

Universidade De Brasília
Faculdade De Medicina
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Médicas
Laboratório Interdisciplinar de Biociências

Moisés Wesley de Macedo Pereira

**ASSOCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS FATORES NA PATOGÊNESE DA DOENÇA DE
CHAGAS – UMA AVALIAÇÃO DAS TEORIAS DE PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA
E AUTOIMUNIDADE**

BRASÍLIA – D.F

2019

Moisés Wesley de Macedo Pereira

**ASSOCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS FATORES NA PATOGÊNESE DA DOENÇA DE
CHAGAS – UMA AVALIAÇÃO DAS TEORIAS DE PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA
E AUTOIMUNIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

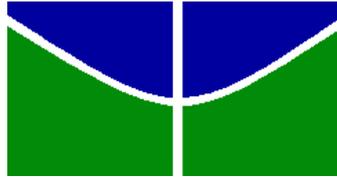
Orientadora: Prof^a. Dra. Mariana M. Hecht.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Luciana Hagström- Bex.

BRASÍLIA – D.F

2019

Este trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências. Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.



Universidade De Brasília
Faculdade De Medicina
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Médicas
Laboratório Interdisciplinar de Biociências

Dissertação de Mestrado

MOISÉS WESLEY DE MACEDO PEREIRA

Título:

ASSOCIAÇÃO DE MÚLTIPLOS FATORES NA PATOGÊNESE DA DOENÇA DE CHAGAS – UMA AVALIAÇÃO DAS TEORIAS DE PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA E AUTOIMUNIDADE

Banca examinadora:

Prof. Dra. Mariana Machado Hecht
Presidente/Orientadora
PPGCM/UnB

Profa. Dra. Carla Nunes de Araújo
Membro Titular
PPGCM/UnB

Prof. Dr. Cleudson Nery de Castro
Membro Titular
PPGMT/UnB

Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves
Membro suplente
PPGMT/UnB

Brasília, 28 de fevereiro de 2019.

DEDICATÓRIA

Àqueles que vivem às margens da sociedade sofrendo, em silêncio, acometidos pelas doenças negligenciadas, vítimas da contínua desigualdade social e da pouca atuação governamental em oferecer condições de saneamento, educação e cultura, favorecendo a manutenção do ciclo pobreza-doença e do desrespeito as suas necessidades biopsicossociais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo, me sustentar nos momentos mais difíceis e proporcionar tantas bênçãos.

A minha orientadora Mariana, por aceitar o desafio de receber um estudante enfermeiro sem nenhuma experiência de laboratório e proporcionar a ele a chance de realizar um dos seus grandes sonhos. Por me oferecer todo suporte que precisei ao longo desse tempo de mestrado e por andar ao meu lado, sempre tão disponível e paciente. Obrigado pelos puxões de orelha e por compartilhar essa bagagem incrível de conhecimento. Tenho certeza que há poucos orientadores que tem esse jeito fantástico de orientar e que benção eu recebi por ser seu orientando.

A minha coorientadora Luciana, que também sempre esteve disponível para ajudar no que fosse preciso. Muito obrigado por todas as orientações e também pela paciência.

A minha coorientadora, indiretamente, Nadjar, que sempre me estimulou a buscar mais, a me aprofundar mais. Muito obrigado por todas as sugestões durante as apresentações de Progress e por sempre estar disponível para responder qualquer dúvida.

A minha amiga Cássia, por oferecer sua experiência para me ajudar várias vezes durante os experimentos de bancada. Muito obrigado por ser tão prestativa e disponibilizar tanto do seu conhecimento, por oferecer tantas sugestões que facilitaram muito a execução da pesquisa, pelos inúmeros puxões de orelha que me fizeram um melhor pesquisador. Sem você, o trabalho teria sido muito mais árduo.

Ao amigo Dallago, pela disponibilidade em realizar os testes estatísticos e por estar sempre tão acessível para explicar o que fosse necessário, sanando qualquer dúvida, a qualquer tempo e quantas vezes fossem necessárias. Muito obrigado pela paciência também.

A professora Dora Rabello, por nos auxiliar tão prontamente em relação às análises histológicas, sua participação foi fundamental para conclusão do trabalho.

Ao professor José Roberto, por ter autorizado prontamente que usássemos o laboratório para preparar as lâminas de histologia.

A técnica de laboratório e amiga Glorinha, por ser tão gentil e nos ajudar a preparar as lâminas de histologia prontamente também. Sempre com bom humor, paciência e destreza.

A professora Tatiana Borges por aplicar a técnica de citometria de fluxo para que obtivéssemos as dosagens de citocinas.

A minha amiga Camilla Santana, que me apresentou para a Mari, sendo o primeiro passo para iniciar o mestrado. Muito obrigado por toda orientação inicial de laboratório, trabalhamos lado a lado por um tempo precioso. Aprendi muito contigo.

A minha amiga Tamires, pela disponibilidade de sempre, por me ensinar tanto ao longo desse tempo que trabalhamos juntos no laboratório. Você tem uma postura profissional inquestionável. Obrigado por ser exemplo.

A minha amiga Bruna, minha parceira de mestrado. Me ajudou tantas vezes que já perdi as contas. Muito obrigado por ser tão gentil, paciente e por ter dedicado tanto tempo de laboratório me ensinando e se envolvendo em tantos experimentos junto comigo. Sua gentileza, dedicação e inteligência são admiráveis.

A minha amiga Aline, que cuidou com tanto zelo das culturas de células para obtenção do *T. cruzi* usado em nossos experimentos. Muito obrigado pela disponibilidade e por ter elaborado a figura 17, ficou fantástica! Agradeço também pela paciência em todos os momentos que precisei da sua ajuda.

A minha amiga Ester, parceira de indagações sobre questões da vida. Muito obrigado pelo companheirismo, por ter ajudado na elaboração do resumo em inglês, e também por topou o desafio de viajar para apresentar resumos da pesquisa e por transportar doces de Caxambu.

Ao meu amigo Fernando, pela amizade construída e pelos ensinamentos durante o tempo que convivemos. Muito obrigado pela gentileza de sempre.

A minha amiga Nayra, por estar sempre disponível para me ajudar. Muito obrigado pela amizade de tantos anos que só se fortaleceu durante esse período que trabalhamos juntos no laboratório.

As minhas amigas Hanid, Marcelle, Carol, Isabella, Tayane, Thaís Milene e Thaís Minuzzi por todos os momentos vividos. Muito obrigado por todo ensinamento e ajuda que vocês me proporcionaram. Agradeço também a Camila Almeida pelas vezes que estive em laboratório comigo me ajudando a cuidar dos camundongos e a preparar alguns materiais para os experimentos.

Aos estagiários e também amigos que tanto me ajudaram por todo esse tempo de mestrado, Búzios, Victória, Jennifer, Gabriela, Bárbara, Tatiana, Dimitri, Jehny, Rafael e Carlito. A dedicação de vocês durante o período que me ajudaram foi crucial para o bom andamento dos experimentos.

A Dani, Thaís Veras, Mônica, Cristiane e Adriana que sempre ofereceram o suporte necessário na secretaria para o bom andamento da pesquisa, sempre nos atendendo muito bem.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital Regional de Ceilândia – HRC, por compreenderem as inúmeras vezes que me atrasei para chegar ao trabalho devido aos experimentos de laboratório.

A minha chefe e amiga Flávia, pelo suporte oferecido quando necessário para que os plantões chocassem o mínimo possível com as atividades do mestrado.

Aos colegas de trabalho da Escola Superior de Ensino em Saúde – ESCS, por todo apoio oferecido. Em especial, Soneide, Marta e Angela por terem proporcionado as condições necessárias para que eu cursasse algumas disciplinas e participasse de eventos, apresentando resultados.

Por último, mas, sem dúvidas, não menos importante, a minha família, por compreender tantos momentos em que estive ausente e por se preocuparem tanto com meu bem-estar. Em especial, quero agradecer a minha mãe Alcivânia, por estar ao meu lado desde sempre, por me apoiar, mesmo não concordando comigo, às vezes, por achar que a rotina tem sido muito puxada. Você me deu a base para lutar pelo que eu acredito de forma honesta. Muito obrigado por tudo.

“Provai e vede que o Senhor é bom; bem-aventurado o homem que Nele confia”
(Salmos 34:8)

“Para os montes levanto os olhos: de onde vem o meu socorro? O meu socorro vem do Senhor, Criador do céu e da terra” (Salmos 121:1,2)

“As ciências têm as raízes amargas, porém os frutos são doces” (Aristóteles)

“Quando descobri todas as respostas, mudaram-se as perguntas” (Sócrates)

Resumo

Introdução: A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é considerada a principal doença endêmica de origem parasitária nas Américas do Sul e Central, afetando aproximadamente oito milhões de pessoas em todo o mundo. Sua sintomatologia é variada, abrangendo desde casos assintomáticos até indivíduos que desenvolvem cardiomegalia, megacólon e megaesôfago. A relação parasito-hospedeiro é muito dinâmica e, por isso, a determinação da patogênese da doença de Chagas ainda é uma questão desafiadora. As teorias de persistência do parasito e autoimunidade buscam elucidar esse desafio. **Objetivo:** Verificar a contribuição de múltiplos fatores no processo de patogênese da doença de Chagas em modelo experimental. **Métodos:** Infectou-se camundongos machos e fêmeas com $1,0 \times 10^4$ formas tripomastigotas de *T. cruzi* das linhagens Colombiana, Y e CL Brener, sendo eutanasiados a 30 e 100 dias pós-infecção (dpi). Para determinar a carga parasitária e o acúmulo de integrações de minicírculos de kDNA no genoma dos camundongos, realizou-se a PCR quantitativa. A produção de anticorpos anti-*T. cruzi* e anti-proteínas cardíacas e intestinais foi mensurada pelo teste de ELISA e a produção de citocinas do perfil Th1/Th2 por citometria de fluxo. Análises histológicas avaliaram a presença de ninhos de amastigotas e alteração tecidual. As análises estatísticas estabeleceram as correlações entre os diversos parâmetros avaliados. **Resultados:** Observou-se uma importante correlação entre a carga parasitária do coração e intestino e a ativação das respostas imunes adaptativas celular e humoral. Apesar de não se associar à produção de anticorpos e de citocinas, a presença do parasito na medula óssea está diretamente relacionada ao processo inflamatório do tecido cardíaco e intestinal. Ao se avaliar de maneira quantitativa a integração de minicírculos de kDNA, notou-se uma associação entre a taxa de integração no coração e na medula ($p < 0,01$) e que ambas interagem com a resposta imune humoral dos indivíduos, associando-se a um aumento de IgG anti-*T. cruzi* e anti-proteínas do coração. Destaca-se que a produção de anticorpos anti-coração e anti-intestino a 100 dpi está fortemente correlacionado com o processo inflamatório desses órgãos ($p < 0,001$). **Conclusão:** Os resultados demonstraram que há interação dinâmica entre as teorias de persistência do parasito e autoimunidade durante a evolução da doença de Chagas. Isso realça a necessidade de estudar a patogênese da doença de Chagas com uma abordagem multifatorial. Assim, com base nos resultados alcançados nesse estudo e em dados já disponíveis na literatura, propõe-se uma nova teoria integradora para a patogênese da doença de Chagas.

Palavras-chave: doença de Chagas, patogênese, *Trypanosoma cruzi*, autoimunidade, kDNA, análise de correlação.

Abstract

Introduction: Chaga's disease is endemic throughout South and Central Americas, affecting about eight million people around the world. It is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The symptoms are diverse, including asymptomatic to severe cardiomegaly, megacolon and megaesophagus. Due to a dynamic parasite-host relation, the mechanisms of pathogenesis are still unclear. Two theories attempt to explain the pathogenesis: parasite persistence and autoimmunity. **Objective:** Verify the contribution of multiple factors in Chagas disease pathogenesis in experimental model. **Methodology:** Male and female mice were infected with $1,0 \times 10^4$ trypomastigotes from Colombian, Y and CL Brener strains. The mice were euthanized 30 and 100 days after infection (dpi). Quantitative PCR was performed to determine parasite load and accumulation of kDNA minicircle's integration in mice genome. Anti-*T.cruzi* and anti-cardiac/intestine proteins antibodies production was measured by ELISA and Th1/Th2 cytokines by flow cytometry. Amastigotes nests and tissue modification was evaluated by histology. Statistics tests established correlations between several parameters. **Results:** It was detected an important correlation between parasite load in heart and intestine and activation of cellular and humoral immune responses. The kDNA integration rate in heart and in bone marrow were associated ($p < 0,01$) and both interact with humoral immune response, associating with increased anti-*T.cruzi* and anti-heart-proteins IgG levels. Production of anti-heart and anti-intestine antibodies to 100 dpi is strongly correlated with inflammatory process in these organs ($p < 0,001$). **Conclusion:** The results have evidenced a dynamic interaction between from parasite persistence and autoimmunity theories, demonstrating the necessity to study Chagas disease pathogenesis in a translational approach. Then, a new integrative theory is now proposed for Chagas Disease pathogenesis, based in the achieved results and in other studies.

