Silva

George Alberto Dias

Wanessa Serra Pessoa

Laboratório de Imunopatologia

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Profª. Cláudia Martins Carneiro

Drª. Kátia da Silva Fonseca

Ms. Levi Eduardo Soares Reis

Thays Helena Chaves Duarte

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é endêmica em quase todos os países da América Latina. No Brasil, a transmissão por via vetorial e transfusional foi controlada pela vigilância epidemiológica, tornando a infecção pela via oral o principal mecanismo de transmissão da doença no país. O trato gastrointestinal é a porta de entrada para o parasito por essa via de infecção, no entanto, pouco se sabe sobre o envolvimento desses órgãos e do perfil parasitológico e imunopatológico frente à via oral. Diante nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil leococitário sistêmico e as alterações histopatológicas no trato gastrointestinal de camundongos infectados pela via oral com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* nas fases aguda e crônica. Para isso, 140 camundongos *Swiss* foram distribuídos em três grupos experimentais: controle não infectado; infectados por via intraperitoneal (VIP); infectados por via oral (VO). Esses animais foram inoculados com $1x10^5$ formas tripomastigotas metacíclicas provenientes de culturas acelulares por gavagem (VO) ou por via intraperitoneal (VIP). Quatro animais de cada grupo foram eutanásia dos nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 180 após a infecção (DAI), sendo coletados fragmentos do estômago, duodeno e cólon. Foram então analisados ou quantificados a curva de parasitemia e a taxa de sobrevida; a fenotipagem de células mononucleares (monócitos, linfócitos T $CD4^+$, T $CD8^+$ e B) do sangue periférico por citometria de fluxo; o parasitismo tecidual por meio da técnica de PCR em tempo real; o processo inflamatório, empregando a coloração de Hematoxilina & Eosina e a neoformação de colágeno, empregando a coloração de Tricrômico de Masson. O grupo VIP apresentou pico de parasitemia no 24º DAI (530.754 tripomastigotas/0,1 ml de sangue), e o grupo VO mostrou pico de parasitemia um pouco maior, também no 24º DAI (628.085 tripomastigotas/0,1 ml de sangue). A taxa de sobrevida dos animais infectados por via oral foi de 47,63%, já o grupo VIP apresentou uma sobrevida de 87,75%. Quanto à resposta imune, observou-se uma redução no percentual de monócitos já no 14º DAI no grupo VO enquanto que no VIP não houve alterações em seus percentuais. Com relação aos linfócitos, foi observada uma redução mais precoce dos linfócitos T $CD4^+$ e dos linfócitos B do sangue periférico dos animais do grupo VO em comparação com o grupo VIP. Já os linfócitos T $CD8^+$ aumentaram a partir do 21º DAI tanto no grupo VIP quanto no VO. O parasitismo tecidual mostrou-se aumentado no grupo VO no 28º DAI no estômago, duodeno e colón quando comparado a grupo VIP. Em relação ao infiltrado inflamatório, no estômago foi observado um aumento no 28ºDAI em ambos os grupos infectados. Já no duodeno esse aumento só ocorreu no grupo VO, e no cólon, não se observa diferenças significativas entre o número de células inflamatórias ao longo da infecção nos animais do grupo VO. Não foram observadas diferenças significativas quanto à neoformação de colágeno. Diante disso, estes dados sugerem que a infecção oral possui um distinto perfil de resposta parasitológica e imunopatológica em comparação com a via intraperitoneal, sendo que a via oral apresentou um maior parasitismo tecidual nos órgãos do trato gastrointestinal avaliados durante a fase aguda.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, infecção oral, doença de Chagas, resposta imune

Chagas disease, caused by protozoan *Trypanosoma cruzi*, is endemic in almost all countries of Latin America. In Brazil, vector and transfusion transmission was controlled by epidemiological surveillance, becoming oral infection the most important mechanism of transmission of the disease in several regions of the country. The gastrointestinal tract is the gateway to parasite by this route of infection, however, little is known about the involvement of these organs and the parasitological and immunopathological profile related to oral route. Based on this, the objective of this work was to evaluate systemic profile leukocyte and the histopathological changes in the gastrointestinal tract of infected mice with the *T. cruzi* Berenice-78 strain in acute and chronic phases. For this, 140 *Swiss* mice were distributed in three experimental groups: uninfected control; infected by intraperitoneal route (IR); infected by oral route (OR). These animals received an inoculum of $1x10^5$ metacyclic trypomastigote forms from acellular cultures by gavage (OR) or intraperitoneally (IR). Four animals from each group were necropsied on days 14, 21, 28, 35, 42 and 180 after infection (DAI), and fragments of the stomach, duodenum and colon were collected. The parasitemia curve and the survival rate were then analyzed or quantified; The phenotyping of mononuclear cells (monocytes, $CD4^+$ T, $CD8^+$ T and B lymphocytes) of the peripheral blood by flow cytometry; Tissue parasitism using the real-time PCR technique; The inflammatory process, using the Hematoxylin & Eosin staining and the collagen neoformation, using the Masson's Tricromic staining. IR group showed a peak of parasitemia in 24th DAI (530,754 trypomastigotes/0.1 mL of blood), and OR group showed a slightly higher parasitemia, also in 24th DAI (628,085 trypomastigotes/0.1 ml of blood). The survival rate among the orally infected animals was 47.63% and IR group had survival rate of 87.75%. Regarding the immune response, there was a reduction in the percentage of monocytes already in 14th DAI in OR group whereas in IR there were no changes in their percentages. With regard to lymphocytes, an earlier reduction of $CD4^+$ T lymphocytes and B lymphocytes in peripheral blood was observed in OR group compared to IR group. Whereas $CD8^+$ T lymphocytes increased in 21th DAI in both IR and VO groups. The tissue parasitism was increased in OR group in 28th DAI in stomach, duodenum and colon when compared to IR group. In relation to inflammatory infiltrate, an increase in 28th DAI in both infected groups was observed in stomach. In duodenum, this increase only occurred in OR group, and in colon, there were no significant differences between the number of inflammatory cells throughout the infection in animals of OR group. There were no significant differences in collagen neoformation. Therefore, these data suggest that oral infection has a different profile of parasitological and immune response compared to intraperitoneal route, being the oral route more virulent and with greater tissue parasitism in organs of the gastrointestinal tract evaluated during the acute phase.

Key-words: Trypanosama cruzi, oral infection, Chagas disease, imune response

Lista de abreviaturas

Be-78: Berenice-78

BOD: *Biochemical Oxygen Demand*

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DAI: Dia Após a Infecção

Dch: Doença de Chagas

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

LIT: *Liver Infusion Triptose*

PBS: Tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute* (Meio de Cultivo Celular)

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

TGI: Trato gastrointestinal

VIP: Via intraperitoneal

VO: Via oral

Lista de figuras

Figura 1.....2

Figura 2.....6

Figura 3.....12

Figura 4.....18

Figura 5.....26

Figura 6.....27

Figura 7.....28

Figura 8.....29

Figura 9.....30

Figura 10.....31

Figura 11.....33

Figura 12.....34

Figura 13.....35

Lista de tabelas

Tabela 1.....21
Tabela 2.....27

Sumário

1. Introdução 1

1.1 Revisão da literatura 2

1.1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas 2

1.1.2 Importância da infecção oral na DCh 5

1.1.3 Trato gastrointestinal e seu envolvimento na DCh 8

1.1.4 Resposta imunológica no trato gastrointestinal do hospedeiro infectado pelo *T. cruzi* 10

2. Objetivo 14

2.1 Objetivo geral 15

2.2 Objetivos específicos 15

3. Material e métodos 16

3.1 Padronização da infecção experimental por via oral 17

3.2 Delineamento experimental e animais utilizados na experimentação 17

3.3 Obtenção da forma tripomastigota metacíclica de cultura 18

3.3.1 Cultivo de epimastigotas em meio LIT 18

3.3.2 Metaciclogênese das formas epimastigotas 19

3.4 Inóculo e infecção 19

3.5 Curva de parasitemia 20

3.6 Taxa de mortalidade 20

3.7 Imunofenotipagem do sangue periférico 20

3.8 Eutanásia, coleta, fixação e processamento do material para microscopia óptica convencional 21

3.9 Parasitismo tecidual 22

3.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 22

3.10 Análises histopatológicas 23

3.10.1 Processo inflamatório 23

3.10.2 Neoformação de colágeno 24

3.11 Análises estatísticas 24

4. Resultados 25

4.1 Padronização da infecção experimental por via oral 26

4.2 Curva de parasitemia e taxa de sobrevida 26

4.3 Análise do perfil fenotípico das células mononucleares presentes no sangue periférico do camundongos 27

4.4 Parasitismo tecidual 30

4.5 Análises histopatológicas 32

4.5.1 Quantificação do processo inflamatório 32

4.5.2 Quantificação da neoformação de colágeno 34

5. Discussão 36

6. Conclusão 45

7. Referências bibliográficas 47

1. Introdução

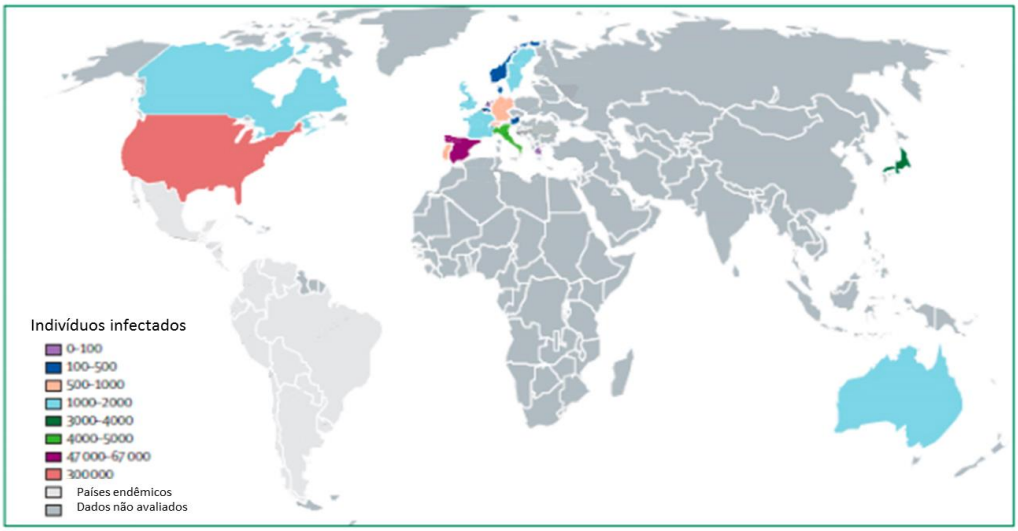
1.1 Revisão da literatura

1.1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A Triponossomíase Americana, mais conhecida como doença de Chagas (DCh), é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Ordem Kinetoplastida – Trypanosomatidae). Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2017 o número estimado de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo será de cerca de 8 milhões sendo que a grande maioria dos indivíduos encontra-se em áreas endêmicas de 21 países da América Latina. De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde, aproximadamente 100 milhões de pessoas naquela região correm risco de adquirir a doença, com 56 mil novos casos anuais podendo levar a mais de 10 mil mortes por ano.

A doença de Chagas foi considerada durante vários anos uma enfermidade predominantemente rural, encontrada exclusivamente nas Américas, estando relacionada a condições socioeconômicas da população (Schmunis, 2007). Todavia, no final do século XX com o êxodo das pessoas de áreas rurais para a cidade, a DCh passou a ser também endêmica em áreas urbanas. Além disso, devido a problemas políticos, econômicos nas regiões endêmicas, a migração da população dessas áreas para países desenvolvidos e a aproximação das áreas urbana e rural somados a falta de controle dos bancos de sangue fez com que a doença se propagasse para estes países (Piron et al., 2008). Com isso, atualmente a doença de Chagas é considerada um problema de saúde pública mundial, pois onde inicialmente não existiam casos de DCh, agora são encontrados casos notificados em diversos países da k 2Europa, além dos Estados Unidos, Canadá e Austrália (Rassi et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1: Estimativa de indivíduos infectados em todo o mundo.



Fonte: Rassi adaptado, 2010.

A forma clássica de transmissão da doença de Chagas é o contato com as fezes e urina contaminadas com o parasito liberadas pelo hospedeiro invertebrado, popularmente conhecido como “barbeiro”. O inseto transmissor é um hematófago da subfamília *Triatominae* (Ordem Hemiptera – Reduviidae), o qual durante seu repasto sanguíneo elimina formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* que podem penetrar no hospedeiro vertebrado através de microlesões na pele ou mucosa adjacente infectando, principalmente, células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). No interior de vacúolos parasitóforos formados nessas células, os parasitos diferenciam-se em formas amastigotas, aflageladas, dando início a uma série de replicações. Posteriormente, os parasitos se transformam em tripomastigotas sanguíneas, ocorre, em seguida, a lise celular e estas são liberadas na corrente sanguínea hábeis para infectar outras células hospedeiras, disseminando a infecção para os diferentes tecidos e órgãos (Cançado, 1968; De Souza et al., 2010). O ciclo biológico do *T. cruzi* continua quando o triatomíneo ingere as formas tripomastigotas sanguíneas durante a hematofagia em mamíferos infectados. No estômago do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas (não-infectivas) e seguem para o intestino até alcançarem o reto, local onde as epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (infectivas) podendo ser eliminadas nas fezes e/ou urina do triatomíneo durante o seu repasto sanguíneo reiniciando o ciclo.

A doença de Chagas possui duas fases distintas bem caracterizadas, a fase aguda e a fase crônica. Após infecção pelo *T. cruzi*, inicia-se a fase aguda, que tem duração de cerca de 2-4 meses, e se apresenta sob a forma assintomática na maioria dos casos. Entretanto, dependendo do estado imunológico e nutricional do hospedeiro, o inóculo, da cepa do parasito, dentre outros fatores, a fase aguda pode apresentar sinais e sintomas clínicos como febre, cefaleia, anorexia, vômitos, diarreia, linfoadenopatia, hepatoesplenomegalia, e ainda, sinais de porta de entrada característicos, como sinais de Romaña ou chagoma de inoculação, com reação inflamatória, linfoadenopatia e edema locais. Essa fase da doença apresenta níveis elevados de parasitemia e intenso infiltrado inflamatório em tecidos com alto parasitismo (Prata, 2001; Nunes et al., 2013). Aproximadamente 3-5% dos pacientes evoluem para o óbito nessa fase devido às complicações da miocardite e meningoencefalites, contudo a maioria dos indivíduos se recupera (Coura et al., 2002; Sanchez e Ramirez, 2013) podendo desenvolver a fase crônica, que se perpetua por toda a vida do hospedeiro. Esta fase, caracterizada pela baixa parasitemia, pode se apresentar sob a forma assintomática, denominando a forma indeterminada da doença (cerca de 70% dos indivíduos infectados desenvolvem esta forma),

com ausência de sinais e sintomas clínicos, exames eletrocardiográficos convencionais e radiológicos do tórax e abdômen normais, porém apresentam sorologia positiva para *T. cruzi* (Andrade et al., 1997). Entretanto, aproximadamente 20-35% dos indivíduos infectados desenvolvem lesões no sistema nervoso autônomo (SNA), podendo ser irreversíveis, em órgãos como o coração, esôfago e/ou cólon, progredindo para a forma sintomática da doença, denominando as formas cardíaca, digestiva ou mista (cardíaco-digestiva) (Prata, 2001; Moncayo, 2003). A cardiomiopatia chagásica é caracterizada por alterações eletrocardiográficas, taquicardias, arritmias, aneurisma de ponta, insuficiência cardíaco congestiva, dentre outros sintomas. Já a forma digestiva acomete principalmente o esôfago e/ou o cólon, embora lesões no intestino delgado também possam ocorrer, porém, em menor número. No esôfago pode-se desenvolver o megaesôfago no qual ocorre relaxamento anormal do esfíncter esofageal, diminuição do peristaltismo e acalasia, enquanto que no cólon observa-se constipação crônica, com obstrução parcial ou total de segmentos colônicos, caracterizando o megacólon (De Oliveira et al., 1998; Sanchez-Guillen Mdel et al., 2006).

Sabe-se que o *T. cruzi* possui uma variabilidade intraespecífica que pode influenciar no curso na infecção (Brener, 1965). Chiare (1963) observou que há um polimorfismo entre as diversas cepas do parasito. Foram relatadas 3 formas distintas (formas delgadas, largas e muito largas) que possuem diferentes mecanismos de interação com o hospedeiro. Por exemplo, as formas delgadas parecem ser mais susceptíveis aos mecanismos imunes e, portanto, penetram mais rapidamente nas células do hospedeiro, por outro lado, as formas largas persistem por mais tempo no sangue periférico, sendo, dessa maneira, mais resistentes às respostas imunes do hospedeiro (Brener, 1969). Somado a isso, com o avanço de técnicas mais sensíveis de detecção, foi possível determinar subpopulações do *T. cruzi*. Estas são classificadas atualmente dentro de parâmetros estabelecidos pelo chamado *Discrete Typing Units* (DTU) o qual identifica as cepas do *T. cruzi* em grupos geneticamente mais relacionados baseando-se em características genéticas e biológicas: *Tc*I, *Tc*II, *Tc*III, *Tc*IV, *Tc*V e *Tc*VI (Zingales et al., 2009). A cepa Berenice-78 (Be-78) foi isolada do primeiro caso relatado de doença de Chagas humana de uma paciente que vivia no município de Pirapora, MG, uma área endêmica da doença. Esta cepa é classificada como DTU *Tc*II e Guedes et al. (2007) demonstraram que a Be-78 é constituída predominantemente por formas largas (cerca de 90%). Outra característica inerente a essa cepa é que animais infectados com Be-78 possuem menor capacidade de controlar a parasitemia quando comparados com animais infectados com a cepa Y (formas delgadas são predominantes) (Camargos et al., 2000;

Carneiro et al., 2007; Veloso et al., 2008). Além disso, em relação ao histotropismo, a Berenice-78 possui tropismo muscular (Lana e Chiari, 1986) sendo caracterizada como uma cepa miotrópica. Essas características inerentes à Be-78 foram o fator chave para a utilização desta cepa neste experimento.