Keys words: Chaga's disease, pathogenesis, *Trypanosoma cruzi*, autoimmunity, kDNA, correlation analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição mundial dos casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .	18
Figura 2.	Curso natural de infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas.	22
Figura 3.	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	25
Figura 4.	Minicírculos e maxicírculos de kDNA em microscopia eletrônica.	28
Figura 5.	Resposta imunológica contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .	30
Figura 6.	Mecanismos de patogênese da doença de Chagas.	33
Figura 7.	Curva padrão para quantificação absoluta de <i>Trypanosoma cruzi</i> e determinação das integrações de minicírculos de kDNA.	45
Figura 8.	Determinação da razão kDNA/nDNA em pools de amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	46
Figura 9.	Detecção do DNA nuclear de <i>Trypanosoma cruzi</i> em tecidos de camundongos infectados com diferentes cepas do parasito.	52
Figura 10.	Quantificação da carga parasitária de camundongos machos e fêmeas, infectados com diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , nas fases aguda e crônica da infecção.	53
Figura 11.	Integração de minicírculos de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em diferentes tecidos de camundongos infectados.	54
Figura 12.	Quantificação de integrações de minicírculo de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em diferentes tecidos de camundongos nas fases aguda e crônica da doença de Chagas.	57
Figura 13.	Dosagem de citocinas do perfil Th1/Th2 em camundongos infectados com diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> , nas fases aguda e crônica da doença de Chagas.	58
Figura 14.	Detecção de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> e autoanticorpos em camundongos infectados por diferentes cepas do parasito.	60
Figura 15.	Perfil de taxas de anticorpos produzidos contra antígenos do <i>Trypanosoma cruzi</i> , coração e intestino.	62
Figura 16.	Progressão do processo inflamatório em camundongos infectados com diferentes cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	64
Figura 17.	Teoria integradora da patogênese da doença de Chagas.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Organização dos grupos experimentais de acordo com o sexo, cepa infectante e momento da eutanásia.	42
Tabela 2.	Critérios utilizados para a avaliação das alterações histológicas identificadas no tecido cardíaco e intestinal dos animais dos diversos grupos experimentais.	49
Tabela 3.	Porcentagem geral de integrações em cada tecido, independente da cepa.	55
Tabela 4.	Correlações entre carga parasitária, integração de kDNA, produção de anticorpos e citocinas, parasitismo e processo inflamatório.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZN – Benznidazol.

CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças.

DC – doença de Chagas.

DTU – Unidade Discreta de Tipagem.

ECG – eletrocardiograma.

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto.

IgG – imunoglobulina G.

IgG_C – Imunoglobulina G anti-proteína cardíaca.

IgG_I – Imunoglobulina G anti-proteína intestinal.

IgG_TC – Imunoglobulina G anti-*T.cruzi*.

IgM – imunoglobulina M.

IgM_C – Imunoglobulina M anti-proteína cardíaca.

IgM_I – Imunoglobulina M anti-proteína intestinal.

IgM_TC – Imunoglobulina M anti-*T.cruzi*.

IL – interleucina.

INF- γ – interferon-gama.

kDa – quilodalton.

kDNA – DNA do cinetoplasto .

MASP – proteína de superfície associada à mucina.

nDNA – DNA nuclear.

ng – nanogramas.

PAMP's – padrões moleculares associados a patógenos.

par. Eq./mL – parasitos equivalente/mililitro.

pb – pares de bases.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa.

rpm – rotações por minuto.

T.C - *Trypanosoma cruzi*.

T.cruzi – *Trypanosoma cruzi*.

TGF - fator de transformação do crescimento.

Th – T helper.

TNF – fator de necrose tumoral.

U/ μ L – unidades arbitrárias/microlitro.

UI/mL – unidades internacionais/mililitro.

μ g/mL – microgramas/mililitro.

μ L – microlitro.

μ M – micrometro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aspectos Gerais da doença de Chagas.....	17
1.1.1. História e epidemiologia.....	17
1.1.2. Manifestações clínicas.....	20
1.1.3. Condutas relacionadas ao tratamento	23
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
1.2.1. Ciclo de vida	24
1.3. Aspectos genéticos	25
1.3.1. DNA nuclear	25
1.3.2. Unidades Discretas de Tipagem	26
1.3.3. DNA mitocondrial	28
1.4. Ativação do sistema imune por <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
1.5. Patogênese da doença de Chagas	32
1.5.1. Persistência do parasito.....	33
1.5.2. Autoimunidade	34
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVOS.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Grupo Experimental e infecção dos animais.....	41
4.2. Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
4.3. Avaliação da Infecção	43
4.4. Coleta de amostras, obtenção de soro e extração de DNA	43
4.5. PCR quantitativa	44
4.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto	46
4.7. Dosagem de citocinas por citometria de fluxo.....	48
4.8. Análise histológica	48
4.9. Análise Estatística.....	49
5. RESULTADOS.....	51
5.1. Quantificação de carga parasitária e da integração de kDNA.....	51
5.2. Ativação da resposta Imune.....	58
5.3. Análise histológica	63
5.4. Análise de correlação.....	64

6. DISCUSSÃO	67
6.1. Persistência do parasito	68
6.2. Integração do kDNA.....	69
6.3. Ativação da resposta imune	71
6.4. Teoria integradora da patogênese da doença de Chagas – uma nova proposta	75
7. CONCLUSÃO	78
8. PERSPECTIVAS.....	80
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais da doença de Chagas

1.1.1. História e epidemiologia

A doença de Chagas (DC) é considerada a principal doença endêmica de origem parasitária nas Américas do Sul e Central, apresentando alta morbidade e mortalidade. Em 2009, completou-se 100 anos do descobrimento dessa enfermidade, sendo considerado um marco científico realizado pelo médico Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, enquanto realizava expedição à pequena cidade de Lassance, no Estado de Minas Gerais. Sendo médico e pesquisador, não focou apenas em oferecer tratamento aos doentes: durante suas pesquisas, detectou a presença de um tripanossomatídeo no sangue de um gato e, pouco tempo depois, também em uma criança febril de nome Berenice, com dois anos de idade, e residente em uma casa infestada por "barbeiros" infectados com o parasito. Carlos Chagas ganhou notoriedade devido à sua tripla descoberta, identificando o vetor, o agente etiológico da doença e descrevendo a patologia (Gutierrez *et al.*, 2009; Malafaia e Rodrigues, 2010; WHO, 2018).

Também conhecida como tripanossomíase americana, a DC é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que afeta aproximadamente oito milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina. A doença é endêmica em 21 países e ocasiona a morte de mais de 10 mil pessoas por ano. Inicialmente, a DC esteve concentrada no meio rural, porém as mudanças socioeconômicas, o êxodo rural, o desmatamento e a urbanização transformaram o perfil epidemiológico da doença (Vargas *et al.*, 2018; WHO, 2018; OPAS, 2018). Ademais, tem sido cada vez mais comum identificar a infecção na população de países não endêmicos, fato relacionado à mobilidade populacional, principalmente a migração, associada à transmissão subsequente (autóctone), decorrente de transfusão de sangue, via congênita e transplante de órgãos (Dias *et al.*, 2016; WHO, 2018) (Figura 1).

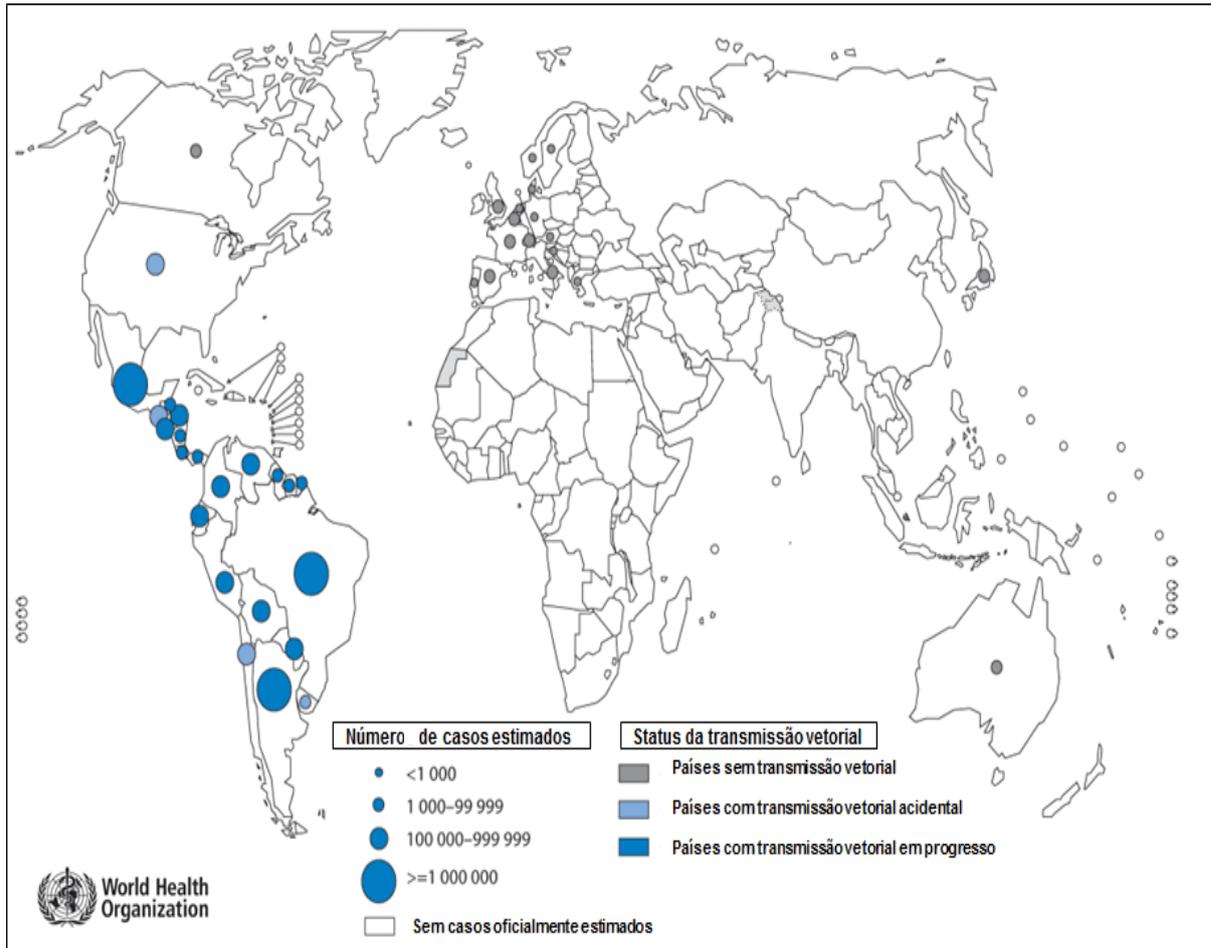


Figura 1. Distribuição mundial dos casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*. Mapa elaborado com base em estimativas oficiais e *status* de transmissão vetorial e outras vias em todo o mundo, 2006-2009 (Fonte: WHO, 2010; mapa acessado em 12 de outubro de 2018).

No Brasil, estima-se que haja o total 4,6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, resultando em, aproximadamente, 6.000 óbitos por ano (Martins-Melo *et al.*, 2014). Atualmente, há um predomínio de casos crônicos, reflexo da infecção por transmissão vetorial em décadas passadas. Relatos de casos de transmissão, considerando todas as vias, são menos comuns nos dias atuais. Estudo realizado entre os anos de 2001 e 2008 em crianças menores de cinco anos residentes em área rural apresentou prevalência da infecção de 0,03%. Destas, 0,02% com positividade materna, sugerindo transmissão vertical, e apenas 0,01% com positividade somente na criança, demonstrando indícios de transmissão vetorial. Ademais, a letalidade anual da DC também apresentou diminuição entre o anos de 2006 (5,9%) e 2013 (1,1%) (Ministério da Saúde, 2015).

Entre os casos agudos da DC confirmados no Brasil no período de 2000 a 2013, verificou-se que a transmissão por via oral foi a mais frequente em todos os anos. Contudo, é importante destacar que mais de 20% dos casos foram concluídos com a forma de transmissão ignorada ou sem preenchimento deste campo na ficha de notificação. De interesse, 87,5% destes registros são do estado do Pará. Embora a parcela de transmissão vetorial (6,4%) seja menor, nota-se a persistência desta forma mesmo depois de 2006, ano da certificação de interrupção de transmissão por *T. infestans* no país. No que diz respeito à transmissão vertical, 50% dos registros foram feitos no Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2015).

De acordo com os dados epidemiológicos, as formas de transmissão do *T. cruzi* podem ser divididas em dois grupos distintos: a) as formas mais frequentes, que incluem a transmissão vetorial, a transfusão sanguínea, a transmissão oral, e por via placentária ou transmissão congênita; e b) as formas secundárias, através de acidentes com perfurocortantes, contato com animais infectados e transplantes de órgãos. A transmissão congênita apresenta diferença em cada região, variando de 0,5 a 10% dos casos em lugares como Chile, Bolívia e Paraguai. Embora a transmissão oral seja acidental, pode ser considerada endêmica na Amazônia (Coura, 2007; Pinto *et al.*, 2008; Coura e Dias, 2009). Além dessas vias, há a transmissão sexual, ainda sem registros epidemiológicos em humanos, mas já descrito em modelo animal (Ribeiro *et al.*, 2016; Araujo *et al.*, 2017; Rios *et al.*, 2018).

No que se refere à distribuição da DC de acordo com o sexo e a idade dos indivíduos, nota-se uma maior prevalência na faixa etária de 40 anos, com igual distribuição entre homens e mulheres (Prata, 2001). Entretanto, estudo realizado por Gasparim *et al.* (2018) visando descrever os perfis clínico-epidemiológicos dos pacientes com DC na região Centro-Norte do Estado do Paraná verificou que, dos 270 pacientes infectados pelo *T. cruzi*, 173 (64,1%) eram do sexo feminino. Do total de pacientes, 38,5% tinham idade variando entre 65 e 74 anos e apenas 3,3% tinham idade abaixo ou igual a 44 anos. Nesse mesmo estudo, foram caracterizados 33 óbitos, sendo o sexo masculino predominante (55%) e a mediana de idade de 38 anos (Gasparim *et al.*, 2018). Igualmente, Vargas *et al.* (2018) realizaram pesquisa para confirmar um surto de DC aguda no Rio Grande do Norte. Foram encontrados

18 indivíduos positivos, sendo 12 do sexo feminino (66,7%). A mediana de idade foi de 49 anos.

Em relação ao dano no miocárdio, há diferença entre homens e mulheres. Homens apresentam fibrose miocárdica maior que as mulheres ($p=0,002$) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor ($p<0,001$), evidenciando o fato de que homens possuem prognóstico pior do que as mulheres (Assunção *et al.*, 2016).

Dificilmente as doenças infecciosas afetam da mesma forma os sexos masculino e feminino, sendo um fato já observado tanto em humanos quanto em modelos animais (Marshall *et al.*, 2001; Sen e Östlin, 2008; Guerra-Silveira e Abad-Franch, 2013). Duas hipóteses principais podem explicar essa divergência entre os sexos. A primeira é a hipótese fisiológica: aponta que a relação entre hormônios sexuais e o sistema imunológico torna um sexo mais vulnerável a certa doença infecciosa do que outro, associando também às diferenças genéticas como contribuintes. Em mamíferos, a imunomodulação dos esteroides gonadais foi associada a taxas mais elevadas de infecção em homens, ocorrendo diminuição da testosterona e estrogênio (Brabin e Brabin, 1992; Zuk e Mckean, 1996; Roberts *et al.*, 2001; Moore e Wilson, 2002; Klein, 2004). A segunda é a hipótese comportamental: afirma que a taxa de infecção tendendo mais para um sexo do que para o outro está associada à exposição específica do sexo ao contágio (Brabin e Brabin, 1992; Moore e Wilson, 2002). Essa exposição mais elevada se deve a diferenças de comportamento entre os sexos, tornando um deles mais próximo de certos patógenos (Zuk e Mckean, 1996; Krieger, 2003).

1.1.2. Manifestações clínicas

A DC apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. Pacientes na fase aguda da infecção costumam não demonstrar sinais e/ou sintomas, e quando apresentam, eles tendem a ser inespecíficos e leves. Febre prolongada, mal estar, cefaleia e perda de apetite são exemplos dos possíveis sinais e/ou sintomas. É comum pequeno aumento dos linfonodos. Por serem muito semelhantes aos que são apresentados durante uma infecção viral, muitos indivíduos infectados acabam não sendo diagnosticados nessa fase, pois não costumam buscar atendimento.

Entretanto, em alguns casos essas manifestações clínicas podem ser extremamente variáveis, sendo possível a ocorrência de insuficiência cardíaca grave e choque cardiogênico. A sintomatologia depende do grau de resposta imunológica do hospedeiro e também da intensidade da infecção (Souza *et al.*, 2016). Quando a transmissão de *T. cruzi* ocorre pelo vetor, é possível verificar chagoma de inoculação ou sinal de Romaña, caso a picada tenha sido na região palpebral, caracterizado como pequena formação maculonodular, eritematosa, consistente, pouco dolorosa, com lenta regressão, podendo persistir por até dois meses (Dias *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Simões *et al.*, 2018).

Na ausência de tratamento e, às vezes, até com tratamento, a infecção progride para a fase crônica após algumas semanas, permanecendo enquanto o paciente viver. Os pacientes com DC crônica tem a infecção persistente, embora possa se apresentar de forma assintomática por várias décadas (Gironès *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Zrein *et al.*, 2018). Após 20 a 30 anos da infecção inicial, cerca de 30% dos pacientes evoluem para a forma sintomática da doença, desenvolvendo as “megassíndromes” e necessitando de tratamento clínico complexo. Na fase crônica, a DC pode se apresentar em formas indeterminada, digestiva, cardíaca ou cardiodigestiva (Gironès *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Zrein *et al.*, 2018). A Figura 2 apresenta o curso natural da infecção pelo *T. cruzi* e os principais eventos envolvidos.

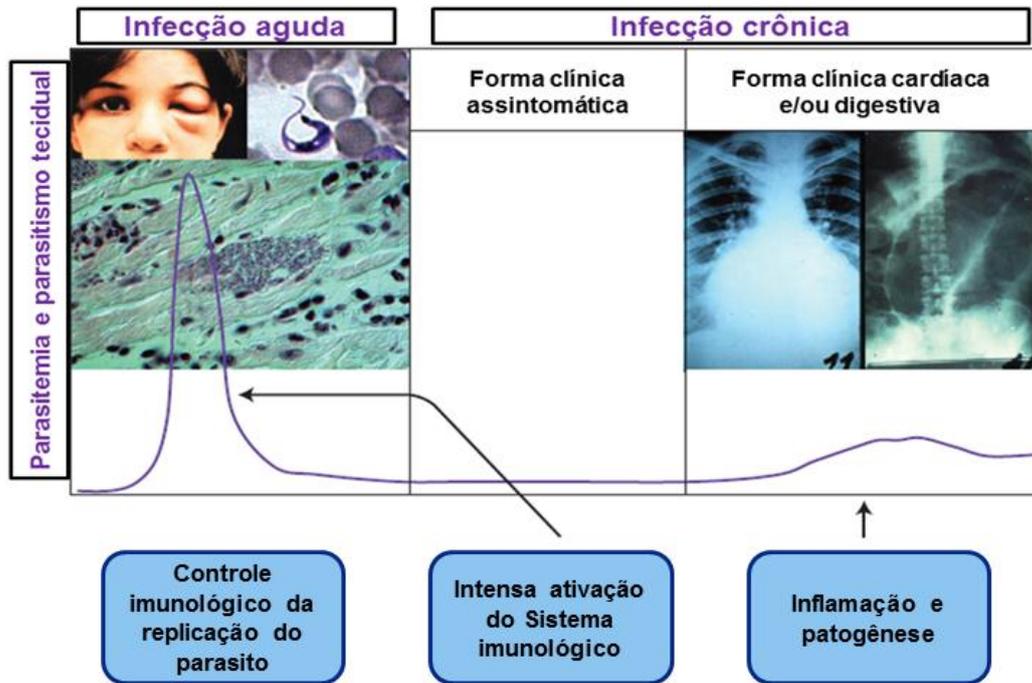


Figura 2. Curso natural de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e DC. Na infecção aguda, as imagens fotográficas ilustram: uma criança com sinal de Romaña; uma forma tripomastigota na corrente sanguínea; e um ninho de amastigota no tecido cardíaco. Na infecção crônica, as imagens fotográficas ilustram: cardiomegalia e megacólon em pacientes com DC. O gráfico com duas curvas representa o grau de replicação do parasito na fase aguda e crônica, respectivamente (imagem adaptada de Junqueira *et al.*, 2010).

A cardiomiopatia crônica da DC é reflexo do processo de miocardite fibrosante. O comprometimento do coração envolve importante taxa de mortalidade e morbidade, sendo a principal causa de cardiomiopatia não isquêmica na América Latina (Simões *et al.*, 2018). A DC causa um aumento progressivo no depósito de colágeno nos dois ventrículos cardíacos e isso parece variar de acordo com a cepa infectante. A esse respeito, pesquisadores demonstraram que a cepa Colombiana de *T. cruzi* provoca um acúmulo mais acentuado de colágeno no ventrículo esquerdo em modelo murino (Cruz *et al.*, 2016). Podem acontecer alterações patológicas adicionais, incluindo distúrbios de condução, disautonomia, cardiomegalia, fibrose, afinamento da parede ventricular e dano microvascular (Gutierrez *et al.*, 2009).

As alterações no trato gastrointestinal incluem o megacólon, megaesôfago, megaestômago, megaduodeno e megajejuno. De um total de 1.708 necropsias realizadas em chagásicos crônicos, constatou-se que o megacólon foi a manifestação gastrointestinal mais frequente, seguida de megaesôfago. Essas alterações parecem desenvolver-se a partir de lesões no sistema nervoso central e entérico (Matsuda *et al.*, 2009).

Em pacientes imunocompetentes, as alterações neurológicas são raras, mas aqueles que apresentem algum grau de imunodepressão na fase aguda, principalmente crianças, têm a possibilidade de desenvolver encefalite, o que pode comprometer o prognóstico. Tais indivíduos podem apresentar abscessos granulomatosos no cérebro, comprometendo a função neurológica. A meningoencefalite pode acontecer em casos muito graves e deve ser investigada quando os indivíduos apresentarem quadro de cefaleia, vômitos, rigidez de nuca e/ou convulsões (Souza *et al.*, 2016).

1.1.3. Conduas relacionadas ao tratamento

Existem dois medicamentos comerciais disponíveis para combater *T. cruzi*: Benznidazol (BZN) e Nifurtimox, introduzidos em 1971 e 1965, respectivamente. Eles apresentam níveis variados de eficácia, principalmente em relação à fase crônica. O principal critério para estabelecer a efetividade do tratamento é a conversão de sorologia positiva para negativa, associada a resultados negativos em testes parasitológicos, tais como xenodiagnóstico e/ou hemocultura, ou investigação da presença do parasito através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Gutierrez *et al.*, 2009; Zrein *et al.*, 2018).

Durante a fase aguda, as duas drogas têm sucesso clínico, inclusive em relação à DC congênita. Porém, na fase crônica da DC, calcula-se que a taxa de cura com BZN seja de 8% a 40%. Portanto, a efetividade do tratamento nesta fase é considerada baixa (Gutierrez *et al.*, 2009; Zrein *et al.*, 2018).