1.1.2 Importância da infecção oral na DCh

Em 1950, o Brasil institucionalizou o Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas, vinculado ao Serviço Nacional de Malária, para iniciar o controle do vetor transmissor da doença. Porém, esse programa teve alcance e impacto nacional apenas em 1975, ano em que ocorreram ações sistematizadas de controle químico das populações de triatomíneos domiciliares e, no ano de 1983, as ações de controle abrangeram totalmente as áreas endêmicas (Dias et al., 2016). Em 2006, a Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) emitiu a Certificação Internacional pela interrupção da transmissão de doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* (principal espécie do inseto transmissor da DCh) para o Brasil. Em alguns países da América Latina, o controle vetorial também tem sido feito nos últimos anos, obtendo sucesso em algumas regiões. Entretanto, em diversas áreas ainda se encontra o triatomíneo transmissor, além de países em que o combate ao triatomíneo não constitui um objetivo do governo (PAHO, 2014).

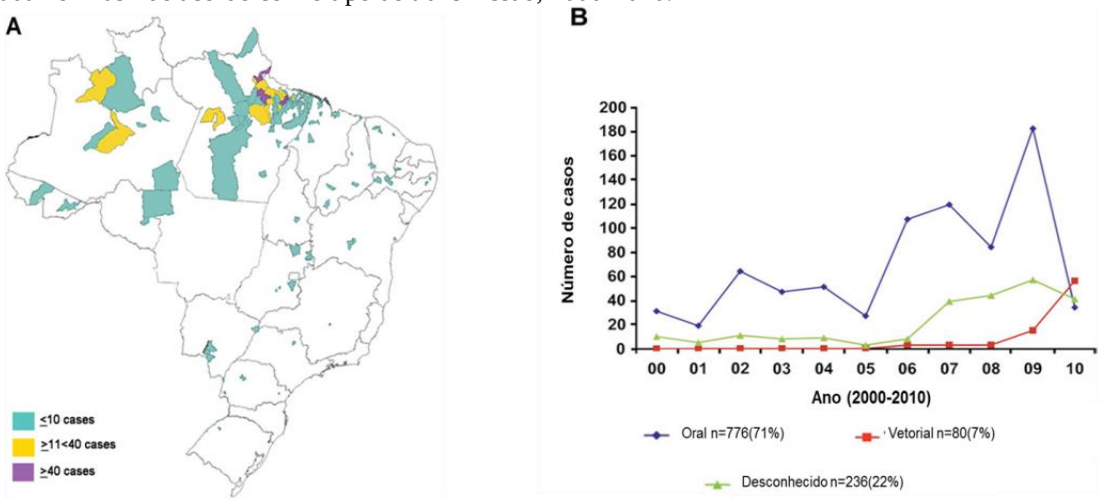
A doença de Chagas, descoberta em 1909 por Carlos Chagas, continua sendo relevante para a saúde pública, apesar dos avanços no controle desta enfermidade em países endêmicos, uma vez que a infecção proveniente da ingestão de alimentos contaminados vem se tornando predominante nos últimos anos. Acredita-se que a transmissão pela via oral ocorra naturalmente no ciclo silvestre do *T. cruzi*, no qual mamíferos suscetíveis ingerem vetores e reservatórios contaminados com o parasito (Saúde, 2009). No caso do homem, a infecção pela via oral se deve pela ingestão de sucos ou poupas de frutas, como caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) ou açaí (*Euterpe oleracea*), contaminados com as formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* oriundas de secreções de glândulas anais de marsupiais do gênero *Didelphis* ou presentes nas fezes e urina de triatomíneos (Shikanai-Yasuda et al., 1991; Pinto et al., 2008; Cavalcanti et al., 2009; Nobrega et al., 2009). Vale ressaltar que a contaminação dos alimentos pode ocorrer tanto em seu local de origem, quanto

no armazenamento e/ou transporte bem como em seu processamento ou preparação (Saúde, 2009).

No final do último século, portanto, foram implantadas ações de controle da doença por meio da realização de combate químico sistemático aos insetos vetores e/ou melhorias habitacionais, complementadas por rigorosa seleção de doadores de sangue. Nesse sentido, mesmo com intenso controle da vigilância epidemiológica, oito surtos, totalizando 112 casos agudos, foram registrados durante os anos de 1965-2009 em áreas onde o vetor está controlado. Além disso, durante o período de 2000-2010, mais de 1000 casos agudos foram relatados em 138 focos, sendo a maioria registrada na Amazônia brasileira. Destes, 776 (71%) foram atribuídos à ingestão de alimentos e bebidas contaminadas (SVS, 2011) (Figura 2).

Diante disso, de acordo com Coura (2006) após o controle da infecção vetorial e transfusional ter sido realizado no Brasil, a infecção por via oral tornou-se o mais importante mecanismo de transmissão da doença de Chagas em diversas regiões, em especial na Amazônia Brasileira.

Figura 2: A) doença de Chagas aguda no Brasil, por município, 2000-2010. B) Número de casos de doença de Chagas aguda no Brasil de acordo com o tipo de transmissão, 2000-2010.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde do Brasil, 2011.

Uma característica comum a todos esses surtos por infecção oral é a gravidade da doença, sendo que a maioria dos pacientes apresenta intensa miocardite, além de outras manifestações cardíacas, como derrame pericárdico e derrame pleural, que são mais frequentes na transmissão oral do que na vetorial, podendo culminar em morte em alguns casos ainda na fase aguda. A transmissão por via oral está associada a uma alta taxa de

mortalidade nas primeiras duas semanas após a infecção. A mortalidade foi estimada em cerca de 8-35%, superando a mortalidade observada pela via vetorial que tem sido estimada em menos de 5-10%. No surto que ocorreu em 2005 em Santa Catarina, por exemplo, a Secretaria de Saúde do Estado divulgou nota oficial em que foram constatadas infecções de 24 pessoas após ingerirem caldo de cana contaminado e destas três delas evoluíram para óbito (SVS, 2007).

Os poucos trabalhos existentes na literatura abordando essa via de infecção focam, principalmente, na interação parasito/hospedeiro, especialmente, entre as formas tripomastigotas metacíclicas e as células do estômago visando compreender as alterações neste órgão provocadas por essa interação que poderiam levar à gravidade da doença frente à via oral. Um estudo realizado por Hoft et al. (1996) não demonstrou parasitos ao longo da mucosa orofaríngea ou do esôfago os quais foram observados apenas na mucosa gástrica devido provavelmente à ligação seletiva dos parasitos à mucina gástrica (Yoshida, 2009). Além disso, as formas metacíclicas são capazes de expressar glicoproteínas de superfície que se ligam à mucina e são resistentes às condições desfavoráveis encontradas no estômago, conseguindo, dessa forma, penetrar nas células da mucosa (Mortara et al., 1992; Yoshida, 2006).

As principais glicoproteínas analisadas por pesquisadores que abordam essa via foram gp82 e gp90 sendo demonstrado que elas desempenham um importante papel no mecanismo de ligação e penetração dos parasitos nas células do estômago (Yoshida, 2008; Staquicini et al., 2010). A gp82 está relacionada com o processo de ligação e invasão da mucosa uma vez que um estudo realizado em camundongos infectados oralmente resultou em baixa parasitemia na infecção com cepas de baixa expressão de gp82 e também foi observado que parasitos que expressam esta glicoproteína possuem alta afinidade pela mucina sendo resistente à ação do suco gástrico (Cortez et al., 2003; Neira et al., 2003). Quanto à gp90, Malaga e Yoshida (2001) demonstraram que ela age negativamente no processo de invasão da mucosa gástrica, sendo que cepas cuja gp90 é digerida no estômago desenvolvem um aumento na capacidade de invadir as células da mucosa(Cortez et al., 2006).

Em relação à resposta imune, pouco se sabe sobre as alterações nesta resposta frente à infecção pela via oral. (Kuehn et al., 2014) demonstraram em ratos *Wistar* que tanto a infecção pela via intraperitoneal quanto pela via oral promovem a ativação de células mononucleares na tentativa de controlar a parasitemia, porém com perfis distintos.

Esses achados ilustram a importância de se estudar a resposta imune e as lesões frente à infecção oral para tentar compreender como a via de transmissão interfere na interação entre *T. cruzi*/hospedeiro, promovendo uma infecção mais grave.

1.1.3 Trato gastrointestinal e seu envolvimento na DCh

O trato gastrointestinal (TGI) é responsável pela digestão e absorção de moléculas nutrientes ingeridas, sendo um tubo oco constituído pela cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon e reto) e ânus, além de órgãos glandulares acessórios como fígado, vesícula biliar, pâncreas e glândulas salivares. Histologicamente, o trato digestório é formado pelas túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa. A mucosa é a camada mais interna da parede intestinal que faz contato direto com o bolo alimentar. Ela é composta de epitélio, que pode variar ao longo do trato, de lâmina própria, constituída de células absortivas, tecido conjuntivo frouxo, fibras nervosas e fibras musculares, denominando a muscular da mucosa. A submucosa está localizada abaixo da lâmina própria, a qual contém os corpúsculos celulares nervosos nos gânglios do plexo submucoso. Abaixo da submucosa, encontra-se a camada muscular circular interna, e abaixo desta, outro plexo celular nervoso, denominado plexo mioentérico. Finalmente as camadas mais externas da parede intestinal são constituídas de uma camada muscular longitudinal, denominando a túnica muscular, e da serosa que forma uma cápsula conjuntiva coberta por camadas mesoteliais escamosas ao redor do tubo digestório(Guyton, 2006).

Para que o TGI exerça suas funções, é necessária a movimentação do alimento por toda a sua extensão; secreções de soluções digestivas e digestão de alimentos (quebra das macromoléculas); além de absorção de água, de eletrólitos e de produtos da digestão; bem como a circulação de sangue através dos órgãos gastrointestinais para o transporte das substâncias absorvidas; complementarmente, o controle destas funções é feito pelos sistemas nervoso e hormonal locais(Guyton, 2006).

O sistema nervoso autônomo (SNA), através da inervação simpática ou parassimpática, é responsável pelo controle neural do TGI juntamente sistema nervoso entérico (SNE) que é uma divisão autônoma do SNA distribuída ao longo de todo o TGI. De forma geral, os SNA e SNE trabalham de maneira integrada onde neurônios do SNE são atingidos por axônios de

neurônios sensoriais extrínsecos originados no sistema nervoso simpático (SNS) ou parassimpático (SNP) (Furness, 2000). Todavia, sabe-se que o SNE também possui atividade separada do SNA. Ao longo de todo o TGI, são encontrados três diferentes tipos de plexos ganglionares: plexo mucoso; plexo submucoso ou de Meissner localizado na túnica muscular, cuja função está relacionada à secreção e absorção; e plexo mioentérico ou de Auerbach, presente no plano intermuscular da túnica muscular, o qual é responsável pela atividade peristáltica(Costa et al., 2000; Furness, 2000). (Figura 3).

Os principais órgãos afetados na doença de Chagas são aqueles ricos em tecido muscular, dentre eles o coração, uma vez que o *T. cruzi* tem preferência por células musculares (Tarleton e Zhang, 1999). Todo o trato digestório, portanto, pode ser acometido após infecção pelo *T. cruzi*, levando a diversas alterações anatômicas, histológicas e morfofuncionais. A forma digestiva pode ser determinada ainda na fase aguda, relacionando-se ao parasitismo tecidual o qual pode estar presente nas células musculares, nos fibroblastos, embora o mecanismo patogênico das lesões no SNA ainda não esteja completamente elucidado.

As manifestações digestivas parecem ocorrer principalmente devido à destruição não uniforme das células neuronais do SNE (Adad et al., 2001; Da Silveira, D'avila Reis, et al., 2007). A denervação do plexo mioentérico é uma das lesões mais frequentes na forma digestiva. Este fato já foi observado em diversos estudos presentes na literatura, os quais utilizaram diferentes cepas do *T. cruzi* e distintos modelos experimentais. Recentemente, pesquisadores mostraram uma diminuição da densidade neuronal no cólon de ratos *Wistar* infectados intraperitonealmente com a cepa CL (Schneider, et al. 2016). Em outro estudo realizado por nosso grupo, utilizando-se cães infectados com as cepas Y ou Berenice-78, foi observada uma redução significativa da área PGP 9.5 (imunomarcação de áreas ganglionares) em fragmentos de esôfago de animais infectados com ambas as cepas na fase aguda. Na fase crônica, a denervação foi mantida apenas nos animais infectados com a cepa Be-78 (Nogueira-Paiva et al., 2014). Além disso, estudos feitos em camundongos sugerem que a perda neuronal está relacionada com o tempo de infecção e com fatores genéticos ligados ao hospedeiro, dentre outros (Moreira et al., 2011).

Embora exista a necessidade de estudos complementares para entender a patogênese da forma digestiva da doença de Chagas, sabe-se que a principal manifestação é o surgimento dos chamados megas chagásicos, apresentando-se, principalmente, como megacólon e

megaesôfago. Acredita-se que a fisiopatogenia dos megas seja uma combinação de fatores, que ainda precisam ser mais bem entendidos. A presença de infiltrado inflamatório seguida de aumento da área de tecido conjuntivo principalmente na túnica muscular (Da Silveira et al., 2005; Campos et al., 2016) parecem contribuir para desencadear alterações funcionais do trato digestório por modificar a arquitetura desses órgãos, levando a mudanças no peristaltismo com consequente estagnação e retenção do conteúdo alimentar e, posteriormente, perda das microvilosidades e, especialmente, dilatação das vísceras (Koeberle, 1963; Pernía et al., 2001).

1.1.4 Resposta imunológica no trato gastrointestinal do hospedeiro infectado pelo *T. cruzi*

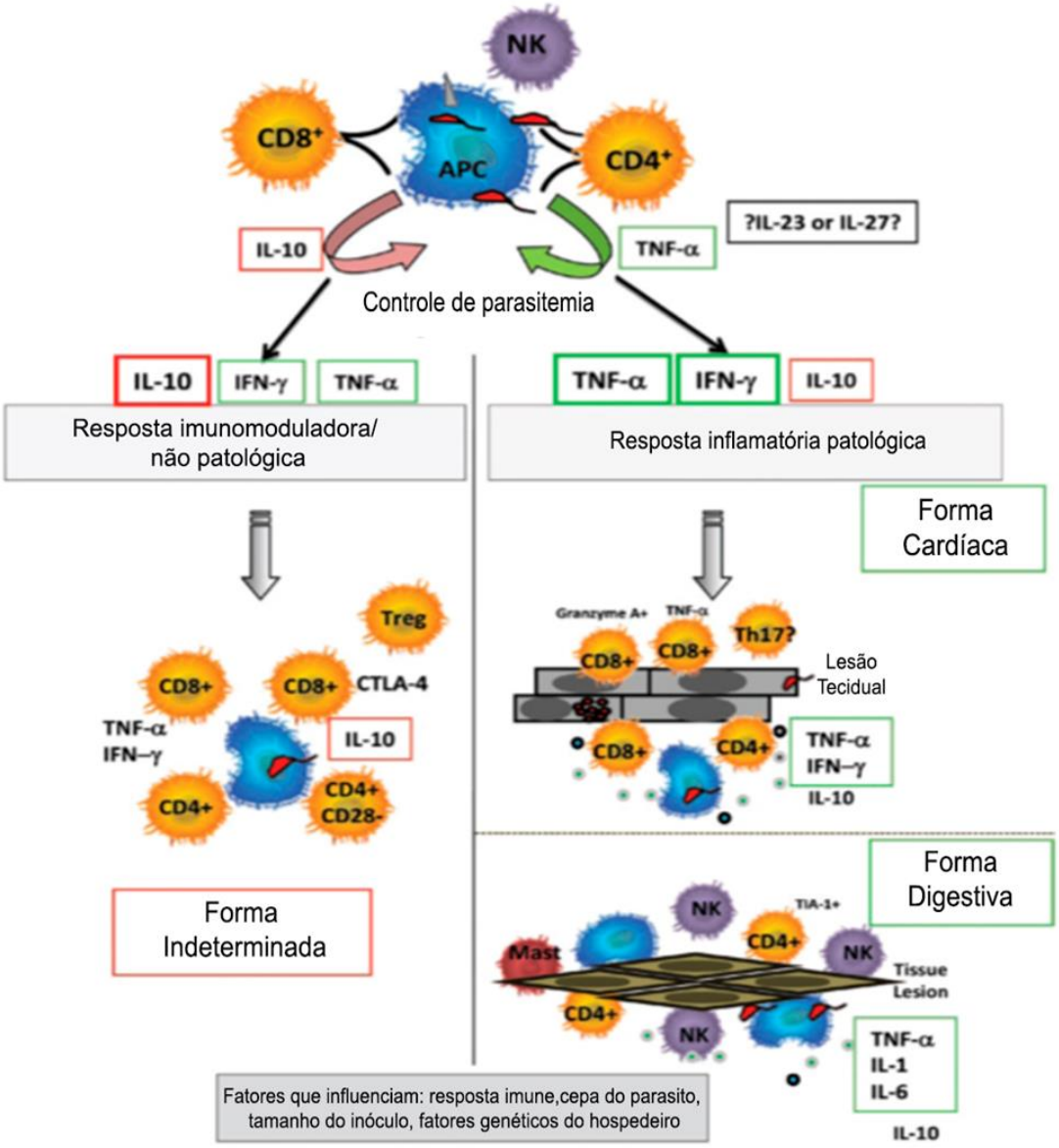
A resposta imune desencadeada pelo hospedeiro após infecção pelo *T. cruzi* é fator de grande importância para determinar se o indivíduo irá evoluir da fase aguda para a fase crônica sintomática. Embora o mecanismo que explica como alguns indivíduos desenvolvem a forma grave da doença não esteja completamente elucidado, acredita-se que a resposta imune associada a fatores ligados ao parasito como a cepa do *T. cruzi*, sua antigenicidade bem como o número de parasitos inoculados influenciam no curso e no estabelecimento da doença (Vago et al., 2000). Além disso, fatores ligados ao hospedeiro tais como seu estado nutricional, sexo e características genéticas também estão associados ao agravamento ou não da doença(Andersson et al., 2003; Campbell et al., 2004).