Em 2015, foi publicado o ensaio “Avaliação do Benznidazol para Interrupção da Tripanossomíase (BENEFIT)”, sendo o maior ensaio clínico realizado para a DC, cujo objetivo foi avaliar a segurança e eficácia do BZN na redução do agravamento da doença em pacientes com cardiomiopatia já diagnosticada. Realizado entre 2004 e 2011, avaliou 2854 participantes de vários países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia e El Salvador) que fizeram uso, por via oral, de BZN ou placebo. Os resultados demonstraram que não houve melhora da sintomatologia, embora tenha sido detectada redução da presença de parasitos circulantes (Morillo *et al.*, 2015).

Diversos fatores parecem influenciar na taxa de sucesso do medicamento, incluindo o genótipo do parasito, idade dos pacientes, intervalo entre a infecção e o

início do tratamento e o quadro clínico. Outro problema é o fato de que tais drogas causam vários efeitos colaterais. Devido a essas questões, a relação risco-benefício entre os efeitos indesejados e os prováveis benefícios advindos do uso do medicamento deve ser levada em consideração quanto aos riscos de desenvolver complicações cardíacas e /ou digestivas caso o tratamento não seja iniciado (Gutierrez *et al.*, 2009; Zrein *et al.*, 2018).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

1.2.1. Ciclo de vida

O parasito *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado intracelular, causador da DC. Apresenta três morfologias principais: epimastigota, forma replicativa encontrada apenas no triatomíneo; tripomastigota, forma encontrada na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado e responsável pelo início da infecção; e amastigota, que se replica intracelularmente nas células do hospedeiro vertebrado. Possui um ciclo biológico do tipo heteroxeno, alternando entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado (Girones *et al.*, 2005).

Sua transmissão vetorial acontece quando as fezes, contendo a forma tripomastigota metacíclica, são depositadas próximas à região onde o triatomíneo realizou a hematofagia. Isso possibilita que as formas metacíclicas penetrem o organismo do hospedeiro vertebrado pelo sítio da picada, alcançando a corrente sanguínea e infectando várias células fagocíticas e não-fagocíticas do hospedeiro. Dentro das células, as formas tripomastigotas transformam-se em amastigotas e iniciam processo de multiplicação por divisão binária. Após intensa replicação, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos flagelados, que rompem a célula, podendo infectar células próximas ou se disseminar e invadir células e tecidos em locais distantes do corpo. Os tripomastigotas podem infectar outros triatomíneos no momento do repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo biológico no hospedeiro invertebrado. No intestino do vetor, os tripomastigotas se transformam em epimastigotas, e depois se transformam em tripomastigotas metacíclicos no intestino médio e posterior do vetor, dando sequência ao ciclo biológico quando realizar novo repasto sanguíneo (Girones *et al.*, 2005) (Figura 3).

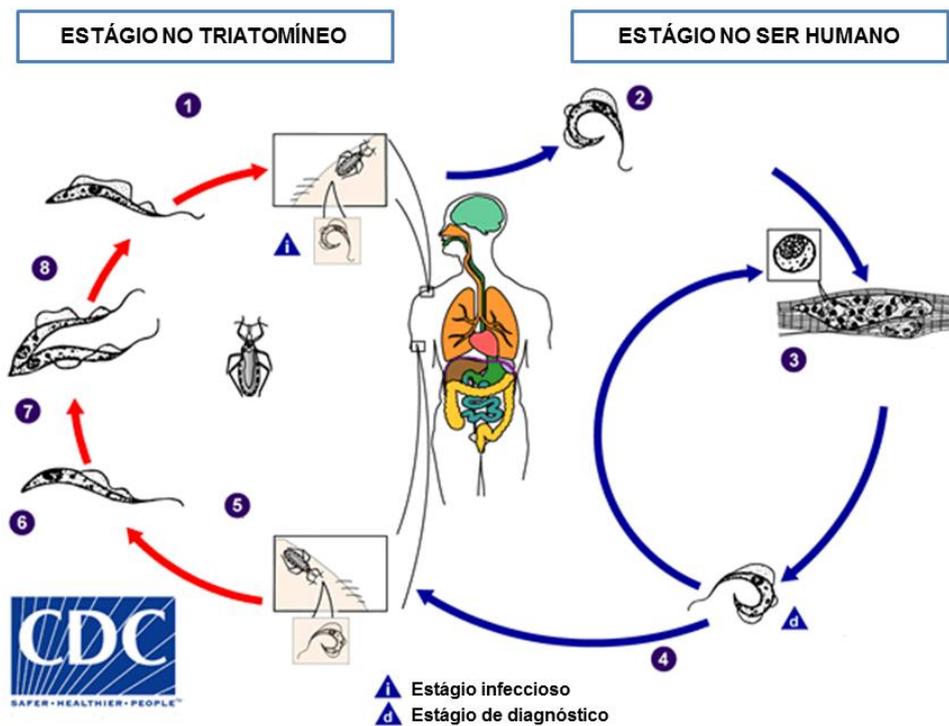


Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 1) O vetor (triatomíneo) infectado realiza o repasto sanguíneo e libera tripomastigotas metacíclicas em suas fezes, perto do local da lesão ocasionada pela picada. Os tripomastigotas entram no hospedeiro através dessa lesão ou através de membranas de mucosas intactas, como a conjuntiva. 2) Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem as células próximas ao local de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. 3) Os amastigotas se multiplicam por fissão binária. 4) Amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e depois são liberados na circulação. 5) Os tripomastigotas infectam células de uma variedade de tecidos e se transformam em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. Manifestações clínicas podem resultar deste ciclo infeccioso. Os tripomastigotas da corrente sanguínea não se replicam. A replicação é retomada somente quando os parasitos entram em outra célula ou são ingeridos por outro vetor. 6) Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do vetor. 7) Os parasitas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos no intestino médio. 8) Tripomastigotas metacíclicos infecciosos no intestino posterior. (Adaptado de CDC, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.)

1.3. Aspectos genéticos

1.3.1. DNA nuclear

O genoma do *T. cruzi* é constituído por DNA nuclear (nDNA) e DNA mitocondrial (kDNA) e possui de 60,3 a 105 megabases, dependendo da cepa, sendo que o DNA total varia de 125 a 280 fentogramas/célula (Teixeira *et al.*, 2011). Os tripanossomatídeos possuem diferenças na cromatina quando comparados aos mamíferos e outros grupos de organismos, sendo esta pouco compactada e frágil a nível físico e enzimático (Toro *et al.*, 1988). Seus cromossomos, 20 a 46, não

condensam durante a divisão celular, o envelope nuclear permanece enquanto essa divisão ocorre, os fusos mitóticos estão na membrana nuclear e não é possível visualizar os cromossomos (Hecker *et al.*, 1995; Teixeira, *et al.*, 2011).

O primeiro sequenciamento do genoma de *T. cruzi*, cepa CL Brener, revelou que o parasito codifica cerca de 22.570 proteínas distintas, sendo 12.570 originárias de pares alélicos. Mais de 50% do genoma consiste em sequências repetidas, como retrotransposons, e genes de grandes famílias de moléculas de superfície, que incluem trans-sialidasas, mucinas, GP63s e proteína de superfície associada à mucina (MASP) (>1300 cópias) (El-Sayed *et al.*, 2005). Um Sequenciamento subsequente de linhagens distintas do *T. cruzi* verificou que o tamanho do genoma pode variar com a linhagem e que ele está diretamente relacionado com o conteúdo de DNA satélite. As regiões duplicadas do tamanho dos cromossomos foram identificadas, aumentando o número de genes (Souza *et al.*, 2011).

1.3.2. Unidades Discretas de Tipagem

Unidade Discreta de Tipagem (DTU) (do inglês, *Discrete Typing Units*) é um conjunto de isolados do *T. cruzi* com semelhanças genéticas e que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns entre eles (Zingales, 2011). A alta variabilidade genética do *T. cruzi* fez com que esse parasito fosse agrupado em seis DTUs: TcI até TcVI. Além disso, existe ainda uma linhagem identificada inicialmente em morcegos que pode causar doença em humanos - Tcbat. Essa diversidade relaciona-se à heterogeneidade de fenótipos do parasito e pode funcionar como fator crucial no curso clínico da DC (Ragone *et al.*, 2012).

Não há consenso sobre o melhor método para identificar os diferentes DTUs e nem sobre as relações evolutivas entre elas, ou seja, sobre a história evolutiva do *T. cruzi* (Breniere, *et al.*, 2016). Inicialmente, os estudos relacionavam as DTUs ao tipo de hospedeiro, ciclo de transmissão e distribuição geográfica nas Américas. Hoje, sabe-se que a plasticidade genômica do *T. cruzi* também é determinada por outros mecanismos, como clonalidade, hibridização e trocas genéticas convencionais e não convencionais.

Os estoques de TcI e TcII são antigos e heterogêneos, enquanto os estoques de TcV e TcVI são recentes e apresentam pouca diversidade genética. As relações entre as DTU's TcIII e TcIV não são suficientemente esclarecidas. Um modelo de três ancestrais (TcI, TcII e TcIII) sugere dois eventos de hibridização independentes entre TcII e TcIII para gerar TcV e TcVI. (Ortiz, *et al.*, 2017). A maioria das infecções humanas na América Latina é causada pelas DTUs TcI, TcII, TcV e TcVI, sendo mais comumente encontrados dentro dos ciclos de transmissão domésticos. (Garcia *et al.*, 2017).

Ainda não se sabe o papel exato da DTU em relação ao desfecho clínico da transmissão do *T. cruzi* e desenvolvimento da DC. Acredita-se que a alta diversidade de DTUs, que varia muito de uma região geográfica para outra, possa influenciar esses aspectos (Herrera *et al.*, 2007; Spotorno, *et al.*, 2008; Zingales, *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2009; Llewellyn *et al.*, 2009). Por exemplo, o TcI, encontrado com maior frequência em países do Norte da América do Sul e Amazônia, América Central e México (Carranza *et al.*, 2009), tem sido associado à doença cardíaca chagásica crônica e parece não favorecer a forma digestiva (Bosseno *et al.*, 2002; Zingales, 2011; Roellig *et al.*, 2013).

Ainda que qualquer DTU possa ocasionar a DC, existem raros relatos da DTU IV em humanos. Já as DTUs II e V se apresentam como, provavelmente, as mais patogênicas, provocando manifestações cardíacas e digestivas. Esses dados não podem ainda ser vistos como definitivos, haja vista que foi um compilado de informações a partir de amostras de tamanho pequeno originárias de regiões endêmicas (Zingales, 2011). Além disso, DTUs apresentam diferença de tropismo tecidual, o que pode estar ligado ao desenvolvimento de manifestações clínicas, embora estudos não tenham constatado definitivamente essa associação (Gonzalez, *et al.*, 2010; Martinez-Perez *et al.*, 2016).

Interessantemente, as anormalidades no eletrocardiograma (ECG) constatadas frequentemente na cardiopatia chagásica parecem ser mais comuns em doentes com infecções mistas por *T. cruzi*. Na Argentina, a infecção por TcII-TcV-TcVI demonstrou ser mais comum em pacientes com cardiopatia chagásica em comparação a pacientes assintomáticos (Cura *et al.*, 2012). Infecções por TcII-TcV-TcVI podem apresentar ritmo sinusal com bloqueio atrioventricular de 1º grau, infarto da parede inferior-posterior e anormalidade da onda T (Garcia *et al.*, 2017).

1.3.3. DNA mitocondrial

O *Trypanosoma cruzi* possui uma única mitocôndria com genoma condensado em uma rede entrelaçada de minicírculos e maxicírculos (Figura 4), conhecidos como DNA de cinetoplasto (kDNA), que chega a representar 15% do DNA total do parasito. Enquanto dezenas de maxicírculos codificam RNAs e proteínas ribossomais envolvidos no processo de transdução de energia mitocondrial, milhares de minicírculos, compreendendo 90% da rede, codificam RNAs de pequeno porte utilizados na edição dos mRNAs dos maxicírculos (Simpson, 1973). Os minicírculos de *T. cruzi* são moléculas pequenas de 1,4 quilobases, que apresentam uma organização bastante peculiar: observa-se a presença de quatro regiões conservadas (120-160pb) intercaladas por quatro regiões variáveis (280-320pb), enquanto os maxicírculos variam de 20 a 40 quilobases.