Aproximadamente 10% dos pacientes chagásicos que evoluem para fase crônica desenvolvem a forma digestiva da doença. As principais manifestações observadas nesses pacientes são o acometimento do esôfago e do cólon, levando ao megaesôfago e megacólon, respectivamente. Estudos mostram a presença de infiltrado inflamatório rico em células mononucleares na fase aguda da doença em camundongos infectados com a cepa Y, sendo mais intenso nas camadas muscular e da submucosa enquanto que, na fase crônica, é observado um processo inflamatório localizado ao redor de alguns gânglios mioentéricos (Campos et al., 2016). Além disso, destacam-se que o infiltrado inflamatório observado nas miocélulas dos órgãos do trato gastrointestinal é constituído principalmente por linfócitos T $CD3^{+}CD4^{+}$, linfócitos B, células NK e macrófagos (Corbett et al., 2001; D'avila Reis et al., 2001; Dutra et al., 2014) (Figura 3). Adicionalmente, a persistência do parasito, indicada pela

presença de cDNA de *T. cruzi* (Jones et al., 1993; Vago et al., 1996; Vago et al., 2000), sugere que o parasito estimula a ativação das células T, fato que pode explicar o achado inflamatório nos tecidos na fase crônica. Adicionalmente, um estudo realizado em camundongos demonstrou que tanto a resposta Th1 quanto a Th2 são capazes de induzir proteção na mucosa após infecção oral pelo *T. cruzi*, entretanto, somente a Th1 protege em nível sistêmico (Hoft e Eickhoff, 2002).

Relatos da literatura sugerem que a denervação, principal mecanismo que leva ao aparecimento de megaesôfago e de megacólon, ocorre devido à imunorreatividade de peptídeo intestinal vasoativo e óxido nítrico sintetase, acarretando na destruição de neurônios inibitórios, principalmente, o que pode levar à dilatação do lúmen intestinal e à perda de contratilidade muscular desses órgãos (Da Silveira, D'avila Reis, et al., 2007). Além disso, Da Silveira, Lemos, et al. (2007), mostraram que pacientes chagásicos com megacólon apresentaram redução de fibras nervosas marcadas com anticorpo monoclonal anti-PGP 9.5 nos plexos mioentéricos quando comparados com pacientes chagásicos sem megacólon e com indivíduos não infectados.

Figura 3: Infiltrado celular e citocinas envolvidas na geração de resposta imune protetora e patogênica na doença de Chagas.



Fonte: Dutra et al. (2009) modificado.

No Brasil, com o intenso controle da transfusional e vetorial da doença de Chagas, a infecção pela via oral vem se tornando o principal mecanismo de transmissão, culminando em surtos que, muitas vezes, apresentam uma maior gravidade levando alguns indivíduos ao óbito ainda nas duas primeiras semanas de infecção. Somado a isso, os poucos trabalhos existentes na literatura que abordam a via oral focam principalmente na interação parasito/mucina gástrica. Além disso, diante do exposto e levando em conta que os poucos trabalhos que abordam a via oral deixam uma lacuna sobre o envolvimento do trato digestivo, um estudo

sobre as lesões do trato gastrointestinal bem como da resposta imune sistêmica torna-se necessário para o melhor entendimento da doença frente à infecção pela via oral.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil leucocitário sistêmico bem como as alterações histopatológicas no trato gastrointestinal de camundongos infectados experimentalmente pela via oral com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* nas fases aguda e crônica.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar a infecção experimental por via oral;
- Analisar a curva de parasitemia e a taxa de sobrevida;
- Avaliar o fenótipo de células mononucleares no sangue periférico;
- Quantificar o parasitismo no estômago, duodeno e cólon;
- Analisar o processo inflamatório no TGI;
- Investigar a neoformação de colágeno no TGI.

3. Material e métodos

3.1 Padronização da infecção experimental por via oral

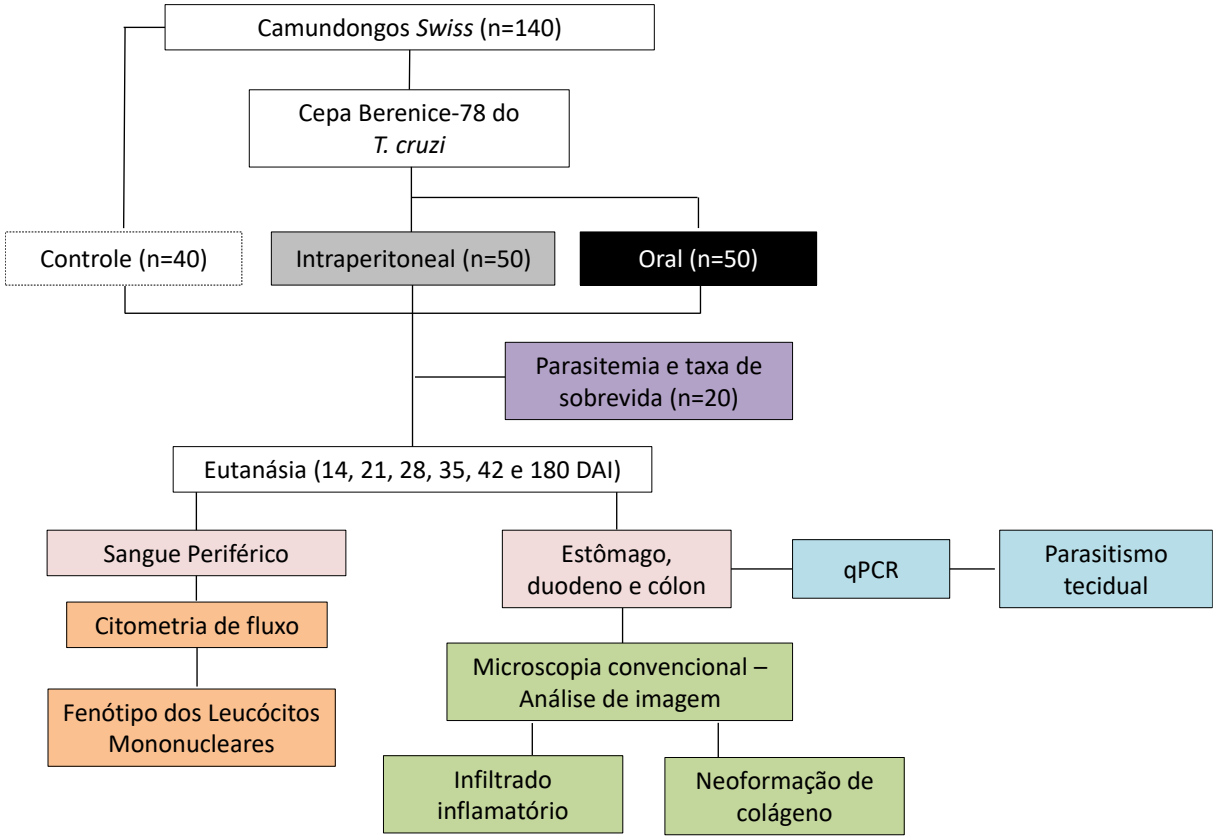
Com o objetivo de se obter uma alta taxa de infectividade, foi feito um estudo prévio utilizando três diferentes formas de realizar o inóculo por via oral. Foi testada a gavagem completa que é a introdução da agulha de gavagem cuidadosamente até o estômago. Também foi feita a gavagem incompleta, que consiste em introduzir a agulha de gavagem até a parte inicial da cavidade orofaríngia dos animais. E também foi testada a pipetagem diretamente na boca dos camundongos. Além disso, as três diferentes formas de infecção oral foram comparadas utilizando PBS ou RPMI. O inóculo utilizado para a infecção foi de $1x10^5$ formas tripomastigotas metacíclicas obtidas em meio de cultura acelular.

3.2 Delineamento experimental e animais utilizados na experimentação

Foram utilizados 140 camundongos *Swiss*, jovens (idade: 30 dias), machos, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, MG, os quais foram distribuídos em três grupos experimentais: controle não infectado; controle infectado por via intraperitoneal (VIP); infectados por via oral (VO). Os animais receberam inóculo de $1x10^5$ formas tripomastigotas metacíclicas provenientes de culturas acelulares da cepa Berenice-78 por gavagem incompleta (VO) ou por via intraperitoneal (VIP). Esse último grupo será nosso controle de infecção, visto que essa é a principal via utilizada em trabalhos experimentais da doença de Chagas.

Na figura 4 encontra-se a distribuição dos animais nos diferentes grupos, constando o número total de animais em cada grupo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº2012/13).

Figura 4: Delineamento experimental



Nota: Distribuição dos animais que foram utilizados para caracterização da lesão nos órgãos do trato gastrointestinal (verde), para avaliação do perfil leucocitário sistêmico (laranja) e para a quantificação da carga parasitária tecidual (azul). Grupo controle não infectado em branco com linhas tracejadas. Grupo infectado pelo *T. cruzi* por via intraperitoneal em cinza. Grupo infectado pelo *T. cruzi* por via oral em preto. Experimento foi realizado em duplicata. Dias após a infecção: DAI.

3.3 Obtenção da forma tripomastigota metacíclica de cultura

3.3.1 Cultivo de epimastigotas em meio LIT

Foi coletado com EDTA aproximadamente 1000µL de sangue do plexo orbital de um camundongo sabidamente infectado com a cepa Be-78 do *T. cruzi*. Essa quantidade foi transferida para um tubo tipo Falcon de 15mL, previamente autoclavado, contendo EDTA, onde foram adicionados 2mL de meio LIT 10% (1:3), também anteriormente autoclavado. Este tubo contendo o sangue infectado no meio LIT foi mantido em estufa de BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) à temperatura de 28ºC por 15 dias. Após este período, foi

feito o repique transferindo 1mL da cultura para outro tubo tipo Falcon de 15mL e adicionando 2 mL de meio LIT. O repique foi repetido de 15 em 15 dias, mantendo a proporção de 1:3, e completando cerca de 1,5 mês, até à purificação da cultura com observação da presença de epimastigotas viáveis (vivos e com morfologia e motilidade normais) em microscópio óptico em objetiva de 40x. Todo o procedimento foi feito em capela de fluxo.

3.3.2 Metaciclogênese das formas epimastigotas

A cultura rica em epimastigotas viáveis obtida seguindo o procedimento descrito acima foi submetida à metaciclogênese. Para isto, em uma garrafa de cultura de 40mL esterilizada, foram adicionados 5mL dessa cultura e 10mL de meio *Grace's Insect Medium* 20% com L-glutamina e $NaHCO_3$, Sigma® *Life Science* (Sigma, Aldrich, USA) estéril (1:3). Feita a homogeneização em movimentos circulares, a garrafa contendo a cultura foi mantida na horizontal em estuda de BOD à 28ºC, durante 45 dias. Após este período, a cultura foi diluída 10x em PBS previamente autoclavado para observar a presença e posterior contagem das formas tripomastigotas metacíclicas em câmara de Neubauer em microscópio óptico e ajuste do inoculo para $1x10^5$ parasitos.

3.4 Inóculo e infecção

Após a contagem das formas tripomastigotas metacíclicas em câmara de Neubauer, o número de parasitos encontrado em 1000µL foi ajustado para valor do inóculo, que foi de $1x10^5$ formas por animal. A cultura, com a quantidade de parasitos conhecida, foi então centrifugada a 2200 rpm por 10 minutos à 4ºC obtendo a formação de um *pellet* no qual contém as formas tripomastigotas metacíclicas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em PBS ou RPMI para a realização da infecção dos animais. Após a preparação do inóculo, foi feita a infecção de 100 camundongos, 50 por via intraperitoneal, utilizando a cultura de parasitos ressuspendida com PBS, e 50 por via oral, utilizando a cultura ressuspendida com RPMI. A infecção pela via oral foi feita através da gavagem incompleta, procedimento em que se introduz a agulha de gavagem até a parte inicial do esôfago do camundongo.

3.5 Curva de parasitemia

Para determinação da parasitemia, 10 camundongos grupo VIP e 10 do VO foram avaliados diariamente a partir do 4º dia após a infecção (DAI) até a negativação do exame, por cinco dias consecutivos, segundo a metodologia de Brener adaptada (1962). Cinco µL de sangue da veia caudal dos camundongos foram analisados diariamente ao microscópio óptico e a curva de parasitemia plotada para cada grupo experimental empregando a média diária da parasitemia detectada nos animais. Esta foi expressa em número de tripomastigotas sanguíneos por 0,1mL de sangue. O período pré-patente, período patente e o pico máximo de parasitemia foram determinados.

3.6 Taxa de mortalidade

Os animais utilizados para a determinação da curva de parasitemia foram acompanhados diariamente até o 180º DAI sendo a mortalidade registrada e expressa em porcentagem cumulativa.

3.7 Imunofenotipagem do sangue periférico

Para a caracterização do perfil fenotípico das células mononucleares do sangue periférico foi coletado 200µL de sangue do plexo retro-orbital em EDTA de cada animal dos três grupos experimentais. Em tubos de poliestireno 12x75mm, foram adicionados 20µL da diluição do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse conjugado com fluorocromo (Tabela 1).

Para cada tubo contendo 20µL da diluição do anticorpo monoclonal em PBS e soro normal de rato, foram adicionados 25µL de sangue periférico total. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise diluída 10 vezes em água destilada. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e então submetidas à centrifugação (1300rpm, 7 minutos a 18°C). Em seguida, o sobrenadante

foi descartado, os leucócitos foram lavados com 3mL de PBS (pH7,4), e centrifugados como descrito anteriormente. Finalmente, os leucócitos foram fixados com 200µL de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1 % de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de pelo menos 15 minutos, os parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® – Becton Dickinson). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e o FlowJo® para a análise dos resultados empregando diferentes estratégias.

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

Anticorpos	Fluorocromo	Fabricante	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD3	PE	Bioscience	2C11	Linfócitos T totais
Anti-CD4	PercP	Biolegend	RM4-5	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC	Invitrogen	S3-6.7	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD19	FITC	eBioscience	1D3	Linfócitos B
Anti-CD14	FITC	eBioscience	Sa2-8	Monócitos

3.8 Eutanásia, coleta, fixação e processamento do material para microscopia óptica convencional

Quatro animais de cada grupo foram eutanasiados, por deslocamento cervical, nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 180 após a infecção para a realização da eutanásia . Foram coletados o estômago, duodeno e cólon, uma parte desses órgãos foram fixados em solução de Metanol/DMSO (80%/20%) com pH 7.2 para as análises histopatológicas e outra foi armazenada em freezer -80°C para posterior quantificação do parasitismo tecidual. Fragmentos desses órgãos foram processados rotineiramente e incluídos em parafina. Os blocos de parafina obtidos foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes com espessura de 4µm. As lâminas dos blocos parafinizados dos órgãos coletados foram confeccionadas para coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) ou de Tricrômico de Masson para análise das alterações histopatológicas em microscópio óptico.

3.9 Parasitismo tecidual

3.9.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.9.1.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Kit *Wizard™ Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA). Os tecidos previamente armazenados em freezer -80ºC foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi e pesados obtendo fragmentos de 20-30mg. Estes foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5mL nos quais se adicionaram 500µL da solução de lise nuclear (*Nuclear Lise Solution*) e, então, foram mantidos em gelo por 2 minutos. Em seguida, as amostras receberam 20µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®), na concentração de 20mg/L, e após homogeneização, foram incubadas *overnight* em banho-seco a 55°C. No outro dia, após digestão completa dos fragmentos, observando a presença de um homogenato, adicionaram-se 3µL da Solução de RNAse (Promega) e, durante 30 minutos a 37ºC, as amostras foram incubadas. Após este tempo e posterior ao resfriamento por 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200µL de solução de precipitação proteica (*Protein Precipitations Solution*). Mantidas no gelo por 5 minutos, as amostras foram, então, homogeneizadas vigorosamente em vórtex durante 20 segundos e centrifugadas a 16.000 rcf (temperatura ambiente, 5,5 minutos) com formação de um *pellet*. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo contendo 600µL de isopropanol e misturado delicadamente por inversão por 1-2 minutos até turvação do DNA. Novamente as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm, à temperatura ambiente, porém, durante 5 minutos, sendo observada a formação de um *pellet* claro. O sobrenadante foi descartado e após a adição de 200µL de etanol 70% (ETOH), as amostras foram centrifugadas por 3 minutos também à temperatura ambiente. O etanol foi então vertido e as quantidades remanescentes evaporadas. Por fim, 100µL da solução de re-hidratação de DNA (*DNA Rehidratation Solution*) foram adicionados às amostras que permaneceram à temperatura ambiente durante 18 horas para posterior quantificação do DNA e de sua pureza os quais foram analisados em nanoespectrofotômetro (Nanodrop® 2000, Thermo Scientific). Após a dosagem, as amostras foram armazenadas a -20ºC até o momento da análise por qPCR.

3.9.1.2 Amplificação específica do DNA do *T. cruzi*

A fim de quantificar os parasitos por qPCR, foi construída uma curva padrão para determinar o número de cópias do DNA do parasito. Para realizar este procedimento, utilizou-se epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, crescidas em meio de cultura, até atingir o número de 1 x 10^7 parasitos, os quais foram submetidos ao protocolo de extração de DNA (conforme descrito acima), seguido de sua quantificação e pureza utilizando o nanoespectrofotômetro *NanoDrop*® 2000 (*Therno Scientific*). A partir daquele número de parasitos, foram feitas diluições seriadas em água (1:10) com o objetivo de obter os pontos da curva, totalizando seis pontos, cujas quantidades foram medidas a partir de DNA equivalente a 1 x 10^5 até 1 x 10^0 parasito.

Foram utilizados os iniciadores TCZ-F 5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3', (onde M = A or C) e TCZ-R 5'-CCAA-GCAGCGGATAGTTCAGG-3' que amplificam o produto de 195 bp do DNA nuclear do *T. cruzi*, conforme descrito por Cumming e Tarleton, 2003. Além disso, utilizaram-se, como controle de amplificação, os iniciadores de fator de necrose tumoral (TNF) murino, cujas sequências são: TNF-5241(F) 5'-TCCCTCTCATCA-GTTCTATGGCCC-3' e TNF-5411(R) 5'-CAGCAAGCAT- CTATGCACTTAGAC-3'. Cada placa de reação de 96 poços, continha 7µL de mix de *Sybr*® *Green* PCR Mastermix (*Applied Biosystems*) + TCZ/R;F (em duplicata) ou 7µL de mix de Sybr Green + TNF/5241;4511 (em unicata), portanto, cada amostra de DNA foi quantificada em triplicata. Além disso, também foram adicionados nos poços 3µL da curva padrão e 3µL da amostra extraída e posteriormente diluída em água, contendo 50ng de DNA genômico. A placa continha um controle negativo da reação constituído por iniciadores específicos do *T. cruzi* e água, sem a presença do DNA. A amplificação do DNA foi feita utilizando o equipamento 7500 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*).

3.10 Análises histopatológicas

3.10.1 Processo inflamatório

A quantificação do processo inflamatório foi realizada em cortes de estômago, duodeno e cólon submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina. Para avaliação do infiltrado

inflamatório, todos os núcleos celulares presentes foram quantificados em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a 1,5 x 10^6 μm^2) para a quantificação. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B e todas as imagens foram analisadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. O processo inflamatório foi determinado pela diferença significativa (p<0,05) entre o número de núcleos celulares presentes nos animais infectados pelo *T. cruzi*, distribuídos nos grupos VIP e VO, e aquele observado nos animais não-infectados ± desvio padrão.

3.10.2 Neoformação de colágeno

A área ocupada por tecido conjuntivo fibroso foi obtida pela análise de 30 campos aleatórios dos cortes corados por Tricrômico de Masson de cada animal do estudo sendo visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B. Utilizando-se o mesmo software descrito acima, os pixels com tons de azul foram selecionados para a criação de uma imagem binária e posterior cálculo da área total ocupada por colágeno.

3.11 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.01 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Para a avaliação dos dados, foi realizada análise de variância (ANOVA one-way) para testes paramétricos ou não. Quando as alterações foram paramétricas, o teste de Tukey foi feito para determinar as diferenças específicas entre as médias (análise longitudinal dentro de um mesmo grupo) ou o Test T de Student (entre os grupos VO e VIP), quando as médias foram não-paramétricas o teste Kruskal-Wallis foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias (análise longitudinal dentro de um mesmo grupo). Diferenças entre médias com valores de p menores que 0,05 foram consideradas significativas.

4. Resultados

4.1 Padronização da infecção experimental por via oral

Com o objetivo de padronizar a forma de se realizar a infecção pela via oral, foram comparadas três diferentes formas de se infectar experimentalmente por via oral por meio de um estudo piloto realizado. Os camundongos infectados por gavagem completa apresentaram baixa taxa de infectividade, sendo que apenas 50% dos animais foram positivados no exame de parasitemia. Por outro lado, os animais infectados por gavagem incompleta e por pipetagem apresentaram 100% de taxa de infectividade.

4.2 Curva de parasitemia e taxa de sobrevida

A taxa de infectividade entre os animais inoculados com as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Be-78 por via intraperitoneal foi de 100%, enquanto que naqueles infectados oralmente foi de 95%. Na Figura 5 observam-se as curvas de parasitemia dos animais pertencentes aos grupos VIP e VO. O grupo VIP apresentou período pré-patente de 9 dias, patente de 41 dias e pico de parasitemia no 24º DAI (530.754 tripomastigotas/0,1 ml de sangue). Já no grupo VO observaram-se períodos pré-patente de 8 dias e patente de 36 dias, com pico de parasitemia um pouco maior, também no 24º DAI (628.085 tripomastigotas/0,1 ml de sangue). Não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as áreas sobre a curva de ambos os grupos. Na tabela 2 constam os valores máximos parasitêmicos, além do dia do pico de parasitemia, e os períodos pré-patente e patente de ambas as vias de infecção.

Figura 5: Médias das curvas de parasitemia dos camundongos *Swiss* pertencentes aos grupos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas por via oral (VO) ou por via intraperitoneal (VIP) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos, com 10 animais em cada grupo. As curvas plotadas representam a média de 20 animais por grupo.

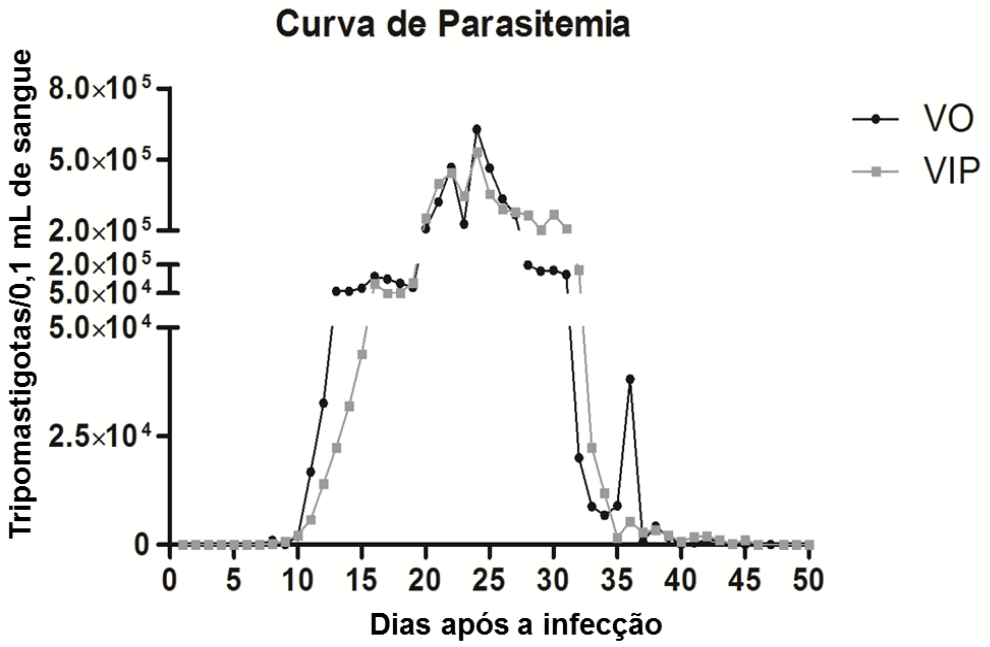


Tabela 2: Níveis parasitêmicos, dia do pico de parasitemia, períodos pré-patente e patente.

Grupos	Níveis parasitêmicos máximos (tripomastigotas/0,1mL sangue)	Dia do pico de parasitemia	Período pré-patente	Período patente
VO	628.085	24º DAI	8 DAI	36 DAI
VIP	530.754	24º DAI	9 DAI	41 DAI

A taxa de sobrevida dos animais do grupo VIP foi de 87,75% enquanto que os animais infectados por via oral foi de 47,63% (Figura 6).

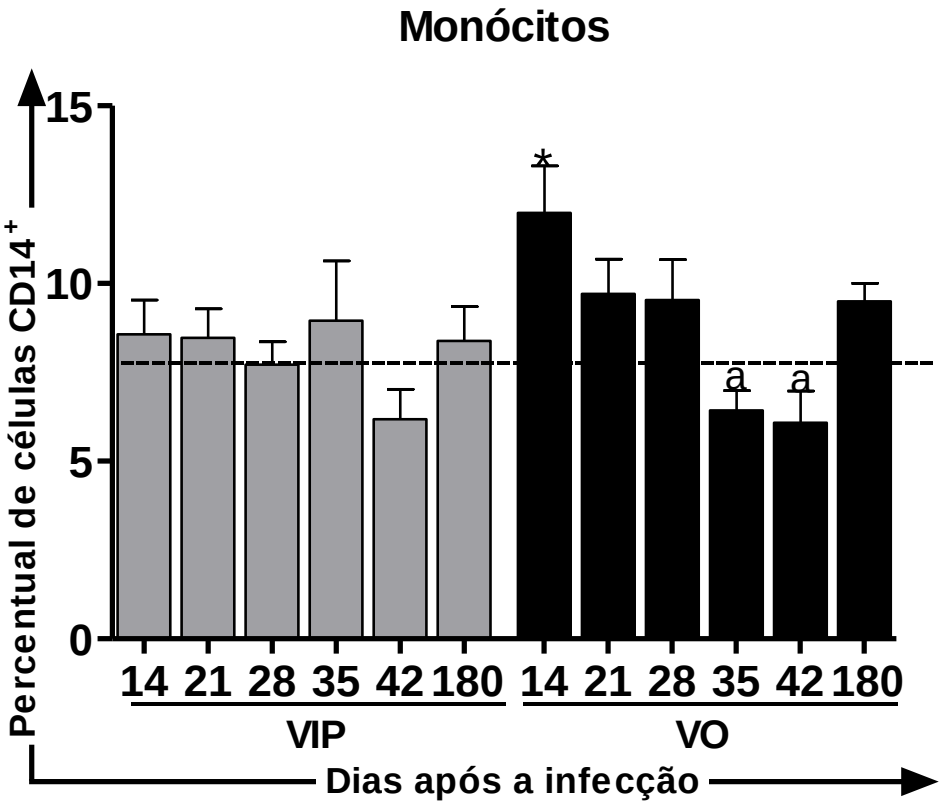
Figura 6: Taxa sobrevida dos camundongos *Swiss* infectados por via oral (VO) ou por via intraperitoneal (VIP) com 1,0 x 10^5 tripomastigotas metacíclicas da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos, com 10 animais em cada grupo. As curvas plotadas representam a média de 20 animais por grupo.

4.3 Análise do perfil fenotípico das células mononucleares presentes no sangue periférico dos camundongos

Para melhor entendimento do efeito da infecção pela via oral sobre o perfil leucocitário sistêmico ao longo das fases aguda e crônica foi realizada a análise fenotípica das células mononucleares no sangue periférico.

A figura 7 mostra os resultados obtidos referentes ao percentual de monócitos. É possível observar que nos animais do grupo VIP não há diferenças estatísticas entre a porcentagem dessas células ao longo da infecção e em comparação com a média dos valores dos animais não infectados. No entanto, no grupo VO encontra-se um aumento do número de monócitos já no 14º DAI em relação ao grupo controle não infectado, sendo que nos dias 35 e 42 após a infecção esses valores sofrem uma redução em comparação com o 14º DAI.

Figura 7: Imunofenotipagem de células do sangue periférico de Camundongos *Swiss* infectados com *Trypanosoma cruzi* por via intraperitoneal (VIP) ou por via oral (VO) nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 180 após a infecção. Porcentagem de Monócitos (CD 14^+). Linhas tracejadas indicam a média do número de células do grupo não infectado. * indica diferenças significativas ($p<0.05$) entre o grupo não infectado e os grupos VIP ou VO. Os dados são apresentados como média ± erro padrão de oito camundondos de cada grupo em cada tempo de infecção. Diferenças significativas ($p<0.05$) são ilustradas pelas letras ‘‘a’’, ‘‘b’’, ‘‘c’’, ‘‘d’’, ‘‘e’’ e “f” para comparações com o dia 14, 21, 28, 35, 42 e 180, respectivamente. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos, com 4 animais em cada grupo. Os dados plotados representam a média de 8 animais por grupo em cada tempo após infecção.

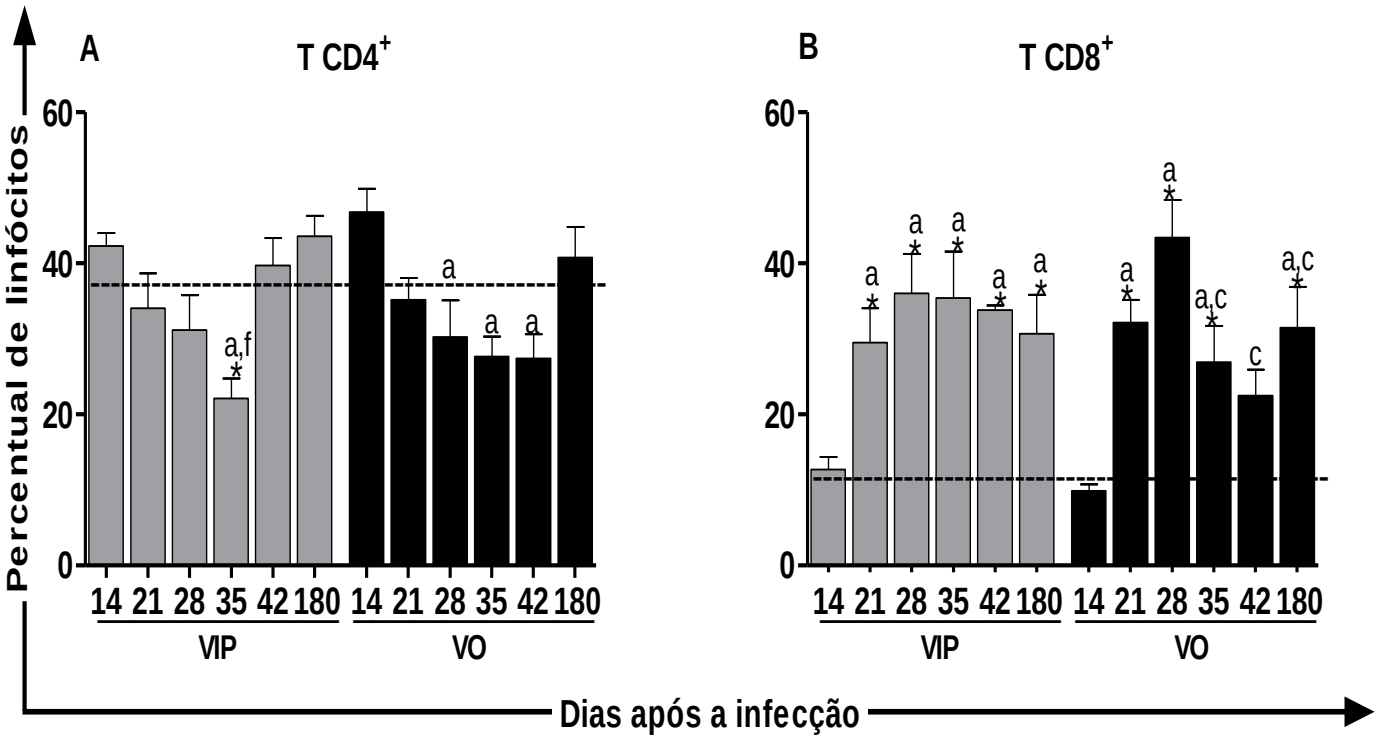


Em relação aos linfócitos T $CD4^+$, nos animais do grupo VIP observa-se uma redução do percentual dessas células no 35º DAI em relação ao valor encontrado no 14º e 180º DAI e também ao número médio dessas células dos animais do grupo controle não infectado,

reestabelecendo os níveis basais no dia 42 persistindo até a fase crônica. Enquanto que nos camundongos pertencentes ao grupo VO essa redução foi mais precoce, ocorrendo já no 28º DAI e permanecendo até o 42º DAI, além disso, seus níveis são reestabelecidos apenas no 180º DAI (Figura 8A).

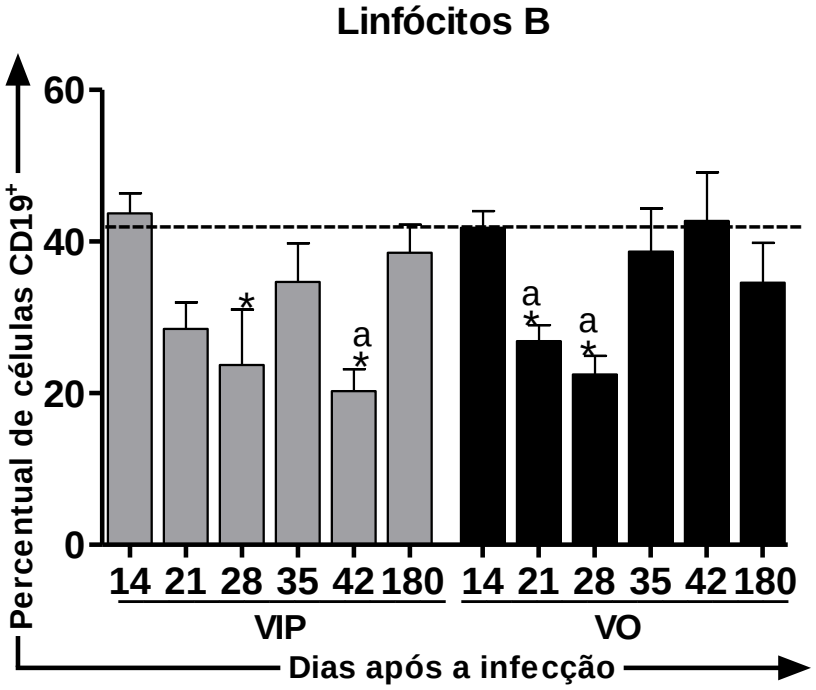
No que concerne aos linfócitos T CD8$^+$, é possível constatar que há um aumento do seu percentual já no 21º DAI em relação ao 14º DAI e em relação aos valores médios dessas células dos animais do grupo controle não infectado tanto nos camundongos do grupo VIP quanto nos do grupo VO. No entanto, esse aumento persiste até a fase crônica no grupo VIP, enquanto que no grupo VO, observa-se um aumento mais acentuado no 28º DAI. Sendo que, no 35º até 180º DAI, o percentual dos linfócitos T CD8$^+$ decaem em relação ao 28º DAI. Todavia, essa redução não é suficiente para voltar aos níveis basais (Figura 8B).