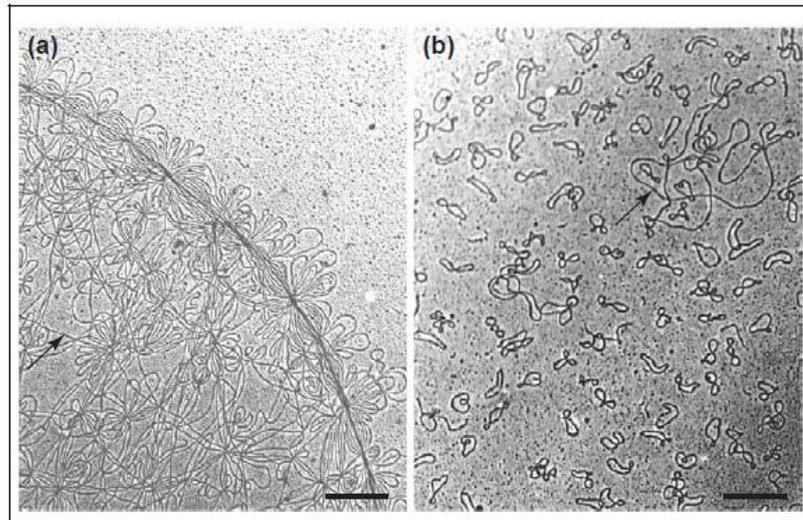


Figura 4. Minicírculos e maxicírculos de kDNA em microscopia eletrônica. A) Rede intacta do kDNA. Minicírculos e maxicírculos; **B)** Rede de kDNA decatenada pela Topoisomerase II, evidenciando minicírculos (seta na imagem A) e maxicírculos (seta na imagem B) individuais. (Imagem de Liu *et al.*, 2005).

A manutenção da integridade do kDNA é vital para a manutenção da vida do parasito. Seu processo de multiplicação envolve a duplicação de minicírculos e maxicírculos que serão distribuídos igualmente nas células-filhas. De interesse, sabe-se que os minicírculos são liberados para a periferia da rede de kDNA para

que ocorra sua duplicação, por meio da ação de uma topoisomerase II que os cliva e os lineariza. Os minicírculos replicados apresentam *gaps* que deverão ser removidos antes que eles retornem ao disco de kDNA. A reintegração dos minicírculos também envolve topoisomerasas que promovem a ligação das moléculas recém-sintetizadas à rede de kDNA (Lukes *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005).

1.4. Ativação do sistema imune por *Trypanosoma cruzi*

As respostas imunes humoral e celular têm papel crucial no processo de controle de parasitos. Assim, o sistema imunológico do hospedeiro possui diversos mecanismos para combater o invasor, tais como ativação do sistema complemento, produção de anticorpos, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e opsonização. A ação das citocinas pode estar relacionada ou não à susceptibilidade à DC na fase aguda, dependendo do tipo de resposta que é ativada (Th1 ou Th2). Já durante a DC crônica, as citocinas presentes no plasma parecem ter relação com a gravidade da doença, independentemente do aparecimento de sintomas. Se a infecção não for interrompida, o sistema imunológico prepara uma resposta específica contra *T. cruzi*, mediada por anticorpos (Bona *et al.*, 2018).

A resposta imune inata (Figura 5) é crucial no processo de combate contra *T. cruzi*. Na fase aguda da infecção é imprescindível que haja estimulação do processo inflamatório, necessitando da ação de mediadores como interleucina- (IL-) 12, IL-18, IFN- γ e óxido nítrico, a fim de combater a presença do parasito. Contudo, a ação inflamatória exacerbada causa danos significativos ao tecido do hospedeiro. Portanto, também é essencial a ação de TGF (fator de transformação do crescimento), IL-4 e IL-10, pois regulam a ação das citocinas pro-inflamatórias (Basso, 2013; Acevedo *et al.*, 2018). De interesse, a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), IL-12, IL-22, IL-6, IL-10 pode ser diferente, dependendo da cepa de *T. cruzi* usada para estimulação (Poveda *et al.*, 2014; Cardillo *et al.*, 2015).

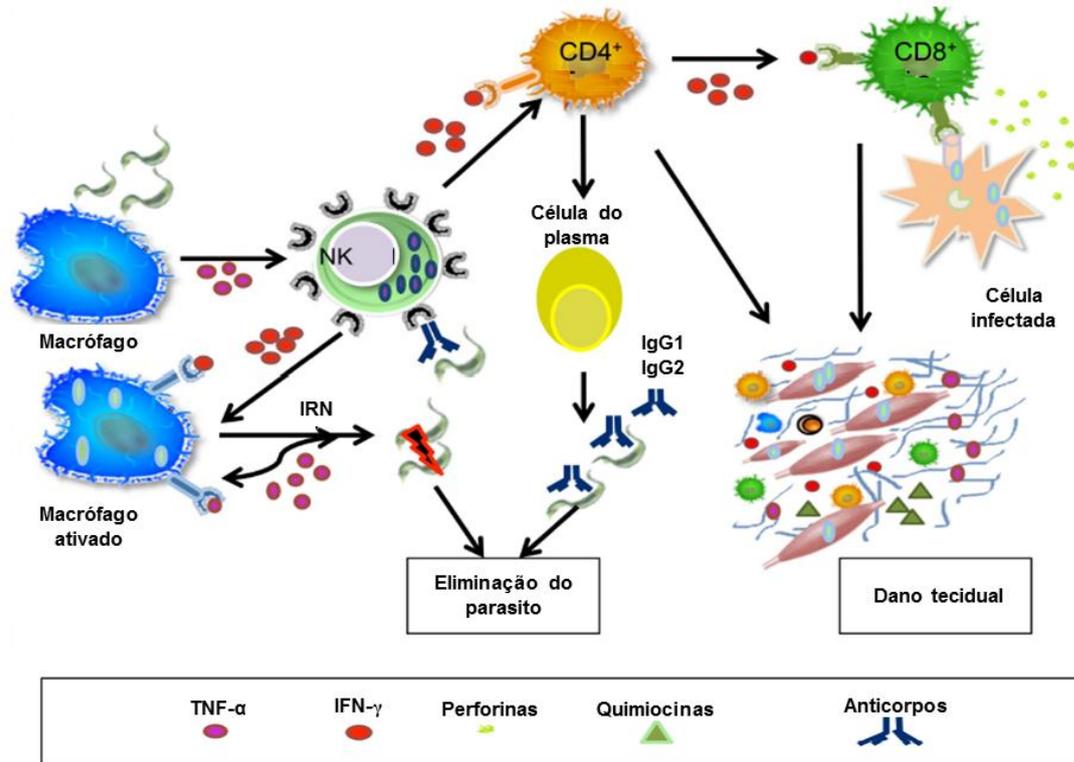


Figura 5. Resposta imunológica contra o *T. cruzi*. Antígenos do parasito induzem macrófagos a sintetizar IL-12, indutor de IFN- γ pelas células NK. Esta citocina inflamatória, juntamente com o TNF- α , provoca a ativação de macrófagos e o processo inflamatório, controlando a replicação do parasito. Intermediários reativos de nitrogênio derivados de macrófagos (IRN) estão diretamente associados ao controle do parasito. A diferenciação e expansão das células TCD4+ e CD8+ são induzidas pela IL-12 derivada de células dendríticas e células NK, desencadeando atividade citotóxica por células T CD8+ e mecanismos efetores em macrófagos. As células T efectoras CD4+ estimulam a proliferação das células B proliferação e produção de anticorpos. A fase aguda também é caracterizada pelo recrutamento de Células T para os tecidos, nas quais o IFN- γ desempenha um papel importante ao induzir a produção de quimiocinas. O processo inflamatório é crucial para a resistência do hospedeiro à infecção, mas também pode levar ao dano tecidual. (Imagem adaptada de (Andrade *et al.*, 2014).

Os macrófagos desempenham um papel central no combate ao parasito, apesar de representar seu local inicial de desenvolvimento (Basso, 2013; Acevedo *et al.*, 2018). Os macrófagos e os neutrófilos contribuem para a ação de diversas citocinas: produzem IL-12, fazendo com que as células NK secretem IFN- γ que, por sua vez, aumenta a produção da IL-12, TNF e óxido nítrico, cooperando para o processo de destruição do *T. cruzi*. Por outro lado, com o objetivo de regular esse processo inflamatório, há síntese de citocinas como IL-10 e IL-4 (induz expansão das células Th2 e de IL-10), buscando evitar os efeitos nocivos que o estímulo em demasia do sistema imunológico pode provocar. A IL-4 também tem papel no processo de estímulo ao TGF, responsável por controlar a atividade das células apresentadoras de antígenos (Basso, 2013; Cardillo *et al.*, 2015; Acevedo *et al.*, 2018).

As células dendríticas também são acionadas na presença dos antígenos, tal como ocorre com os macrófagos e neutrófilos. Sabe-se que as células dendríticas têm sua função influenciada por moléculas secretadas pelo *T. cruzi*, causando diminuição da produção de IL-12 e TNF e provocando alteração na sua capacidade de apresentar antígenos. Quando em contato com o parasito, as células dendríticas estimulam linfócitos Treg, causando maior inibição dos linfócitos TCD8+ (Zingales *et al.*, 2009; Ersching *et al.*, 2016).

As células NK têm como função principal a eliminação de agentes invasores intracelulares e participam do processo de diferenciação dos linfócitos TCD4 convencionais em células de memória (além de direcioná-los para um perfil Th1). Esses linfócitos têm dificuldade em migrar para o tecido com o processo infeccioso, sendo pouco úteis para eliminar os parasitos presentes nos tecidos. Quando há destruição das células NK, há redução da produção de IFN e início da produção de IL-10, aumentando a tolerância do sistema imune em relação ao *T. cruzi* (Cardillo *et al.*, 2015; Acevedo *et al.*, 2018).

Conforme a infecção persiste, a ação da imunidade adaptativa é estimulada por meio das respostas Th1, responsável pela produção de citocinas inflamatórias, e Th2, responsável pela ação anti-inflamatória e relacionadas à resposta imunológica mediada por anticorpos (Basso, 2013; Acevedo *et al.*, 2018).

Células apresentadoras de antígenos serão as responsáveis por estimular as células T efetoras. Na fase crônica da DC há níveis mais elevados de linfócitos T circulantes, liberando citocinas pró e anti-inflamatórias, o que evidencia seu papel chave no controle do processo inflamatório (Dutra e Gollob, 2008; Acevedo *et al.*, 2018). Os linfócitos TCD4+ liberam citocinas que estimulam ou inibem a ação de outras células como macrófagos, células dendríticas e outros linfócitos. Além disso, estão relacionados ao processo de seleção de linfócitos B específicos, estimulando a produção de anticorpos. Em modelo murino, há evidências de que uma resposta combinada entre os perfis Th1 e Th2 apresentam melhores resultados sendo o Th1 predominante no processo de controle e eliminação do *T. cruzi*. (Silva *et al.*, 1992; Petray *et al.*, 1993; Rodrigues *et al.*, 1999; Hoft e Eickhoff, 2005; Acevedo *et al.*, 2018). Durante o processo infeccioso, também ocorre alta produção de células TCD8+, que são direcionadas para os locais onde o parasito permanece e, portanto, seu papel está relacionado ao controle da carga parasitária nos tecidos. Acredita-se

que a persistência do parasito se deva ao não recrutamento dessas células, ou ainda, à inibição provocada por células TCD4+, TC25+ e TGF (Tzelepis *et al.*, 2007; Basso, 2013).

A ação de anticorpos também é indispensável para controle do processo infeccioso, sendo a deficiência de células B associada a níveis elevados de carga parasitária e diminuição da taxa de sobrevivência de modelos experimentais. Os linfócitos B apresentam resposta específica no final da fase aguda, produzindo anticorpos (Kumar e Tarleton, 1998; Bermejo *et al.*, 2010; Basso, 2013). Durante o estágio inicial da infecção pelo parasito, as células B têm ação crucial nos linfócitos T relacionados à resposta Th1, facilitando o controle do desenvolvimento do *T. cruzi*. Durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*, os linfócitos B controlam a resposta imunológica por meio da liberação de IL-10. A inibição dessa citocina facilita o controle da infecção, contudo, também eleva o processo inflamatório crônico no tecido cardíaco (Cardillo *et al.*, 2007)

Estudo realizado em modelos experimentais demonstrou elevação dos níveis de imunoglobulina IgM, se mantendo ao decorrer da infecção. Também houve aumento significativo de IgG, com uma correlação positiva entre o aumento desse anticorpo e maior intensidade das lesões tissulares (Andrade *et al.*, 1985).