Figura 8: Imunofenotipagem de células do sangue periférico de camundongos *Swiss* infectados com *Trypanosma cruzi* por via intraperitoneal (VIP) ou por via oral (VO) nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 180 após a infecção. A) Porcentagem de linfócitos T CD4$^+$. B) Porcentagem de linfócitos TCD8$^+$. Linhas tracejadas indicam a média do número de células do grupo não infectado. * indica diferenças significativas ($p<0.05$) entre o grupo não infectado e os grupos VIP ou VO. Os dados são apresentados como média ± erro padrão de oito camundongos de cada grupo em cada tempo após infecção. Diferenças significativas ($p<0.05$) são ilustradas pelas letras ‘‘a’’, ‘‘b’’, ‘‘c’’, ‘‘d’’, ‘‘e’’ e “f” para comparações com os dias 14 , 21, 28, 35, 42 e 180, respectivamente. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos, com 4 animais em cada grupo. Os dados plotados representam a média de 8 animais por grupo em cada tempo após infecção.



Observando a figura 9, constata-se que nos animais do grupo VIP há uma redução do percentual de linfócitos B no 28º DAI em relação ao número médio dessas células dos camundongos não infectados, sendo que esta redução é vista novamente apenas no 42º DAI. Já no grupo VO, esse decaimento é mais precoce, ocorrendo no 21º DAI, o qual persiste até o 28º DAI, retornando aos níveis basais a partir do 35º DAI.

Figura 9: Imunofenotipagem de células do sangue periférico de camundongos *Swiss* infectados com *Trypanosma cruzi* por via intraperitoneal (VIP) ou por via oral (VO) nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 180 após a infecção. Porcentagem de Linfócitos B (CD 19^+). Linhas tracejadas indicam a média do número de células do grupo não infectado. * indica diferenças significativas ($p<0.05$) entre o grupo não infectado e os grupos VIP ou VO. Os dados são apresentados como média ± erro padrão de oito camundondos de cada grupo em cada tempo de infecção. Diferenças significativas ($p<0.05$) são ilustradas pelas letras ‘‘a’’, ‘‘b’’, ‘‘c’’, ‘‘d’’, ‘‘e’’ e “f” para comparações com o dia 14 , 21, 28, 35, 42 e 180, respectivamente. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos, com 4 animais em cada grupo. Os dados plotados representam a média de 8 animais por grupo em cada tempo após infecção.



4.4 Parasitismo tecidual

Com o objetivo de quantificar o parasitismo tecidual, foi realizada a técnica de qPCR em fragmentos do estômago, duodeno e cólon dos animais pertencentes grupos infectados ao longo das fases aguda e crônica.

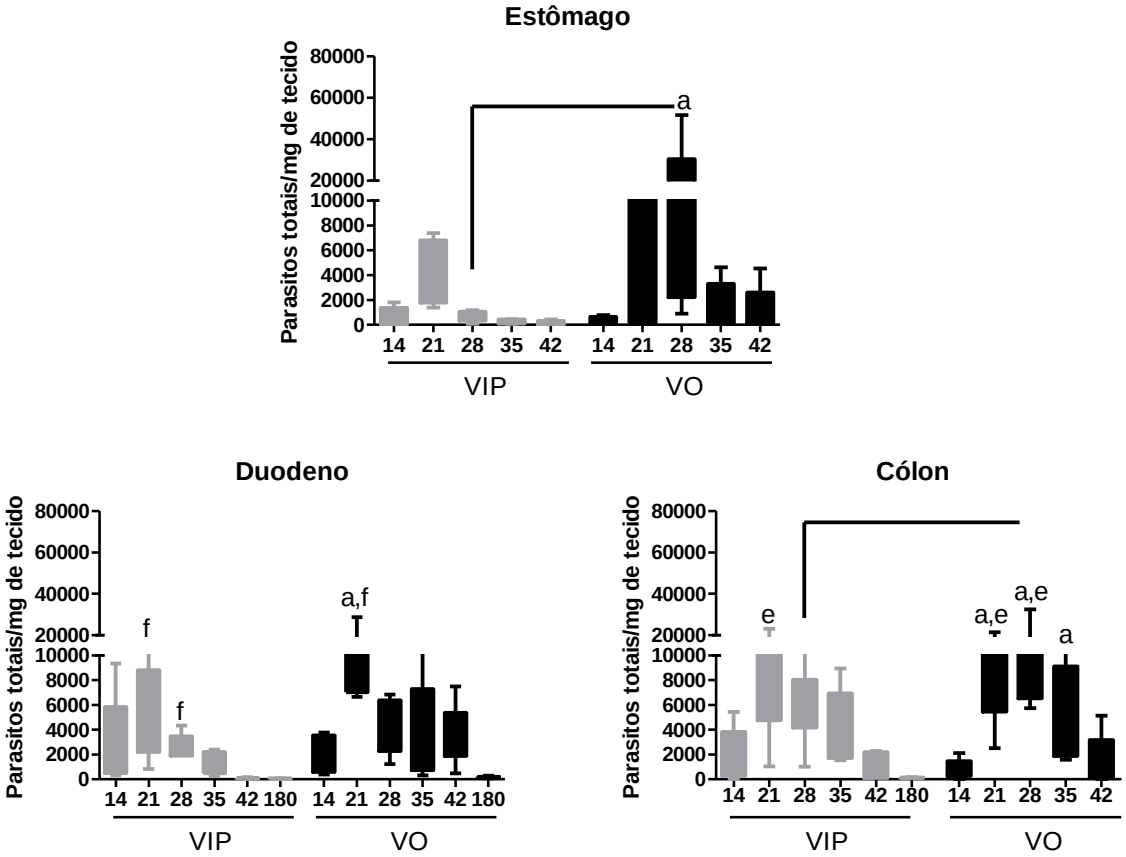
Na Figura 10 estão representados os resultados de parasitismo tecidual. Nos animais do grupo VIP não houve parasitismo tecidual no estômago, enquanto que nos animais do grupo VO esse aumento significativo foi observado apenas no 28° DAI. Além disso, quando

realizada a comparação entre os grupos infectados, os animais infectados por via oral apresentaram um maior parasitismo tecidual no 28° DAI em relação aos animais do grupo VIP.

No Duodeno, foi observado um aumento significativo no parasitismo tecidual nos dias 21 e 28 após a infecção em relação ao dia 180 nos animais infectados por via intraperitoneal. Já para os animais do grupo VO, esse aumento significativo é observado apenas no 21° DAI quando comparado aos dias 14 e 180.

Em relação ao cólon, há um aumento no parasitismo tecidual apenas no 21° DAI no grupo VIP, enquanto que nos animais do grupo VO esse aumento é observado nos dias 21, 28 e 35 após a infecção em relação ao 14° DAI. Além disso, assim como observado no estômago, quando realizada a comparação entre os grupos infectados, os animais infectados por Via oral apresentaram um maior parasitismo tecidual no 28° DAI em relação aos animais do grupo VIP.

Figura 10: Quantificação do parasitismo tecidual no estômago, duodeno e cólon de camundongos *Swiss* eutanásia dos nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 180 após a infecção experimental por via oral (VO) ou intraperitoneal (VIP) com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*.. As linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos VIP e VO. Os dados plotados são apresentados como média ± erro padrão de 8 camundongos de cada grupo em cada tempo de infecção. Diferenças significativas ($p<0.05$) são ilustradas pelas letras ‘‘a’’, ‘‘b’’, ‘‘c’’, ‘‘d’’, ‘‘e’’ e “f” para comparações com os dias 14, 21, 28, 35, 42 e 180, respectivamente.



4.5 Análises histopatológicas

4.5.1 Quantificação do processo inflamatório

Com o objetivo de investigar as lesões causadas pela infecção, foi quantificada a inflamação presente no estômago, duodeno e cólon dos animais pertencentes aos três grupos experimentais ao longo do tempo nas fases aguda e crônica.

Na figura 11A, encontram-se os valores em relação ao infiltrado inflamatório presente no estômago. Nos animais do grupo VIP, não foi encontrado infiltrado inflamatório ao longo da infecção. Enquanto que no grupo VO há um aumento do processo inflamatório no 28º DAI quando comparado com o grupo controle não infectado. Já no duodeno, apenas nos animais do grupo VO é observado um aumento no infiltrado inflamatório no 28º DAI o qual restabelece seus valores basais a partir do 35º DAI permanecendo até a fase crônica (Figura 11B). No cólon, não se observa diferenças significativas entre o número de células inflamatórias infiltradas ao longo da infecção nos animais do grupo VO, enquanto que naqueles infectados intraperitonealmente nota-se que há um aumento da inflamação no 21º e 42º DAI em relação ao 14º DAI e ao grupo controle não infectado (Figura 11C). Além disso, houve uma redução do processo inflamatório no duodeno dos camundongos infectados pela via oral na fase crônica quando comparados com o mesmo órgão dos animais do grupo VIP no mesmo dia pós-infecção. Não foram observadas diferenças significativas entre as duas vias de infecção no estômago e no cólon (Figura 11). As fotomicrografias dos cortes histológicos de fragmentos do estômago, duodeno e cólon estão demonstradas na figura 12. Pode-se observar um processo inflamatório moderado tanto no estômago quanto no duodeno no 28º DAI no grupo VO (Figuras 12B e 12D). No cólon observa-se um processo inflamatório nos dias 21 e 42 após a infecção pela via intraperitoneal (Figuras 12F e 12G).

Figura 11: Avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório no estômago, duodeno e cólon de camundongos *Swiss* eutanásia dos nos dias 14, 21, 28, 35, 42 e 180 após a infecção experimental com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Análise morfométrica do processo inflamatório no: A) Estômago. B) Duodeno. C) Cólon. Linhas tracejadas indicam a média dos valores de área de colágeno ocupado do grupo não infectado. * indica diferenças significativas ($p<0.05$) entre o grupo não infectado e os grupos VIP ou VO. As linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos VIP e VO. Os dados plotados são apresentados como média ± erro padrão de 4 camundongos de cada grupo em cada tempo de infecção. Diferenças significativas ($p<0.05$) são ilustradas pelas letras ‘‘a’’, ‘‘b’’, ‘‘c’’, ‘‘d’’, ‘‘e’’ e “f” para comparações com odia 14, 21, 28, 35, 42 e 180, respectivamente.

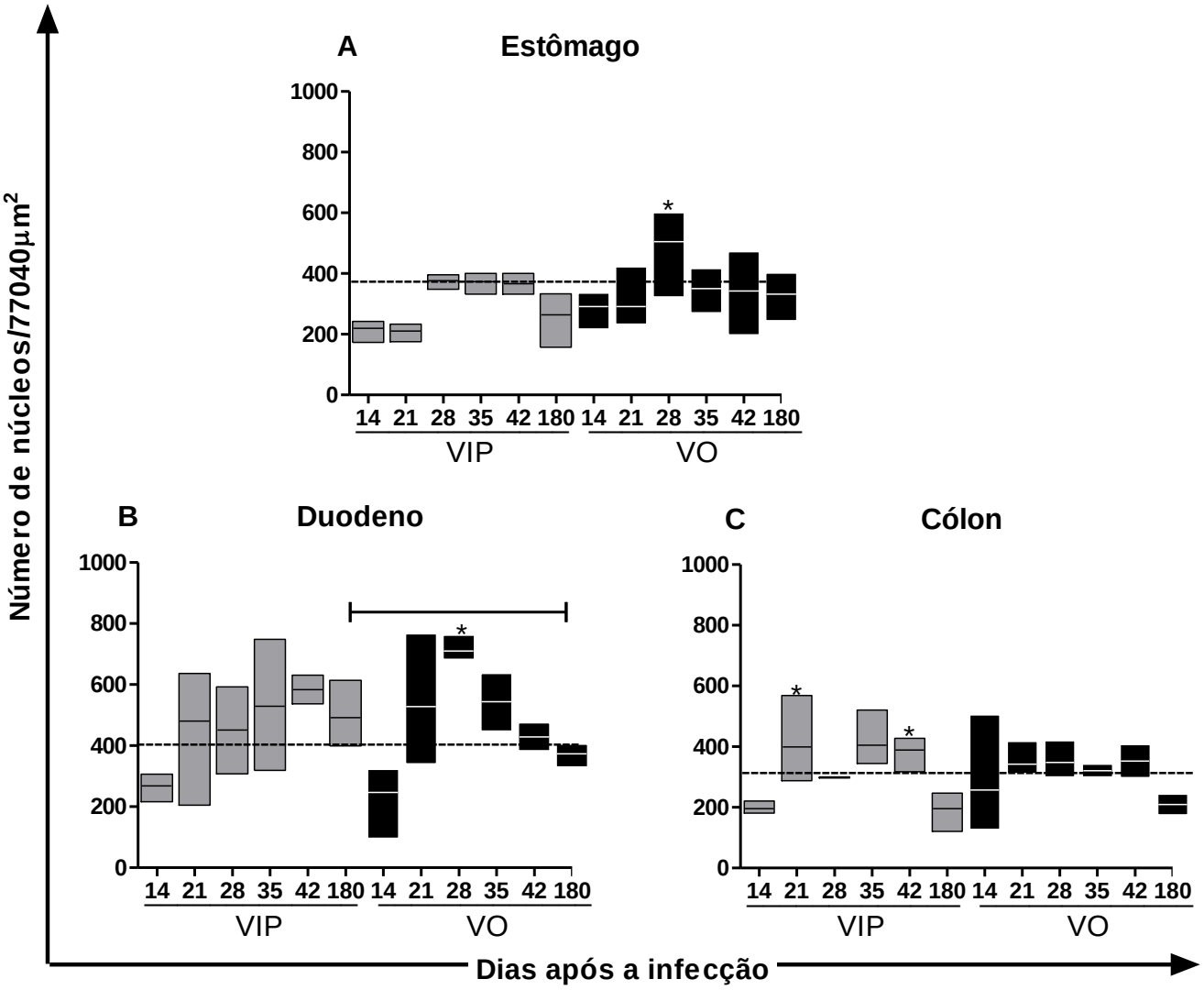
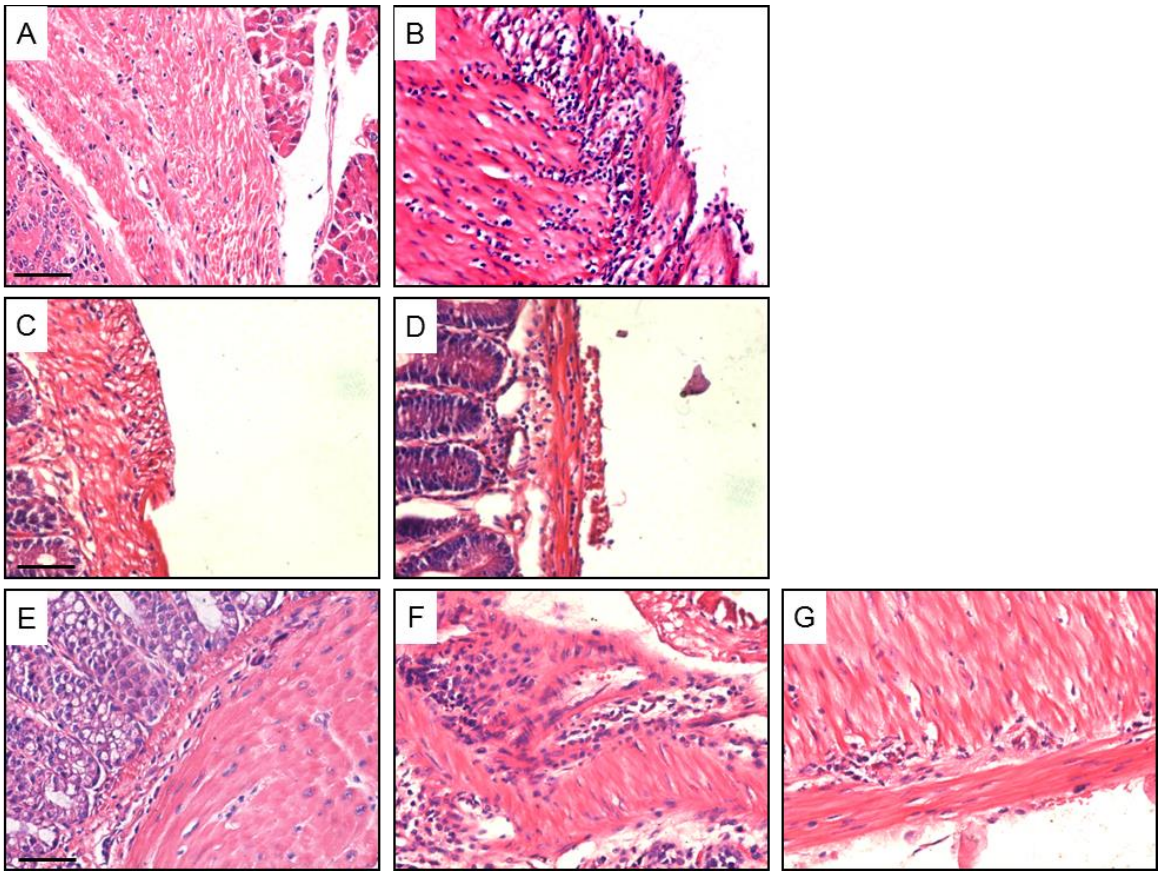


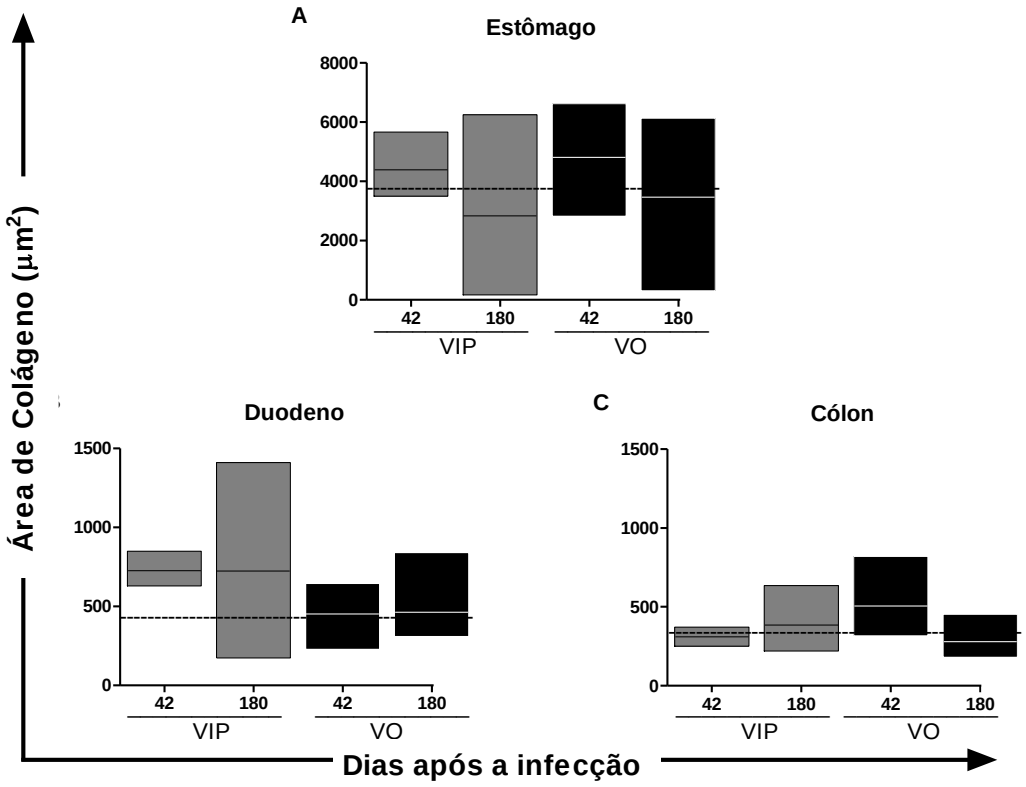
Figura 12: Fotomicrografias do estômago, duodeno e cólon de camundongos *Swiss* após a infecção oral experimental com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. (A) Padrão histológico normal do estômago em animais não infectados e em (B) processo inflamatório moderado observado no 28° DAI nos animais do grupo VO. Em (C) e (D) fotomicrografias do duodeno, sendo em (C) padrão histológico normal dos animais não infectados e em (D) processo inflamatório moderado observado no 28° DAI nos animais do grupo VO. As imagens (E), (F) e (G) representam fotomicrografias do cólon, sendo em (E) padrão histológico normal e em (F) e (G) processo inflamatório observado nos dias 21 e 42 nos animais do grupo VIP. Hematoxilina-Eosina, Barra= 50μm.



4.5.2 Quantificação da neoformação de colágeno

Foi analisada a progressão ou reparo da lesão quando se propôs a avaliação da neoformação de colágeno nos tempos 42 e 180 após a infecção. No estômago, duodeno e cólon não foram observadas alterações da área ocupada pelo colágeno em relação aos valores encontrados nos mesmos órgãos dos animais não infectados e entre os dias de eutanásia pós-infecção. Os resultados também não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos VIP e VO (Figura 13).

Figura 13: Avaliação quantitativa da área de colágeno ocupada no estômago, duodeno e cólon de camundongos *Swiss* eutanásia dos nos dias 42 e 180 após a infecção experimental com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Análise morfométrica da neoformação de colágeno no A) Estômago. B) Duodeno. C) Cólon. Linhas tracejadas indicam a média dos valores de área de colágeno ocupado do grupo não infectado. * indica diferenças significativas ($p<0.05$) entre o grupo não infectado e os grupos VIP ou VO. As linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos VIP e VO. Os dados plotados são apresentados como média ± erro padrão de 4 camundongos de cada grupo em cada tempo de infecção. Diferenças significativas ($p<0.05$) são ilustradas pelas letras ‘‘a’’ e ‘‘b’’ para comparações com o dia 42 e dia 180, respectivamente.



5. Discussão

O presente trabalho teve como objetivo compreender melhor as alterações no perfil parasitológico e imunopatológico provocadas pela infecção oral experimental em camundongos. A mortalidade entre os indivíduos acometidos pela doença de Chagas após a infecção oral é estimada entre 8-35%, maior que a mortalidade entre os pacientes infectados pela clássica via vetorial (5-10%), ainda na fase aguda. Além disso, biopsias do coração de pacientes chagásicos após terem ido ao óbito no inicio da infecção por via oral revelaram uma intensa miocardite. No ano de 2015, quatro municípios do Rio Grande do Norte relataram surto da doença onde foram investigados 21 casos suspeitos, sendo confirmados 14 casos e, em todas as ocorrências confirmadas, foi declarada a ingestão de caldo de cana (SESAP/RN, 2015). Além disso, em Março de 2016 a Secretaria de Estado de Saúde do Acre (Sesacre) relatou 4 casos de contaminação após o consumo de açaí, sendo que duas pessoas evoluíram para o óbito em um período de 30 dias. Diante disso, esse estudo é justificado devido a maior mortalidade e intensidade das lesões observadas em pacientes infectados após o consumo de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*, e, além disso, a infecção oral se tornou a principal responsável pelos atuais surtos de casos agudos da doença de Chagas.

Visto que poucos estudos na literatura abordam essa via e há uma falta de consenso entre os pesquisadores sobre a melhor forma de se realizar a infecção oral de maneira experimental, foi feito um estudo piloto a fim de encontrar o modo mais adequado de infectar os camundongos por via oral e se obter uma alta taxa de infectividade. Os animais foram, então, inoculados com $1x10^5$ formas tripomastigotas metacíclicas (mesmo inóculo do experimento) por gavagem completa, modo convencional, o qual consiste em levar um tubo flexível (ou agulha de gavagem), curvado com a ponta arredondada, até o estômago, passando cuidadosamente pelo esôfago. Em outro grupo de animais, a infecção foi feita por gavagem incompleta, que é a introdução da agulha apenas na parte inicial da cavidade orofaríngea. Por fim, foi realizado o procedimento de pipetagem diretamente na boca de outros camundongos. Além disso, também foram comparadas as três maneiras de realizar a infecção utilizando PBS ou RPMI como soluções de ressuspensão do *pellet* contendo os parasitos. Como resultado desse estudo piloto, o inóculo feito por gavagem incompleta e ressuspendido em RPMI foi o escolhido para realizar nossos experimentos uma vez que apresentou a maior taxa de infectividade entre os animais. A pipetagem, por ser um procedimento demorado e difícil de ser aceito pelos camundongos, há muita perda de inóculo fazendo que com o número de parasitos não seja o mesmo em todos os animais e, dessa forma, torna-se inviável o controle do inóculo.

Na tentativa de simular a infecção em humanos após a ingestão de alimentos contaminados com o *T. cruzi*, foi escolhido para nosso experimento o RPMI para infectar oralmente os camundongos com o objetivo de deixar o meio glicosado. Já que os alimentos mais comuns como açaí ou caldo de cana de açúcar são ricos em carboidratos simples como a glicose. Além disso, a infecção oral em humanos é caracterizada pela deglutição de um elevado número de parasitos. Por isso, o inóculo utilizado em nosso experimento para ambas as vias foi alto, de $1x10^5$ formas tripomastigotas metacílicas.

A taxa de infectividade observada no estudo piloto foi mantida ao longo da execução dessa dissertação, visto que a infectividade dos animais do grupo VO, tanto na unicata quanto duplicata, foi alta atingindo 95% dos animais. Dias et al. (2013) infectaram camundongos *Swiss* oralmente por gavagem completa em RPMI com formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas do *T. cruzi* e, independente do estágio evolutivo do parasito, foi observada baixa ou nenhuma taxa de infectividade nos animais. Provavelmente, isso deve ao fato de que na gavagem completa o parasito chega diretamente no estômago, fazendo com que sua primeira interação com hospedeiro vertebrado seja com o suco gástrico. Na gavagem incompleta o contato com o ácido clorídrico ocorre mais tardiamente e o parasito tem primeiro uma interação com a mucosa orofaríngea, o que pode permitir que a infecção se estabeleça mais facilmente, já que os parasitos não são eliminados pelo suco gástrico, como ocorreria na gavagem completa.

Com relação ao perfil parasitológico, nesse estudo observou-se que os animais do grupo VO apresentaram pico de parasitemia um pouco maior que daqueles do grupo VIP, embora essa diferença não tenha sido significativa. Além disso, o período patente de infecção foi distinto entre os grupos, apresentando-se maior no grupo VIP, o que sugere que o perfil da curva de parasitemia é dependente da via de inoculação. Dias *et. al.*, (2013) mostraram também que camundongos infectados por via oral, por gavagem completa, apresentaram parasitemia mais baixa quando comparados com aqueles infectados pela via intraperitoneal, independente do tamanho do inóculo. Esse resultado se deve, provavelmente, pela maneira com que esses pesquisadores realizaram a infecção oral, pois a gavagem diretamente no estômago parece influenciar no número de parasitos viáveis e, consequentemente, nos níveis parasitêmicos e na taxa de infectividade, como já mencionado no parágrafo acima. Nesse sentido, pode-se propor que a via de transmissão é um fator relevante a ser considerado no curso da infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, o local inicial da entrada do parasita interfere diretamente na resposta imune do hospedeiro. Os camundongos inoculados diretamente na

cavidade oral apresentaram maior susceptibilidade à infecção do que os camundongos inoculados de forma intragástrica(Barreto-De-Albuquerque et al., 2015).

Embora os camundongos dos grupos VIP e VO tenham recebido o mesmo inóculo de $1x10^5$ tripomastigotas metacíclicas, a taxa de mortalidade entre os animais do grupo VO foi alta, atingindo mais da metade dos camundongos, sendo maior que no grupo VIP. Um estudo feito em camundongos Balb/c infectados por via oral com 4×10^5 formas do isolado SC de *T. cruzi* também apresentou uma alta taxa de mortalidade, sendo que, após 20 dias de infecção, mais de 50% dos animais haviam morrido (Covarrubias et al., 2007). Nesse experimento, foi utilizado um inóculo mais baixo em relação ao inóculo empregado por aqueles pesquisadores e, mesmo assim, foi obtida uma alta taxa de mortalidade, demonstrando, dessa forma, a gravidade da infecção pela via oral. Esses dados sugerem que a porta de entrada do parasito, neste caso, o trato digestório superior, parece influenciar no comportamento do *T. cruzi* no organismo do hospedeiro vertebrado, aumentando, provavelmente, sua replicação e seus níveis parasitêmicos, pois a interação parasito-hospedeiro que ocorre na mucosa orofaríngia parece facilitar a entrada do parasito. Como não foram observadas diferenças significativas entre as curvas de parasitemia, pode-se inferir que os parasitos migraram para tecidos-alvo o que poderia estar provocando alterações irreversíveis que culminaram em morte dos animais. De Lana et al. (1988) infectaram cães com a cepa Be-78 pelas vias intraperitoneal, subcutânea, conjuntiva e endovenosa e, independente da via de inoculação, não houve mortalidade dos animais estudados. No presente trabalho, entretanto, a infecção com a Be-78 pela via oral foi capaz de eliminar mais de 50% dos animais. Além disso, acreditava-se que a alta mortalidade de humanos após ingerirem alimentos contaminados com o *T. cruzi* estava relacionada ao alto número de parasitos ingeridos. Entretanto, no presente trabalho, foi utilizado o mesmo tamanho de inóculo para a infecção intraperitoneal e oral e, mesmo assim, a VO levou ao óbito um elevado número de animais, maior que na VIP. Portanto, este resultado reforça nossos dados sobre a gravidade da VO e que a mesma desencadeia um perfil parasitológico diferente das outras vias de infecção.

A resposta imune frente à infecção pelo *T. cruzi* é bastante estudada por diversos pesquisadores, destacando sua importância na contribuição para a evolução da doença (Alcantara e Brener, 1978; Hatcher e Kuhn, 1982; Gomes et al., 2003; De Barros-Mazon et al., 2004), uma vez que sua ativação pode ser responsável tanto pelo controle do parasito quanto pela reação inflamatória desencadeada pelo hospedeiro vertebrado (Brener e Gazzinelli, 1997; Teixeira et al., 2002). O conhecimento de uma resposta desencadeada pelo

hospedeiro torna-se importante para a compreensão de mecanismos envolvidos no estabelecimento de lesões. Além disso, o tipo de resposta imune induzida parece ser crítico para a manutenção de um equilíbrio entre parasito e hospedeiro. Estudos apontam que mecanismos imunomoduladores são importantes para o controle da infecção e, consequentemente, podem influenciar no bom ou mau prognóstico da doença (Dias, F. C. et al., 2013; Dutra et al., 2014).

Dessa maneira, no presente estudo, para avaliar a resposta imune, foi realizada a imunofenotipagem das principais populações celulares presentes no sangue periférico com o objetivo de acompanhar a evolução da doença ao longo do tempo.

Nesses achados não houve alterações no percentual de monócitos no sangue periférico dos camundongos do grupo VIP, enquanto que no grupo VO observou-se um aumento dos seus valores no início da infecção, apresentando uma redução ao longo do tempo. Uma das primeiras células a serem ativadas na resposta imune são os monócitos cuja principal via de ação é se transformar em macrófagos ao migrarem para os tecidos. Estes, por sua vez, possuem funções como fagocitose de corpos estranhos que invadem o organismo e produção da citocina TGF-β a qual induz formação de fibrose. Diante desses dados, pode-se sugerir que a ativação da resposta mediada por monócitos foi mais exacerbada nos animais do grupo VO, uma vez que seus valores aumentaram substancialmente ainda no início da infecção. Sugere-se que o trato digestório influencie na ativação de monócitos já que é uma região rica em células dendríticas e em macrófagos que poderiam favorecer o ambiente de quimio-atração para aquelas células.

Em relação aos linfócitos T $CD4^+$, houve uma redução do seu percentual em ambos os grupos analisados sendo, porém, mais precoce no grupo VO. Além disso, no grupo VIP os valores dessas células retornaram aos níveis basais ainda na fase aguda, enquanto que no grupo VO esse retorno é observado apenas na fase crônica. A redução do número de linfócitos T $CD4^+$ no sangue periférico parece estar relacionada com a elevação do parasitismo tecidual uma vez que no presente trabalho foi observado aumento do parasitismo no estômago, duodeno e cólon, provavelmente na tentativa de controlar esse parasitismo. Além disso, a deficiência desses linfócitos leva a uma diminuição da resposta imunológica global do hospedeiro uma vez que essas células promovem a ativação de macrófagos, linfócitos B e T $CD8^+$ (Rottenberg et al., 1995; Goncalves Da Costa et al., 2002). Estudos demonstraram que durante a infecção pelo *T. cruzi* há um aumento da taxa de apoptose de linfócitos T $CD4^+$ (Lopes et al., 1999). Outros pesquisadores mostraram que o *T. cruzi* parece

ativar preferencialmente a resposta Th2 como mecanismo de escape o que provavelmente leva a um desequilíbrio das subpopulações das células T $CD4^+$ (Cunha-Neto e Kalil, 1995). Entretanto, essa redução nos infere que os linfócitos possam ter migrado do sangue periférico para os tecidos. Da Silvera e colaboradores (2007) mostraram que pacientes chagásicos com ou sem megacólon apresentaram um aumento de linfócitos T $CD3^+$ nos plexos submucoso e mioentérico e também na camada muscular do cólon. Esses dados corroboram com os achados deste trabalho, já que houve um aumento do infiltrado inflamatório no 28º DAI no estômago e no duodeno.