1.5. Patogênese da doença de Chagas

A infecção chagásica pode evoluir de formas diferentes dependendo das circunstâncias envolvidas. A relação parasito-hospedeiro é muito dinâmica e apresenta muitos fatores que dizem respeito ao *T. cruzi* (cepa, virulência e inoculação), ao hospedeiro humano (idade, gênero e perfil genético) e ao ambiente (Marcon *et al.*, 2011).

A determinação da patogênese da DC ainda é uma questão em aberto. Alguns autores creditam ao *T. cruzi* toda a responsabilidade pelo aparecimento dos sintomas, pois este causaria ruptura celular e conseqüente lesão do tecido (Tarleton e Zhang, 1999; Gutierrez *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2016). Entretanto, destruição tecidual na ausência do parasito e na presença de células inflamatórias é o cenário mais comum encontrado em pacientes chagásicos crônicos, o que reflete a participação de respostas autoimunes na patogênese da DC. Apesar de distintas,

tais teorias não são excludentes. A seguir, será feito um detalhamento das principais teorias que visam explicar a origem das manifestações clínicas da DC que estão ilustradas na Figura 6.

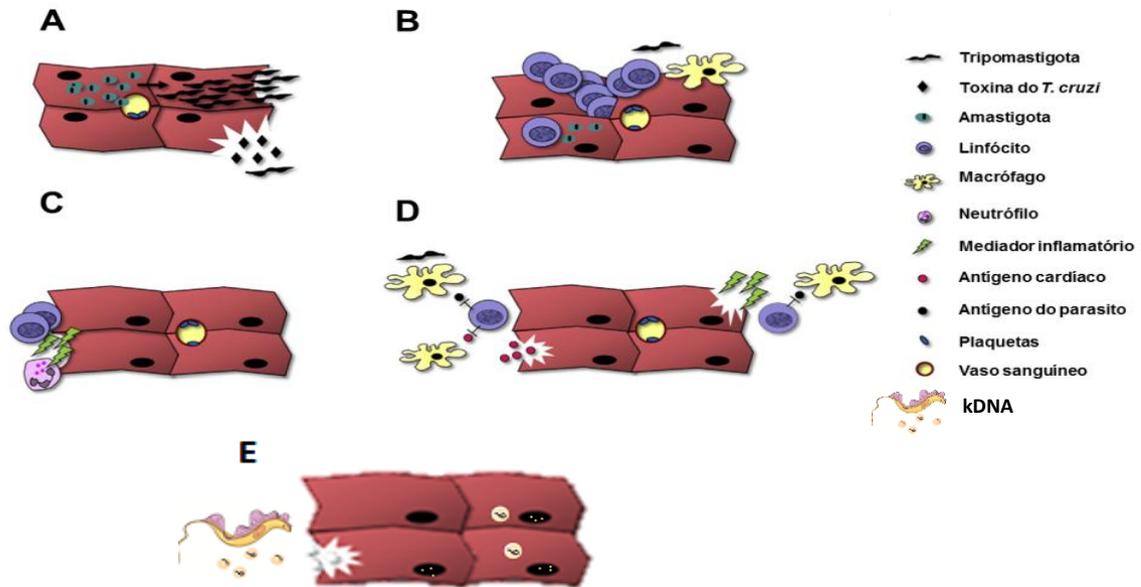


Figura 6. Mecanismos de patogênese da DC. **A)** Danos diretos pela ação do parasito: lise celular por diferenciação de amastigotas em tripomastigotas (parte superior da imagem); ou lesão por provável produto tóxico (lítico) de tripomastigotas (parte inferior da imagem). **B)** Imunidade específica contra os parasitos: pode contribuir para cardiopatia devido à destruição e deslocamento de miócitos, seguido por infiltração mononuclear e fibrose. **C)** Resposta não específica: danos causados pela Imunidade Inata; ativação de granulócitos e citotoxicidade mediada por anticorpos podem causar lesão dos cardiomiócitos; relação com ativação bystander. **D)** Autoimunidade induzida por parasitos gerada por mimetismo molecular entre parasito e autoantígenos (parte à esquerda da imagem) ou ativação de células T autorreativas após a lise celular por *T. cruzi* (à direita da imagem); **E)** Transferência de minicírculos de kDNA para o genoma da célula hospedeira (Imagem adaptada de Bonney e Engman, 2015).

1.5.1. Persistência do parasito

A persistência do parasito é uma das hipóteses relacionadas ao processo de inflamação crônica e consequente lesão tecidual observados em indivíduos infectados com o *T. cruzi*, sendo considerada, por alguns pesquisadores, como a principal explicação para a patogênese da DC (Teixeira *et al.*, 2011; Guimaro *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2016). De fato, é inquestionável que a lise da célula hospedeira pelo *T. cruzi* tenha participação no dano cardíaco observado em alguns indivíduos (Bonney e Engman, 2015). A presença constante do parasito nos tecidos provocaria a infiltração de leucócitos que também são capazes de lesar o miocárdio.

Essa hipótese tem sustentação na detecção do parasito nos tecidos de pacientes que se encontram na fase crônica da doença, fato que ficou melhor caracterizado nos últimos anos com o uso de metodologias avançadas de biologia molecular, como a PCR quantitativa (qPCR) (Marcon *et al.*, 2011). Ademais, o uso de sistemas de imagem de bioluminescência altamente sensíveis que detectam o *T. cruzi* expressando luciferase permitiu o acompanhamento prolongado da infecção *in vivo*, em murinos, e trouxeram novas informações sobre a distribuição tecidual do parasito (Lewis *et al.*, 2014; Silberstein *et al.*, 2018). Interessantemente, verificou-se que durante as infecções crônicas em camundongos a circulação do *T. cruzi* pelo organismo é bastante dinâmica e não se localiza no coração, mas sim, no trato gastrointestinal, especificamente no cólon e no estômago. Ainda assim, esses animais desenvolveram miocardite e fibrose cardíaca. A partir desses achados, uma nova proposta sobre a persistência do parasito foi elaborada, sugerindo que o intestino atuaria como reservatório para o *T. cruzi* e que ocorreriam migrações eventuais para o miocárdio. Igualmente, alguns estudos demonstraram que o tecido adiposo seria um nicho permissivo para a permanência do *T. cruzi* na fase crônica da infecção, contribuindo na patogênese da DC (Nagajyothi *et al.*, 2014; Tanowitz *et al.*, 2017). A esses achados, soma-se a descoberta de que formas amastigotas podem permanecer em estado de dormência por um período prolongado e, posteriormente, se transformarem em tripomastigotas ativas (Sánchez-Valdéz *et al.*, 2018).

Outro mecanismo pelo qual esses parasitos podem induzir dano no miocárdio é por estresse oxidativo. Sabe-se que animais experimentais e humanos infectados por *T. cruzi* podem apresentar disfunção mitocondrial, com aumento da formação de superóxido e espécies reativas de oxigênio (ROS) no coração (Dhiman *et al.*, 2013), podendo levar à apoptose de cardiomiócitos. A desregulação de microRNA's cardíacos pelo *T. cruzi* também já foi verificada, sendo provável que alguns deles estejam envolvidos na patogênese da doença (Navarro *et al.*, 2015).

1.5.2. Autoimunidade

Um aspecto bastante intrigante em relação à DC refere-se à diminuição da quantidade de parasitos na fase crônica da infecção, justamente no período em que

se observam as principais manifestações clínicas da doença. Soma-se a isso o fato de que drogas contra o parasito, que são efetivas no combate às formas sanguíneas do protozoário, mas não trazem efeitos benéficos significativos quando usadas na fase crônica, não resultando na interrupção das lesões detectadas pelo eletrocardiograma e nem o desaparecimento dos demais sintomas da doença (Morillo *et al.*, 2015).

Tais aspectos impulsionaram o surgimento de outra hipótese para explicar a patogênese da DC – a autoimunidade (Teixeira, *et al.*, 2011; Guimaro *et al.*, 2014). A autoimunidade ocorre quando há quebra da tolerância imunológica no processo de reconhecimento do que é próprio e do que não é próprio do organismo. Essa quebra estimula vários eventos pró-inflamatórios que ocasionam sérios danos aos tecidos-alvo, gerando comprometimento grave e até perda da função. Esse descontrole da resposta imunológica causa um processo inflamatório crônico (La Cava, 2011; Guimaro *et al.*, 2014).

A hipótese da autoimunidade na DC surgiu na década de 1970, quando Santos-Buch e Teixeira (1974) demonstraram a completa destruição de fibras do coração de fetos de coelhos por linfócitos provenientes do sangue periférico de coelhos chagásicos crônicos, enquanto que os linfócitos dos animais controles não atacavam as células do coração. A partir de então, diversos estudos experimentais demonstraram a existência de fenômenos autorreativos de natureza celular e humoral em indivíduos que apresentavam a infecção. Porém, apontar a influência no processo fisiopatológico desta autorreatividade tem sido uma tarefa difícil, assim como ocorre em outras doenças autoimunes desencadeadas por processos infecciosos. (Gutierrez *et al.*, 2009).

A seguir, serão detalhadas as principais teorias que visam explicar a autoimunidade na DC.

1.5.2.1. Mimetismo molecular

O mimetismo molecular corresponde às respostas antígeno-específicas de células B e T próprias que são iniciadas na presença do patógeno, em decorrência de uma reação cruzada entre epítomos do *T. cruzi* e da célula-alvo (Abel, *et al.*,

1997; Leon e Engman, 2001; Bonney e Engman, 2015). Por exemplo, a proteína flagelar de tripomastigotas (FL-160) possui dois epítomos distintos que mimetizam epítomos encontrados em tecidos nervosos (Van Voorhis, *et al.*, 1993). A proteína ribossomal L27 de *T. cruzi* também apresenta grande similaridade a proteínas ribossomais de diferentes espécies, incluindo a de *Homo sapiens*. Autoanticorpos contra uma glicoproteína de 43 a 45 kDa encontrada no tecido muscular cardíaco e esquelético normal estão presentes em pacientes com DC (McCormick e Rowland, 1993). Reconhecimento específico de anticorpos contra a miosina cardíaca foi observada em camundongos inoculados com extrato de *T. cruzi* (Leon e Engman, 2001). Além disso, moléculas específicas do *T. cruzi* foram identificadas como sendo responsáveis pelo surgimento da resposta, como o antígeno B13 (Abel *et al.*, 2005) e a cruzipaina (Aoki *et al.*, 2004).

Fato que se contrapõem a tais achados é que imunizações de camundongos com parasitos mortos por aquecimento não foram capazes de produzir dano cardíaco com a mesma intensidade do ocasionado pelo parasito vivo (Bonney *et al.*, 2011). Diferentemente dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*, os camundongos inoculados com o parasito morto por aquecimento não apresentaram depósito significativo de anticorpos no miocárdio, indicando que a reação cruzada não é determinante para o dano cardíaco (Bonney *et al.*, 2013).

1.5.2.2. Ativação *bystander*

A segunda teoria de autoimunidade, conhecida como ativação *bystander*, propõe que antígenos expostos de maneira continuada no tecido danificado estimulariam linfócitos a se tornarem autorreativos. Assim, o dano mecânico causado diretamente pelo *T. cruzi* associado a respostas imunes específicas e não específicas ao parasito resultariam na liberação de grandes quantidades de autoantígenos em um ambiente extremamente rico em mediadores inflamatórios. Citocinas, como TNF e quimiocinas ativariam células T autorreativas, as quais passariam a se multiplicar intensamente. Ademais, o processo inflamatório também pode modificar os padrões de migração de linfócitos e ativar células apresentadoras de antígenos (Girones *et al.*, 2005).

Um fator questionável desta teoria refere-se ao fato que é na fase aguda da DC que se verifica a liberação de altos níveis de proteínas próprias devido à ruptura das células pelas formas parasitárias, contrastando com a ausência de sintomas na maioria dos pacientes (Kierszenbaum, 1999). Alguns autores argumentam que a presença dessa grande quantidade de parasitos durante a fase aguda da infecção poderia ser a responsável por gerar um quadro exacerbado da resposta imunológica no miocárdio, o que poderia ocasionar danos no tecido nos estágios mais avançados da patologia (Gutierrez *et al.*, 2009).