Quanto aos linfócitos T $CD8^+$ este trabalho mostrou um aumento do seu percentual no 21º DAI em ambas as vias de infecção permanecendo elevado ao longo do tempo. Sabe-se que as células T $CD8^+$ desempenham atividades efetoras que eliminam patógenos intracelulares, por isso são chamados de citotóxicos (revisado por Shresta et al.,1998). Sabe-se também que os linfócitos T $CD8^+$ são as principais células responsáveis pelo controle do *T. cruzi*. Além disso, diversos estudos revelaram que essas células são induzidas após infecção pelo parasito (Sato et al., 1992; Rottenberg et al., 1993; Sun e Tarleton, 1993). A montagem de uma resposta imune relativamente eficaz é essencial para que os parasitos no sangue não sejam detectáveis. Diante disso, podemos sugerir que os linfócitos aumentaram no sangue periférico na tentativa de controlar o parasitismo tecidual. Essas células podem ter migrado para os tecidos-alvo, já que no TGI o parasitismo foi controlado nos tempos mais tardios da infecção. De fato, já foi demonstrado que os linfócitos T $CD8^+$ são ativados para exercer um papel protetor contra a infecção (Reis et al., 1997). Miyahira et al. (1999) também mostraram que camundongos infectados pelo *T. cruzi* e imunizados com influenza recombinante e vacina de vírus expressando o epítopo SYVPSAEQI de células T $CD8^+$ induziram um aumento substancial de células T $CD8^+$ específicas as quais foram capazes de suprimir fortemente a presença de parasitos. Além disso, Higuchi et al. (1997) observaram que as células T $CD8^+$ foram presentes em maior número no coração de pacientes chagásicos crônicos. Portanto, a via de inóculo parece não interferir nos níveis de linfócitos T $CD8^+$ no sangue periférico, uma vez que seu percentual aumentou no início da infecção e se manteve elevado até a fase crônica, em ambas as vias de infecção analisadas neste trabalho. O que corrobora com o já observado por Collins et al. (2011) que demonstraram que a infecção por essa via não altera a capacidade do *T. cruzi* de estabelecer uma resposta imune celular mediada por linfócitos T $CD8^+$.

Anticorpos específicos possuem papel fundamental da defesa contra o *T. cruzi*, desempenhando atividade efetora contra formas sanguíneas ou teciduais (Alcantara e Brener, 1978). Estudos abordando linfócitos B mostraram que há um aumento de seus valores no sangue periférico de pacientes chagásicos em fase crônica recente (Sathler-Avelar et al., 2003). Outras evidências experimentais utilizando camundongos infectados pelo *T. cruzi* apresentaram ativação de Linfócitos B durante a fase aguda da infecção (Minoprio, Itohara, et al., 1989). Somado a isso, Cardillo et al. (2007), observaram que camundongos nocautes para células B demonstraram redução da quantidade de citocinas inflamatórias e de linfócitos T $CD8^+$ ativados no infiltrado inflamatório cardíaco. Entretanto, os dados do presente trabalho mostraram uma redução dos níveis de linfócitos B no sangue periférico dos camundongos em ambos os grupos, ocorrendo a partir do 28º e 21º DAI grupo VIP e VO, respectivamente. Esses achados sugerem que essas células possam ter migrado para algum tecido já no início da infecção na tentativa de combater o parasitismo tecidual uma vez que houve redução da parasitemia a partir do 24º DAI e aumento do parasitismo no estômago e duodeno. Grisotto et al. (2001) demonstraram aumento da celularidade no baço traduzido pelo aumento das células $CD4^+$ e $CD8^+$ e das células B de camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Além disso, uma ativação policlonal de linfócitos B é caracterizada por uma resposta não específica sendo acompanhada de imunossupressão das respostas humorais, o que pode estar relacionado ao estabelecimento de processos patológicos na DCh (Reed et al., 1983; Minoprio, Andrade, et al., 1989; Spinella et al., 1992).

A doença de Chagas é bem reconhecida por apresentar duas fases clínicas sucessivas, as fases aguda e crônica. A primeira é caracterizada por altos níveis de parasitemia e geralmente desencadeia um intenso processo inflamatório. Não havendo tratamento e/ou cura da doença, o indivíduo evolui para a fase crônica. Esta é representada pelo controle do parasitismo sanguíneo e tecidual e, consequentemente, há uma tendência em reduzir a resposta inflamatória. Entretanto, se esta resposta não for controlada de maneira suficiente, a reação inflamatória pode desencadear as alterações graves da DCh características da forma determinada da fase crônica, na qual as manifestações clínicas mais comuns envolvem o coração e o trato digestório, caracterizando as formas cardíaca ou digestiva, respectivamente, ou ainda as duas formas associadas (Tafuri et al., 1971). Embora o mecanismo de como as lesões no trato gastrointestinal não esteja totalmente elucidado, o infiltrado inflamatório ao redor dos plexos mio-entéricos e células gliais parece desempenhar um papel relevante na destruição desses componentes do SNE e, consequentemente, levando a alterações

morfofuncionais desses órgãos (Andrade e Andrade, 1980; Nogueira-Paiva et al., 2014). O envolvimento do TGI na DCh humana é caracterizado por distúrbios da motilidade principalmente relacionados à lesão no SNE. Essas alterações podem ser constituídas por degenerações neuronais, denervação e modificações nos componentes enterogliais.

Neste trabalho foram analisados o infiltrado inflamatório e a neoformação de colágeno a fim de investigar possíveis alterações nos órgãos estudados.

Tanto o estômago quanto o duodeno mostraram um aumento do processo inflamatório no 28º DAI nos animais do grupo VO. Esses dois órgãos apresentaram perfis semelhantes nesta via de infecção enquanto que o cólon mostrou um perfil singular provavelmente pela proximidade entre os dois primeiros órgãos. O processo inflamatório no cólon foi observado apenas nos animais do grupo infectado intraperitonealmente.

O parasitismo encontrado no estômago dos animais do grupo VIP no 21º DAI parece não ter sido capaz de desencadear um processo inflamatório, uma vez que não foi observada inflamação no estômago dos camundongos infectados por essa via. Provavelmente os ninhos de amastigotas presentes nesse órgão não se romperam, não desencadeando assim, reconhecimento pelo sistema imune e consequentemente não se estabeleceu um processo inflamatório. Nesse mesmo órgão, no grupo VO, o infiltrado inflamatório foi suficiente para controlar o parasitismo, já que no 35º DAI ele já se encontrava reduzido. No duodeno, não foi observada inflamação nos animais do grupo VIP. Esse achado parece explicar o fato de a carga parasitária neste órgão dos camundongos infectados por essa via ter se mantida elevada por mais tempo em comparação com a carga no duodeno no grupo VO, pois sem uma resposta inflamatória não houve controle imediato do parasitismo tecidual. Em relação ao cólon, foi observado processo inflamatório apenas nos animais do grupo VIP, sendo que ele foi capaz de controlar o parasitismo tecidual neste órgão. Por outro lado, no cólon dos animais do grupo VO a carga parasitária se manteve elevada nos dias 21, 28 e 35º DAI. Este dado pode estar relacionado ao fato de que não foi encontrada inflamação nesse órgão dos animais infectados por essa via, dificultando, portanto, o controle do parasitismo.

Além disso, no duodeno observou-se que o processo inflamatório na fase crônica foi maior nos camundongos do grupo VIP em comparação com o grupo VO, sugerindo que na via oral de infecção a manutenção tanto do parasistismo tecidual quanto do processo inflamatório parece ocorrer apenas em outros órgãos – alvos. Corroborando com essa hipótese, Kuehn et al. (2014) demonstraram que ambas as vias de infecção apresentaram a capacidade de promover danos cardíacos, com presença de infiltrado inflamatório. Além

disso, Vieira et al. (2012) demonstraram que ao infectar camundongos com a cepa Be-78 é observado um intenso processo inflamatório cardíaco com características exsudativas. Esses dados nos indicam que a cepa Be-78 tem tropismo pelo coração e é capaz de provocar graves alterações neste órgão. Poderia se inferir também que a via oral de infecção desencadeie uma miocardite mais intensa que poderia ser a causa da alta mortalidade observada no presente estudo. Para se elucidar essa hipótese lesões no coração dos camundongos infectados por VO estão sendo analisadas em nosso laboratório, com a finalidade de investigar em qual órgão o processo inflamatório foi mais intenso sendo capaz de provocar a morte dos animais estudados, visto que todos os órgãos do TGI avaliados nesse trabalho não apresentaram processo inflamatório intenso que justificasse a alta mortalidade.

Uma das formas de reparo do processo inflamatório é a formação da cicatrização, constituída de desenvolvimento de tecido conjuntivo fibroso, que é avaliado por meio da quantificação da neoformação de colágeno.

Neste trabalho, este processo foi analisado nos dias 42º e 180º DAI, já que a produção de colágeno ocorre geralmente após o aparecimento do infiltrado inflamatório. No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas quanto à área de colágeno formada nos três órgãos avaliados entre os grupos e ao longo do tempo. Nos três órgãos analisados, o parasitismo tecidual foi controlado ao logo do tempo. Apresentando-se muito baixo no duodeno ou totalmente reduzido no cólon no grupo VO e no estômago em ambas a vias de infecção. Esses dados sugerem, portanto, que o parasitismo tecidual não foi capaz de desencadear um infiltrado inflamatório suficiente para provocar uma destruição tecidual intensa a ponto de inicar um processo de cicatrização com neoformação de colágeno.

Os dados aqui apresentados mostram que a via de inoculação do *T. cruzi* é capaz de influenciar no curso da infecção, demonstrando perfis distintos do comportamento do parasito frente a diferentes formas de entrada no organismo do hospedeiro vertebrado. Diante disso, destaca-se a importância de mais estudos relacionados à via oral, uma vez que pouco se sabe sobre as alterações provocadas por esta via. Além disso, espera-se que este trabalho contribua para futuras pesquisas abordando a infecção oral, bem como, o envolvimento do trato gastrointestinal na DCh.

6. Conclusão

O conjunto de dados obtidos neste trabalho cujo objetivo foi a avaliação da resposta imune e de alterações no TGI após infecção oral pelo *T. cruzi* demonstrou que a infecção oral é capaz de desencadear um distinto perfil parasitológico, patológico e de resposta imune em comparação com a via intraperitoneal, sugerindo que a via de inoculação interfere no comportamento do parasito. Além disso, o presente estudo revelou que a via de infecção oral apresenta um maior parasitismo tecidual nos órgãos do trato gastrointestinal avaliados durante a fase aguda. Esses dados, portanto, reforçam a maior gravidade da doença frente à via oral de infecção.

7. Referências bibliográficas

ADAD, S. J.; CANCADO, C. G.; ETCHEBEHERE, R. M.; TEIXEIRA, V. P.; GOMES, U. A.; CHAPADEIRO, E.; LOPES, E. R. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. **Virchows Arch,** v. 438, n. 3, p. 254-8, Mar 2001. ISSN 0945-6317 (Print)0945-6317 (Linking).

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. The in vitro interaction of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta Trop,** v. 35, n. 3, p. 209-19, Sep 1978. ISSN 0001-706X (Print)0001-706X (Linking).

ANDERSSON, J.; ORN, A.; SUNNEMARK, D. Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. **Immunol Lett,** v. 86, n. 2, p. 207-12, Apr 03 2003. ISSN 0165-2478 (Print)0165-2478 (Linking).

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. A patologia da doença de Chagas experimental no cão. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 75, p. 77-95, 1980. ISSN 0074-0276.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M.; WENTHOLD, R. J., JR.; HILBERT, S. L.; FERRANS, V. J. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. **Am J Trop Med Hyg,** v. 57, n. 3, p. 328-36, Sep 1997. ISSN 0002-9637 (Print)0002-9637 (Linking).

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J.; SILVA-DOS-SANTOS, D.; PEREZ, A. R.; BERBERT, L. R.; DE SANTANA-VAN-VLIET, E.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A.; MOREIRA, O. C.; ROGGERO, E.; DE CARVALHO-PINTO, C. E.; JURBERG, J.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; BOTTASSO, O.; SAVINO, W.; DE MEIS, J. Trypanosoma cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? **PLoS Negl Trop Dis,** v. 9, n. 6, p. e0003849, Jun 2015. ISSN 1935-2735 (Electronic)1935-2727 (Linking).

BRENER, Z. (Comparative Studies of Different Strains of Trypanosoma Cruzi.). **Ann Trop Med Parasitol,** v. 59, p. 19-26, Mar 1965. ISSN 0003-4983 (Print)0003-4983 (Linking).

BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of Trypanosoma cruzi in the blood-stream of normal and immune mice. **Ann Trop Med Parasitol,** v. 63, n. 2, p. 215-20, Jun 1969. ISSN 0003-4983 (Print)0003-4983 (Linking).

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol,** v. 114, n. 2, p. 103-10, Oct 1997. ISSN 1018-2438 (Print)1018-2438 (Linking).

CAMARGOS, E.; FRANCO, D. J.; GARCIA, C.; DUTRA, A. P.; TEIXEIRA, A. L.; CHIARI, E.; MACHADO, C. Infection with different Trypanosoma cruzi populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. **The American journal of tropical medicine and hygiene,** v. 62, n. 5, p. 604-612, 2000. ISSN 0002-9637.

CAMPBELL, D. A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. **Curr Mol Med,** v. 4, n. 6, p. 549-62, Sep 2004. ISSN 1566-5240 (Print)1566-5240 (Linking).

CAMPOS, C. F.; CANGUSSU, S. D.; DUZ, A. L.; CARTELLE, C. T.; NOVIELLO MDE, L.; VELOSO, V. M.; BAHIA, M. T.; ALMEIDA-LEITE, C. M.; ARANTES, R. M. Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of Tripanosoma cruzi Infection. **PLoS One,** v. 11, n. 4, p. e0153038, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203 (Linking).

CANÇADO, J. R. Doença de Chagas, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais,Belo Horizonte, MG. 1968.

CARDILLO, F.; POSTOL, E.; NIHEI, J.; AROEIRA, L. S.; NOMIZO, A.; MENGEL, J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. **Immunology,** v. 122, n. 4, p. 584-95, Dec 2007. ISSN 1365-2567 (Electronic)0019-2805 (Linking).

CARNEIRO, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; REIS, A. B.; VELOSO, V. M.; ARAUJO, F. M.; BAHIA, M. T.; DE LANA, M.; MACHADO-COELHO, G. L.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TAFURI, W. L. Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute Trypanosoma cruzi infection in dogs. **Acta Trop,** v. 101, n. 2, p. 120-9, Feb 2007. ISSN 0001-706X (Print)0001-706X (Linking).

CAVALCANTI, L.; ROLIM, D.; NETO, R.; VILAR, D.; NOGUEIRA, J.; POMPEU, M. Microepidemics of acute Chagas disease by oral transmission in Ceará. **Cad Saúde Colet,** v. 17, p. 911-21, 2009.

CHIARE, Z. B. E. variações morfológicas observadas em diferentes amostras de trypanosoma cruzi. **Rev. Med. Trop. São Paulo**, p. 220-224, 1963.

COLLINS, M. H.; CRAFT, J. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. Oral exposure to Trypanosoma cruzi elicits a systemic CD8(+) T cell response and protection against heterotopic challenge. **Infect Immun,** v. 79, n. 8, p. 3397-406, Aug 2011. ISSN 1098-5522 (Electronic)0019-9567 (Linking).

CORBETT, C. E.; RIBEIRO, U., JR.; PRIANTI, M. G.; HABR-GAMA, A.; OKUMURA, M.; GAMA-RODRIGUES, J. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. **Dis Colon Rectum,** v. 44, n. 7, p. 993-8, Jul 2001. ISSN 0012-3706 (Print)0012-3706 (Linking).

CORTEZ, M.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Infection by Trypanosoma cruzi metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infect Immun,** v. 71, n. 11, p. 6184-91, Nov 2003. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

CORTEZ, M.; SILVA, M. R.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; SASSO, G. R.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; YOSHIDA, N. Trypanosoma cruzi surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium

in orally infected mice. **Microbes Infect,** v. 8, n. 1, p. 36-44, Jan 2006. ISSN 1286-4579 (Print)1286-4579 (Linking).

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut,** v. 47 Suppl 4, p. iv15-9; discussion iv26, Dec 2000. ISSN 0017-5749 (Print)0017-5749 (Linking).

COURA, J. R. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 39 Suppl 3, p. 113-7, 2006. ISSN 0037-8682 (Print)0037-8682 (Linking).

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol,** v. 18, n. 4, p. 171-6, Apr 2002. ISSN 1471-4922 (Print)1471-4922 (Linking).

COVARRUBIAS, C.; CORTEZ, M.; FERREIRA, D.; YOSHIDA, N. Interaction with host factors exacerbates Trypanosoma cruzi cell invasion capacity upon oral infection. **Int J Parasitol,** v. 37, n. 14, p. 1609-16, Dec 2007. ISSN 0020-7519 (Print)0020-7519 (Linking).

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' heart disease. **Sao Paulo Med J,** v. 113, n. 2, p. 757-66, Mar-Apr 1995. ISSN 1516-3180 (Print)1516-3180 (Linking).

D'AVILA REIS, D.; LEMOS, E. M.; SILVA, G. C.; ADAD, S. J.; MCCURLEY, T.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MACHADO, C. R. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaoesophagus. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** v. 95, n. 2, p. 177-8, Mar-Apr 2001. ISSN 0035-9203 (Print)0035-9203 (Linking).

DA SILVEIRA, A. B.; ARANTES, R. M.; VAGO, A. R.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; D'AVILA REIS, D. Comparative study of the presence of Trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology,** v. 131, n. Pt 5, p. 627-34, Nov 2005. ISSN 0031-1820 (Print)0031-1820 (Linking).

DA SILVEIRA, A. B.; D'AVILA REIS, D.; DE OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; POOLE, D.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Dig Dis Sci,** v. 52, n. 10, p. 2877-83, Oct 2007. ISSN 0163-2116 (Print)0163-2116 (Linking).

DA SILVEIRA, A. B.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNESS, J. B.; D'AVILA REIS, D. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol,** v. 38, n. 8, p. 1256-64, Aug 2007. ISSN 0046-8177 (Print)0046-8177 (Linking).

DE BARROS-MAZON, S.; GUARIENTO, M. E.; DA SILVA, C. A.; COFFMAN, R. L.; ABRAHAMSOHN, I. A. Differential regulation of lymphoproliferative responses to Trypanosoma cruzi antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clin Immunol,** v. 111, n. 1, p. 137-45, Apr 2004. ISSN 1521-6616 (Print)1521-6616 (Linking).