1.4.2.3. Integração do kDNA

Estudo realizado por Nitz, *et al.* (2004) demonstrou a transferência de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* para o genoma de coelhos e galinhas. Na maioria dos casos, os segmentos de minicírculos estavam associados a retrotransposons de sequências repetitivas longas do tipo LINE-1 (L1), ou seus equivalentes, e distribuídos em diferentes cromossomos. Análises de bioinformática mostraram que o kDNA do parasito e o DNA do hospedeiro compartilham sequências ricas em Adenina/Citosina no local da integração, sugerindo que a integração dos minicírculos do *T. cruzi* é mediada por microhomologia, uma das estratégias utilizadas no reparo de DNA (Nitz, *et al.*, 2004). A esse respeito, sabe-se que o DNA exógeno, e em particular o DNA mitocondrial e elementos móveis, podem desempenhar um papel na reparação do DNA nuclear, restaurando a integridade do genoma.

A transferência horizontal de kDNA de *T. cruzi* tem sido associada às respostas autoimunes observadas na DC crônica (Hecht *et al.*, 2010). Tal inserção no genoma da célula hospedeira poderia resultar no surgimento de novas proteínas (quimeras), na alteração da expressão de genes já existentes ou, até mesmo, no silenciamento desses genes (Lee *et al.*, 2006; Simões-Barbosa *et al.*, 2006; Okubo *et al.*, 2007). Entretanto, a real contribuição da integração do kDNA para a patogênese da DC ainda não foi elucidada. Assim, para uma melhor compreensão desse fenômeno, foi utilizado um modelo refratário de galinhas que receberam o *T. cruzi* ainda durante o período embrionário. As aves nascidas dos ovos experimentalmente infectados retiveram os minicírculos de kDNA em seus genomas e desenvolveram cardiopatia similar à chagásica, na ausência de parasitos (Nitz *et*

al., 2004; Teixeira *et al.*, 2011). Isso respalda a ideia de que a integração do kDNA está associada à miocardiopatia da DC.

Entretanto, para tentar associar as mutações com as manifestações clínicas da DC foi realizado um estudo de mapeamento dos sítios de integração do kDNA (Guimarães, 2014). Contudo, não foi possível demonstrar uma relação direta entre a presença de integrações de minicírculos de kDNA em determinados *loci* e o desenvolvimento dos sintomas. Desta forma, é possível que o acúmulo de mutações ao longo de décadas é que esteja relacionado com o aparecimento das síndromes dos “megas”.

2. JUSTIFICATIVA

A DC representa um sério problema de saúde pública, principalmente na América Latina, gerando grande ônus econômico para esses países. Estima-se que cerca de oito milhões de pessoas estejam infectadas por *T.cruzi*, das quais um terço deverá apresentar as manifestações clínicas da doença, sendo algumas incapacitantes. Lamentavelmente, as drogas tripanocidas disponíveis não produzem resultados benéficos em pacientes na fase crônica. A dificuldade em se desenvolver drogas ou vacinas eficientes para o tratamento da DC está relacionada com o desafio de estabelecer quais fatores são determinantes para o surgimento dos sintomas.

Assim, na ausência de dados que determinem com certeza o fator desencadeador da DC, é de extrema importância explorar a questão da patogênese dessa doença, enfatizando a associação de múltiplos fatores envolvidos nesse processo. É imprescindível verificar se a ação conjunta de diversos fatores tem maior ou menor influência no grau de lesão tecidual, com conseqüente agravo do quadro do paciente. Identificar tais fatores poderá ajudar no processo de elaboração de novas estratégias para o tratamento.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi verificar a contribuição de múltiplos fatores no processo de patogênese da DC em modelo experimental. Já os objetivos específicos foram:

- Determinar se o sexo é fator predisponente para o surgimento das lesões cardíacas e do intestino;
- Avaliar a influência de cepas de diferentes DTUs no processo de patogênese da doença de Chagas;
- Verificar se a carga parasitária, de diferentes tecidos, é determinante para a evolução da doença;
- Determinar se o acúmulo de integrações de kDNA em diferentes tecidos está associado ao surgimento de lesões no tecido cardíaco e intestinal;
- Verificar se a produção de anticorpos anti-*T. cruzi* e de autoanticorpos contribuem para o avanço da doença;
- Avaliar a influência da produção de citocinas no processo de patogênese da doença de Chagas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Grupo Experimental e infecção dos animais

Foram utilizados 70 camundongos BALB/c, uniformes quanto ao peso e idade, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da UnB. Os animais foram mantidos com ciclo de iluminação (12h dia/12h noite) à temperatura ambiente e com livre acesso a ração e água. A infecção dos animais se deu por via intraperitoneal, com $1,0 \times 10^4$ de formas tripomastigotas de *T. cruzi* das linhagens Colombiana, Y e CL Brener. Essa quantificação foi realizada por meio da câmara de Neubauer. Antes de utilizar as cepas para infectar os animais, foram realizadas duas passagens em camundongos também BALB/c a fim de gerar maior ativação do parasito. A cepa Colombiana, isolada de um humano na Colômbia, está classificada como DTU I (TcI), grupo onde as cepas do ciclo silvestre estão inseridas. A cepa CL Brener, isolada de *Triatoma infestans*, está classificada como DTU VI (TcVI). Já a cepa Y, isolada de um humano no Brasil, está classificada como DTU II (TcII), que agrupa cepas que apresentam ciclo doméstico (Zingales *et al.*, 2009).

Os animais foram eutanasiados com 30 e 100 dias pós-infecção (dpi), representando as fases aguda e crônica da doença, respectivamente. Assim, os camundongos foram subdivididos nos seguintes grupos:

Tabela 1: Organização dos grupos experimentais de acordo com o sexo, cepa infectante e momento da eutanásia.

Grupo	Nº de animais	Sexo	Cepa	Eutanásia (dpi)
A	5	Macho	Colombiana	30
B	5	Fêmea	Colombiana	30
C	5	Macho	Colombiana	100
D	5	Fêmea	Colombiana	100
E	5	Macho	Y	30
F	5	Fêmea	Y	30
G	5	Macho	Y	100
H	5	Fêmea	Y	100
I	5	Macho	CI Brener	30
J	5	Fêmea	CI Brener	30
K	5	Macho	CI Brener	100
L	5	Fêmea	CI Brener	100
M	5	Macho	Não infectados	*
N	5	Fêmea	Não infectados	*

* A eutanásia dos animais não infectados ocorreu a 60 dias de vida.

A utilização dos animais nesta pesquisa está devidamente autorizada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, com o número de Protocolo 150406/2015.

4.2. Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* das cepas Colombiana, CI Brener e Y foram mantidas em cultura de células cardíacas murinas da linhagem L6, cultivadas com Meio Mínimo Essencial (DMEM), pH 7,2 acrescido de Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina sob atmosfera de dióxido de carbono (CO₂) a 5% e à temperatura de 37°C.

As formas amastigotas foram obtidas a partir de cultura de tripomastigotas de *T. cruzi* Colombiana, CI Brener e Cepa Y após 24 horas em meio de cultura, sendo considerados apenas os pools que apresentaram, no mínimo, 90% dos parasitos na

forma amastigota. O meio contendo tripomastigota foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos e ressuspensão em DMEM, pH 5,0. Os tripomastigotas foram incubados por 5 horas, em estufa a 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos e ressuspensas em meio DMEM completo, pH 7,4 suplementado com 5% de SFB e incubadas *overnight* em estufa a 37°C com atmosfera úmida com 5% de CO₂. Em seguida, foram contados $1,0 \times 10^7$ amastigotas para extração de DNA, com o objetivo de realizar os *pools*. Todas as centrifugações foram realizadas por meio da centrífuga em Centrífuga IEC CL31R Multispeed (Thermo Scientific®).

4.3. Avaliação da Infecção

Após sete dias de infecção, a presença de tripomastigotas no sangue foi verificada: uma gota de sangue da cauda de cada camundongo foi depositada em uma lâmina com 15µL de anticoagulante (citrato), homogeneizada e coberta por uma lamínula. Em seguida, foi realizada observação em microscópio Olympus BX51, modelo U-LH100HG (Olympus®), com uma objetiva de 40X. Caso não houvesse confirmação da parasitemia no sétimo dia, esse procedimento era repetido diariamente até confirmação da presença do parasito.

4.4. Coleta de amostras, obtenção de soro e extração de DNA

Após os intervalos de tempo estabelecidos, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Forane®) para coleta do sangue dos diferentes grupos experimentais, por via intracardíaca. A coleta foi realizada imediatamente antes da eutanásia. Um volume de 400 µL foi coletado. Destes, 200 µL foram colocados em tubo de microcentrífuga com 20 µL de anticoagulante (citrato) para extração de DNA e 200 µL foram utilizadas para obtenção do soro sanguíneo. Para isso, as amostras de sangue foram levadas para o banho-maria a 37°C por 30 minutos e, logo após, centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos.

Em seguida, foi realizada incisão ventral para coleta do coração e intestino e, posteriormente, coleta da medula óssea femoral. Uma parte do coração e do intestino foi utilizada para extração de DNA e a outra parte foi colocada em formol tamponado a 10% para posteriores estudos histopatológicos. A medula óssea foi

usada apenas para extração de DNA. O isolamento do DNA foi realizado com o kit de extração Mini Spin Plus (Biopur®), conforme recomendações do fabricante. Após esse procedimento foi feita a quantificação da concentração de DNA por meio de espectrofotometria, com o NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Science, UK). É importante destacar que também foram isolados o DNA das diferentes cepas usadas nesse estudo.

4.5. PCR quantitativa

Com o objetivo de determinar a carga parasitária e o acúmulo de integrações de minicírculos de kDNA no genoma dos camundongos, realizou-se a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) com *primers* específicos para o DNA nuclear (nDNA) e mitocondrial (kDNA) do parasito. Antes de realizar a qPCR, foi verificada a integridade do DNA de todas as amostras por meio da PCR convencional, em gel de agarose, utilizando o gene constitutivo de β -actina (Santana, 2015).

A qPCR foi realizada de acordo com o protocolo padronizado em trabalho realizado previamente em nosso laboratório (Moraes, 2016). O DNA extraído foi submetido à qPCR de DNA nuclear com os iniciadores TcZ3 (5' TGC ACT CGG CTG ATC GTT T 3') e TcZ 4 (5'-ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA 3'), gerando um produto de aproximadamente 168 pares de bases (Ndao *et al.*, 2000). Esse DNA satélite (correspondendo à, aproximadamente, 9% do DNA nuclear) é encontrado no cromossomo e é um relevante marcador genético para diferenciar as espécies do gênero *Trypanosoma* e distinguir cepas e clones do *T. cruzi* (Oliveira *et al.*, 1999).

Como molde para a qPCR foi usado 1 μ L de DNA (100 ng), 0,2 μ M de cada iniciador, 10 μ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20 μ L. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), em duplicata, no termociclador 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA), com as seguintes condições de desnaturação, anelamento e extensão: 95°C por 15", 57°C por 60", 72°C por 10" durante 40 ciclos. Para a quantificação dos minicírculos de kDNA, foram utilizados os iniciadores S36 (5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT G3') e S67rev (5'GAA CCC CCC TCC CAA AAC C3'), gerando um produto de cerca de 250 pares

de bases. As demais condições da reação foram as mesmas da qPCR de nDNA, excetuando-se as condições de anelamento, que foi de 60°C por 45”.

Para a quantificação absoluta do DNA do parasito nas amostras é necessário a geração de curva padrão. Estas foram construídas a partir de diluições seriadas de DNA do parasito (de 10^7 a 10^0 parasitos). A curva padrão de nDNA apresentou eficiência de 95,6%, $R^2=0,994$ e slope de -3,43 (Figura 7A), enquanto a de kDNA apresentou eficiência de 95,9%, $R^2=0,984$ e slope de -3,42 (Figura 7B).