DE LANA, M.; TAFURI, W. L.; CALIARI, M. V.; BAMBIRRA, E. A.; CHIARI CDE, A.; LEITE, V. H.; BARBOSA, A. J.; TOLEDO, M. J.; CHIARI, E. [Chronic fibrotic cardiac stage of experimental trypanosomiasis cruzi in dogs]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 21, n. 3, p. 113-21, Jul-Sep 1988. ISSN 0037-8682 (Print)0037-8682 (Linking).

DE OLIVEIRA, R. B.; TRONCON, L. E.; DANTAS, R. O.; MENGHELLI, U. G. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am J Gastroenterol,** v. 93, n. 6, p. 884-9, Jun 1998. ISSN 0002-9270 (Print)0002-9270 (Linking).

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol,** v. 2010, 2010. ISSN 1687-8876 (Print)1687-8884 (Electronic).

DIAS; GRUENDLING, A. P.; ARAUJO, S. M.; GOMES, M. L.; TOLEDO, M. J. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of Trypanosoma cruzi I and II. **Exp Parasitol,** v. 135, n. 3, p. 511-7, Nov 2013. ISSN 1090-2449 (Electronic)0014-4894 (Linking).

DIAS, F. C.; MEDINA TDA, S.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DANTAS, R. O.; PISSETTI, C. W.; RODRIGUES JUNIOR, V.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; MARIN-NETO, J. A.; GUTIERREZ, F. R.; MOREAU, P.; SILVA, J. S.; DONADI, E. A. Polymorphic sites at the immunoregulatory CTLA-4 gene are associated with chronic chagas disease and its clinical manifestations. **PLoS One,** v. 8, n. 10, p. e78367, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203 (Linking).

DIAS, J. C. P.; RAMOS JR., A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R.; TORRES, R. M.; MELO, J. R. D. C.; ALMEIDA, E. A. D.; OLIVEIRA JR., W. D.; SILVEIRA, A. C.; REZENDE, J. M. D.; PINTO, F. S.; FERREIRA, A. W.; RASSI, A.; FRAGATA FILHO, A. A.; SOUSA, A. S. D.; CORREIA FILHO, D.; JANSEN, A. M.; ANDRADE, G. M. Q.; BRITTO, C. F. D. P. D. C.; PINTO, A. Y. D. N.; RASSI JR., A.; CAMPOS, D. E.; ABAD-FRANCH, F.; SANTOS, S. E.; CHIARI, E.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; MOREIRA, E. F.; MARQUES, D. S. D. O.; SILVA, E. L.; MARIN-NETO, J. A.; GALVÃO, L. M. D. C.; XAVIER, S. S.; VALENTE, S. A. D. S.; CARVALHO, N. B.; CARDOSO, A. V.; SILVA, R. A. E.; COSTA, V. M. D.; VIVALDINI, S. M.; OLIVEIRA, S. M.; VALENTE, V. D. C.; LIMA, M. M.; ALVES, R. V. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde,** v. 25, p. 7-86, 2016. ISSN 1679-4974.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; MAGALHAES, L. M.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol,** v. 36, n. 8, p. 377-87, Aug 2014. ISSN 1365-3024 (Electronic)0141-9838 (Linking).

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; VILLANI, F. N.; DA COSTA, G. C.; DA SILVEIRA, A. B.; REIS, D.; GOLLOB, K. J. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 104 Suppl 1, p. 208-18, Jul 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic)0074-0276 (Linking).

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst,** v. 81, n. 1-3, p. 87-96, Jul 03 2000. ISSN 0165-1838 (Print)0165-1838 (Linking).

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun,** v. 71, n. 3, p. 1185-93, Mar 2003. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

GONCALVES DA COSTA, S. C.; CALABRESE, K. S.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; LAGRANGE, P. H. Trypanosoma cruzi: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. **Histol Histopathol,** v. 17, n. 3, p. 837-44, 2002. ISSN 0213-3911 (Print)0213-3911 (Linking).

GRISOTTO, M. G.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; MARINHO, C. R.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A.; ALVAREZ, J. M. Most parasite-specific CD8+ cells in Trypanosoma cruzi-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alphabeta and CD8 molecules. **Immunology,** v. 102, n. 2, p. 209-17, Feb 2001. ISSN 0019-2805 (Print)0019-2805 (Linking).

GUEDES, P. M.; VELOSO, V. M.; CALIARI, M. V.; CARNEIRO, C. M.; SOUZA, S. M.; DE LANA, M.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T.; GALVAO, L. M. Trypanosoma cruzi high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 102, n. 2, p. 141-7, May 2007. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276 (Linking).

GUYTON, A. C. H., J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** . 2006.

HATCHER, F. M.; KUHN, R. E. Destruction of Trypanosoma cruzi by Natural killer cells. **Science,** v. 218, n. 4569, p. 295-6, Oct 15 1982. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075 (Linking).

HIGUCHI, M. D.; RIES, M. M.; AIELLO, V. D.; BENVENUTI, L. A.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg,** v. 56, n. 5, p. 485-9, May 1997. ISSN 0002-9637 (Print)0002-9637 (Linking).

HOFT, D. F.; EICKHOFF, C. S. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic Trypanosoma cruzi challenges. **Infect Immun,** v. 70, n. 12, p. 6715-25, Dec 2002. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

HOFT, D. F.; FARRAR, P. L.; KRATZ-OWENS, K.; SHAFFER, D. Gastric invasion by Trypanosoma cruzi and induction of protective mucosal immune responses. **Infect Immun,** v. 64, n. 9, p. 3800-10, Sep 1996. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

JONES, E. M.; COLLEY, D. G.; TOSTES, S.; LOPES, E. R.; VNENCAK-JONES, C. L.; MCCURLEY, T. L. Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg,** v. 48, n. 3, p. 348-57, Mar 1993. ISSN 0002-9637 (Print)0002-9637 (Linking).

KOEBERLE, F. Enteromegaly and Cardiomegaly in Chagas Disease. **Gut,** v. 4, p. 399-405, Dec 1963. ISSN 0017-5749 (Print)0017-5749 (Linking).

KUEHN, C. C.; OLIVEIRA, L. G.; MIRANDA, M. A.; PRADO, J. C. Distinctive histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal Trypanosoma cruzi Y strain infection. **Parasitology,** v. 141, n. 7, p. 904-13, Jun 2014. ISSN 1469-8161 (Electronic)0031-1820 (Linking).

LANA, M.; CHIARI, C. D. A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de Trypanosoma cruzi isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 81, p. 247-253, 1986. ISSN 0074-0276.

LARISSA CARLA LAUER SCHNEIDER, S. M. D. A., NILZA CRISTINIA BUTTOW. Trypanosoma cruzi (CEPA CL) PROMOVE PERDA NEURONAL NO PLEXO MIOENTÉRICODO CÓLON DE RATOS. 2016.

LOPES, M. F.; NUNES, M. P.; HENRIQUES-PONS, A.; GIESE, N.; MORSE, H. C., 3RD; DAVIDSON, W. F.; ARAUJO-JORGE, T. C.; DOSREIS, G. A. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to Trypanosoma cruzi infection due to a Th2-biased host immune response. **Eur J Immunol,** v. 29, n. 1, p. 81-9, Jan 1999. ISSN 0014-2980 (Print)0014-2980 (Linking).

MALAGA, S.; YOSHIDA, N. Targeted reduction in expression of Trypanosoma cruzi surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. **Infect Immun,** v. 69, n. 1, p. 353-9, Jan 2001. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

MINOPRIO, P.; ANDRADE, L.; LEMBEZAT, M. P.; OZAKI, L. S.; COUTINHO, A. Indiscriminate representation of VH-gene families in the murine B lymphocyte responses to Trypanosoma cruzi. **J Immunol,** v. 142, n. 11, p. 4017-21, Jun 01 1989. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767 (Linking).

MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. Immunobiology of murine T. cruzi infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol Rev,** v. 112, p. 183-207, Dec 1989. ISSN 0105-2896 (Print)0105-2896 (Linking).

MIYAHIRA, Y.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T.; KAMIYAMA, T.; NARA, T.; NAKAJIMA-SHIMADA, J.; AOKI, T. Induction of CD8+ T cell-mediated protective immunity against Trypanosoma cruzi. **Int Immunol,** v. 11, n. 2, p. 133-41, Feb 1999. ISSN 0953-8178 (Print)0953-8178 (Linking).

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 98, n. 5, p. 577-91, Jul 2003. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276 (Linking).

MOREIRA, N. M.; SANT'ANA, D. M.; ARAUJO, E. J.; TOLEDO, M. J.; GOMES, M. L.; ARAUJO, S. M. Neuronal changes caused by Trypanosoma cruzi: an experimental model. **An Acad Bras Cienc,** v. 83, n. 2, p. 545-55, Jun 2011. ISSN 1678-2690 (Electronic)0001-3765 (Linking).

MORTARA, R. A.; DA SILVA, S.; ARAGUTH, M. F.; BLANCO, S. A.; YOSHIDA, N. Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes. **Infect Immun,** v. 60, n. 11, p. 4673-8, Nov 1992. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infect Immun,** v. 71, n. 1, p. 557-61, Jan 2003. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

NOBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis,** v. 15, n. 4, p. 653-5, Apr 2009. ISSN 1080-6059 (Electronic)1080-6040 (Linking).

NOGUEIRA-PAIVA, N. C.; FONSECA KDA, S.; VIEIRA, P. M.; DINIZ, L. F.; CALDAS, I. S.; MOURA, S. A.; VELOSO, V. M.; GUEDES, P. M.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M. Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct Trypanosoma cruzi strains in Beagle dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 109, n. 1, p. 51-60, Feb 2014. ISSN 1678-8060 (Electronic)0074-0276 (Linking).

NUNES, M. C.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L.; COUNCIL ON CHAGAS DISEASE OF THE INTERAMERICAN SOCIETY OF, C. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol,** v. 62, n. 9, p. 767-76, Aug 27 2013. ISSN 1558-3597 (Electronic)0735-1097 (Linking).

PAHO, O. P. D. L. S. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. 2006.

PAHO, O. P. D. S. Doença de Chagas (Triponossomíase Americana). 2014.

PERNÍA, B. G.; YARBUH, A. L.; MORENO, E. Dilatación del tracto digestivo de ratones infectados con Trypanosoma cruzi. **Investigacion clínica,** v. 42, n. 3, 2001. ISSN 0535-5133.

PINTO, A. Y.; VALENTE, S. A.; VALENTE VDA, C.; FERREIRA JUNIOR, A. G.; COURA, J. R. [Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Para, Amapa and Maranhao observed between 1988 and 2005]. **Rev Soc Bras Med Trop,** v. 41, n. 6, p. 602-14, Nov-Dec 2008. ISSN 1678-9849 (Electronic)0037-8682 (Linking).

PIRON, M.; VERGES, M.; MUNOZ, J.; CASAMITJANA, N.; SANZ, S.; MAYMO, R. M.; HERNANDEZ, J. M.; PUIG, L.; PORTUS, M.; GASCON, J.; SAULEDA, S. Seroprevalence of Trypanosoma cruzi infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). **Transfusion,** v. 48, n. 9, p. 1862-8, Sep 2008. ISSN 1537-2995 (Electronic)0041-1132 (Linking).

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis,** v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001. ISSN 1473-3099 (Print)1473-3099 (Linking).

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet,** v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)0140-6736 (Linking).

REED, S. G.; ROTERS, S. B.; GOIDL, E. A. Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non-parasite antigen during chronic Trypanosoma cruzi infection in mice. **J Immunol,** v. 131, n. 4, p. 1978-82, Oct 1983. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767 (Linking).

REIS, M. M.; HIGUCHI MDE, L.; BENVENUTI, L. A.; AIELLO, V. D.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial Trypanosoma cruzi antigens. **Clin Immunol Immunopathol,** v. 83, n. 2, p. 165-72, May 1997. ISSN 0090-1229 (Print)0090-1229 (Linking).

ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with Trypanosoma cruzi or Trypanosoma brucei. **Infect Immun,** v. 61, n. 12, p. 5129-33, Dec 1993. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

ROTTENBERG, M. E.; RIARTE, A.; SPORRONG, L.; ALTCHEH, J.; PETRAY, P.; RUIZ, A. M.; WIGZELL, H.; ORN, A. Outcome of infection with different strains of Trypanosoma cruzi in mice lacking CD4 and/or CD8. **Immunol Lett,** v. 45, n. 1-2, p. 53-60, Feb 1995. ISSN 0165-2478 (Print)0165-2478 (Linking).

SANCHEZ-GUILLEN MDEL, C.; LOPEZ-COLOMBO, A.; ORDONEZ-TOQUERO, G.; GOMEZ-ALBINO, I.; RAMOS-JIMENEZ, J.; TORRES-RASGADO, E.; SALGADO-ROSAS, H.; ROMERO-DIAZ, M.; PULIDO-PEREZ, P.; PEREZ-FUENTES, R. Clinical forms of Trypanosoma cruzi infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 101, n. 7, p. 733-40, Nov 2006. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276 (Linking).

SANCHEZ, L. V.; RAMIREZ, J. D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology,** v. 140, n. 2, p. 147-59, Feb 2013. ISSN 1469-8161 (Electronic)0031-1820 (Linking).

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E. M.; REIS, D. D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAUJO-JORGE, T. C.; ANTAS, P. R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELOI-SANTOS, S. M.; FAVATO, D.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with Trypanosoma cruzi. **Scand J Immunol,** v. 58, n. 6, p. 655-63, Dec 2003. ISSN 0300-9475 (Print)0300-9475 (Linking).

SATO, M. N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; TANJI, M. M.; KANENO, R.; HIGUCHI, M. L.; DUARTE, A. J. CD8+ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in rats. **Infect Immun,** v. 60, n. 3, p. 1024-30, Mar 1992. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567 (Linking).

SAÚDE, O. P. A. D. **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da Doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS Rio de Janeiro 2009.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct 30 2007. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276 (Linking).

SESACRE, S. D. E. D. S. D. A. Divisão de Vigilância em Saúde da Secretaria de Estado de Saúde do Acre (Sesacre) - Doença de Chegas 2016.

SESAP/RN, S. D. S. P. D. R. G. D. N.-. Investigação aponta surto de Doença de Chagas em municípios do RN em 2015 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; BRISOLA MARCONDES, C.; GUEDES, L.; SIQUEIRA, G.; BARONE, A.; DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J.; PERES, B. A.; ARRUDA JR, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 33, n. 5, p. 351-357, 1991. ISSN 0036-4665.

SHRESTA, S.; PHAM, C. T.; THOMAS, D. A.; GRAUBERT, T. A.; LEY, T. J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? **Curr Opin Immunol,** v. 10, n. 5, p. 581-7, Oct 1998. ISSN 0952-7915 (Print)0952-7915 (Linking).

SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Trypanosoma cruzi: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Exp Parasitol,** v. 74, n. 1, p. 46-56, Feb 1992. ISSN 0014-4894 (Print)0014-4894 (Linking).

STAQUICINI, D. I.; MARTINS, R. M.; MACEDO, S.; SASSO, G. R.; ATAYDE, V. D.; JULIANO, M. A.; YOSHIDA, N. Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with Trypanosoma cruzi. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 4, n. 3, p. e613, Mar 02 2010. ISSN 1935-2735 (Electronic)1935-2727 (Linking).

SUN, J.; TARLETON, R. L. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute Trypanosoma cruzi infection. **Am J Trop Med Hyg,** v. 48, n. 2, p. 161-9, Feb 1993. ISSN 0002-9637 (Print)0002-9637 (Linking).

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. [Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo,** v. 13, n. 2, p. 76-91, Mar-Apr 1971. ISSN 0036-4665 (Print)0036-4665 (Linking).

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol Today,** v. 15, n. 3, p. 94-9, Mar 1999. ISSN 0169-4758 (Print)0169-4758 (Linking).

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends Parasitol,** v. 18, n. 6, p. 262-5, Jun 2002. ISSN 1471-4922 (Print)

1471-4922 (Linking).

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES, S., JR.; MOREIRA, M. C.; FILHO, G. B.; PENA, S. D. Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am J Pathol,** v. 156, n. 5, p. 1805-9, May 2000. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440 (Linking).

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. D.; CORREA-OLIVEIRA, R. PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet,** v. 348, n. 9031, p. 891-2, Sep 28 1996. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736 (Linking).

VELOSO, V. M.; GUEDES, P. M.; ANDRADE, I. M.; CALDAS, I. S.; MARTINS, H. R.; CARNEIRO, C. M.; MACHADO-COELHO, G. L.; DE LANA, M.; GALVAO, L. M.; BAHIA, M. T.; CHIARI, E. Trypanosoma cruzi: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 103, n. 6, p. 528-34, Sep 2008. ISSN 1678-8060 (Electronic)0074-0276 (Linking).

VIEIRA, P. M.; FRANCISCO, A. F.; MACHADO, E. M.; NOGUEIRA, N. C.; FONSECA KDA, S.; REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. **PLoS One,** v. 7, n. 3, p. e32912, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203 (Linking).

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. **An Acad Bras Cienc,** v. 78, n. 1, p. 87-111, Mar 2006. ISSN 0001-3765 (Print)0001-3765 (Linking).

YOSHIDA, N. Trypanosoma cruzi infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitol Int,** v. 57, n. 2, p. 105-9, Jun 2008. ISSN 1383-5769 (Print)1383-5769 (Linking).

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of Trypanosoma cruzi infection by oral route. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 104 Suppl 1, p. 101-7, Jul 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic)0074-0276 (Linking).

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G.; SECOND SATELLITE, M. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic)0074-0276 (Linking).