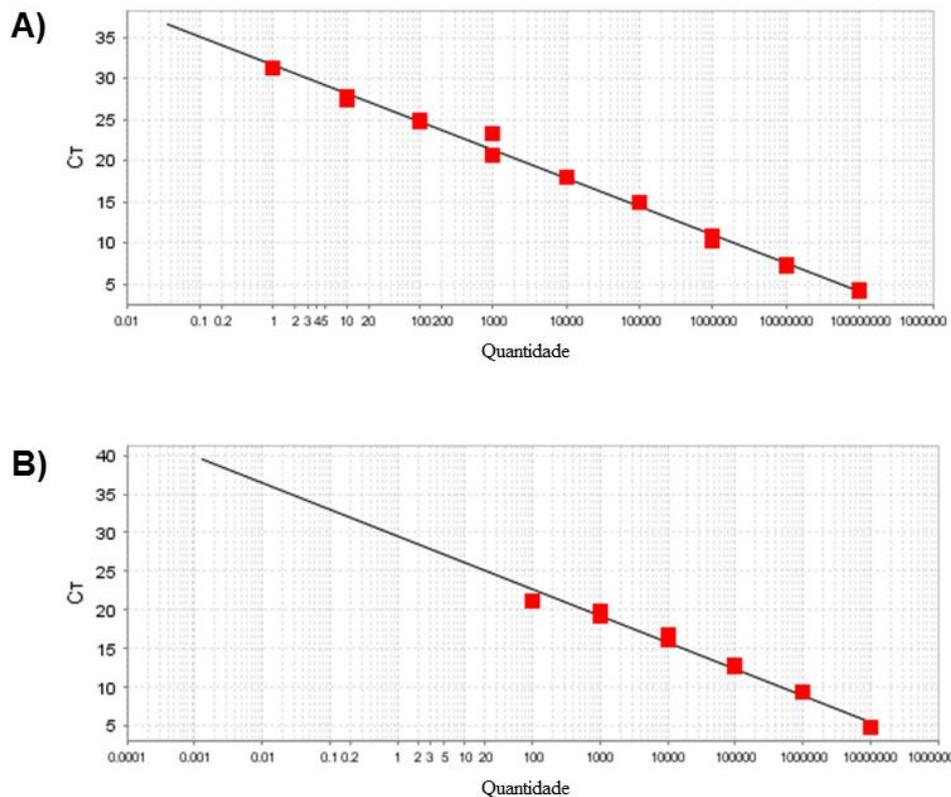


Figura 7. Curva padrão para quantificação absoluta do *Trypanosoma cruzi* e determinação das integrações de minicírculos de kDNA. A) Amplificação do DNA nuclear do parasito. B) Amplificação de minicírculos de kDNA do parasito. As amostras foram diluídas de maneira seriada (10^7 a 10^0 parasitos equivalentes/100 ng de DNA). CT: limite do ciclo de temperatura em °C.

Para verificar o acúmulo de integrações de kDNA do parasito nas diversas amostras, foi determinada a proporção de kDNA e nDNA encontrada em cada uma das cepas do *T. cruzi* utilizadas nesse estudo (5 pools para cada cepa). Cada pool apresentava uma concentração inicial de $1,0 \times 10^7$ parasitos. Dessa forma, após realizar a quantificação do kDNA e nDNA desses pools por qPCR, foi estabelecida a razão kDNA/nDNA. Para estabelecer o ponto de corte para cada cepa, foi realizado o cálculo das médias dos 5 pools de cada uma, sendo considerado como ponto de

corde os valores máximos de cada grupo de cepa. Dessa forma, considerou-se que amostras com valores superiores ao ponto de corte determinado apresentariam integração.

Na Figura 8, podemos verificar a média e desvio padrão estabelecido para cada linhagem: Colombiana ($0,49 \pm 0,15$), CL Brener ($0,72 \pm 0,37$) e Y ($0,50 \pm 0,46$). Considerou-se que havia integração quando o valor da razão kDNA/nDNA era superior ao valor máximo obtido para cada pool. Colombiana (0,69), CL Brener (0,94) e Y (0,91).

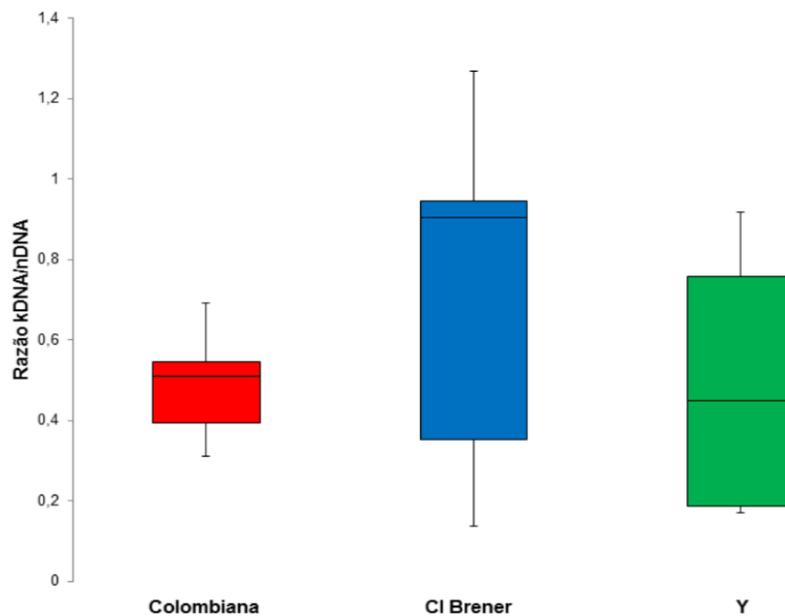


Figura 8. Determinação da razão kDNA/nDNA em pools de amastigota *Trypanosoma cruzi*. A proporção de DNA mitocondrial (kDNA) e DNA nuclear (nDNA) das linhagens Colombiana, CL Brener e Y de *T. cruzi* foi determinada mediante amplificação das sequências-alvo por qPCR. Valores superiores à razão máxima obtida para cada cepa representa o ponto de corte a partir do qual se considerou que ocorreu integração dos minicírculos de kDNA. O gráfico refere-se à mediana dos pools de cada cepa.

4.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto

Para verificar a taxa de produção de anticorpos anti-*T. cruzi*, anti-proteínas cardíacas e anti-proteínas intestinais nas fases aguda e crônica, as amostras de soro de todos os grupos foram submetidas à técnica de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA). Para isso foram centrifugados 200 μ L das formas epimastigotas de *T. cruzi* (4.500 rpm por 10 minutos), lavados por três vezes com

PBS 1X pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline, 58,44M NaCl; 74,55M KCl; 136,09M KH_2PO_4 ; 141,96M Na_2HPO_4) e ressuspendidos em 3 mL de água Milli-Q. As células foram lisadas por congelamento (-20°C) e descongelamento (temperatura ambiente) por três ciclos e centrifugadas novamente (14.000 rpm, por 10 minutos). Após esse procedimento foi feita a quantificação da concentração proteica do antígeno por meio de espectrofotometria, com o NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Science, UK).

As placas foram sensibilizadas com 50 μL por poço com o antígeno solubilizado em tampão PBS 1X pH 7,4 e incubadas *overnight* na câmara úmida, a 37°C . Para retirar o excesso de antígeno, as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS com 0,05% de Polissorbato 20) e, posteriormente, foram acrescentados 150 μL de PBS- Leite 1X (pH 7,4, com 5% de leite desnatado) para bloquear a adesão das proteínas nos sítios de ligação de forma inespecífica. Então, foram incubadas novamente por 1 hora à temperatura ambiente e lavadas com PBS-Tween por três vezes.

Para incubar o 1º anticorpo, os soros foram diluídos na razão 1:100 em PBS-Leite 1X (pH 7,4, com 2% de leite desnatado) e adicionamos 50 μL /poço, em triplicata. Seguiu-se com a incubação por 2 horas a 37°C , em câmara úmida. O excesso foi descartado e a lavagem foi feita com PBS-Tween por três vezes. Incubou-se o anticorpo secundário, que foi diluído 1:1000 em PBS-Leite 1X (pH 7,4, com 2% de leite desnatado), adicionando 50 μL /poço, seguindo com a incubação na câmara úmida nas mesmas condições usadas para o 1º anticorpo. Para a revelação da reação, adicionou-se 50 μL /poço da solução reveladora, aguardando 12 minutos, na ausência de luz. A leitura foi realizada a 405 nm no espectrofotômetro (*BioTek®-Synergy HT*). Foram usados os anticorpos secundários Anti-Mouse IgG (Sigma-Aldrich®) conjugado a enzima fosfatase alcalina diluído 1:2000 em PBS/leite desnatado 2% e o Anti-Mouse IgM (Sigma-Aldrich®) marcado com fosfatase alcalina diluído 1:1000 em PBS/leite. Para a solução reveladora, usou-se o cromógeno pnPP (p-nitrofenol fosfato), diluído em Tampão de Dietanolamina pH 9,8 ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$, MgCl_2). Para realizar ELISA dos autoanticorpos foi utilizado o mesmo protocolo.

O estabelecimento do ponto de corte das amostras foi feito por meio da fórmula $[(\bar{X}_{\text{CN}} \times 2) - \bar{X}_{\text{B}}]$ (Nybo, 2010), sendo o \bar{X}_{CN} e \bar{X}_{B} a média dos controles negativos e do branco, respectivamente. A partir do valor do ponto de corte, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma densidade óptica (DO)

10% acima desse valor e negativas, aquelas com DO 10% abaixo do ponto de corte. O cálculo foi feito para cada antígeno (*T. cruzi*, coração e intestino) da fase aguda e crônica.

4.7. Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

Foi realizada a dosagem de interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- γ (IFN- γ) com o kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Bioscience), respeitando as recomendações do fabricante. Inicialmente, adicionou-se 25 μ L dos soros dos camundongos em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL devidamente identificados. Além dos soros, também foram adicionados os controles da reação que foram preparados por meio de diluição seriada a partir do *Top Standard*, incluído no kit. Em sequência, também foram adicionados 25 μ L de *capture beads* e 25 μ L de *Mouse Th1/Th2 PE Reaction Reagent*. Os tubos foram incubados por três horas à temperatura ambiente em local sem exposição à luz. Após o período de incubação, adicionou-se 500 μ L de *Wash Buffer* em cada tubo e centrifugou-se a 200 x g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se mais 250 μ L de *Wash Buffer* em cada tubo, ressuspendendo o precipitado. Duzentos microlitros do conteúdo total dos tubos foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em citômetro BD LSRFortessa™.

4.8. Análise histológica

Para avaliar a presença de ninhos de amastigotas e alteração tecidual foram realizados exames histológicos, seguindo procedimento técnico já estabelecido em estudo prévio de nosso laboratório (Ribeiro *et al.*, 2016). Brevemente, foram coletadas amostras de tecido cardíaco e intestinal dos animais dos diferentes grupos experimentais. O tecido passou por um processo de desidratação com banhos sucessivos em soluções com teor crescente de álcool (etanol 70%, 80%, 90%, 100%), seguido por processo de diafanização em xilol e a parafinização. Dos blocos de parafina, foram obtidos três cortes de 5 μ m cada de diferentes partes de cada tecido, fixados nas lâminas que foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Após a montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus

BX51, modelo U-LH100HG (Olympus®), na objetiva de 40X ou 100X. Para registrar as imagens das lâminas foi utilizado o digitalizador ScanScope® (Aperio).

No total, foram avaliados 15 campos de cada lâmina. As alterações encontradas foram classificadas a partir de adaptações dos critérios utilizados por Castro-Sesquen *et al.* (2011) (Tabela 2).

Tabela 2: Critérios utilizados para a avaliação das alterações histológicas identificadas no tecido cardíaco e intestinal dos animais dos diversos grupos experimentais.

Amostras	ANÁLISE HISTOLÓGICA							
	Parasitismo ¹				Intensidade do Processo inflamatório ²			
	0	1	2	3	0 - 0,3	0,4 - 1	1,1 - 2	2,1 - 3

LEGENDA

1) 0=ausente; 1=basal (1-5 ninhos amastigotas); 2= moderado (6-10 ninhos); 3= severo (> 10 ninhos).

2) 0 a 0,3=normal; 0,4 a 1,0=leve; 1,1 a 2=moderado; 2,1 a 3=severo. Valores referem-se à média do grau de intensidade visto nos 15 campos analisados.

4.9. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado seguiu um modelo inteiramente casualizado em esquema fatorial com 16 tratamentos referentes às combinações dos fatores: fase (aguda e crônica), cepa (não infectados, Colombiana, CI Brener e Y) e sexo (macho e fêmea). Foram utilizadas 5 repetições por tratamento. As variáveis dependentes foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Variáveis cuja distribuição apresentou-se não-normal foram submetidas a procedimento de transformação logarítmica ou radicial e aquelas cuja transformação não surtiu efeito de normalização sobre a distribuição foram analisadas pelo procedimento PROC GLIMMIX, que permite testar a interação de fatores com dados não-paramétricos.

As variáveis que apresentaram distribuição normal foram submetidas à análise de variância pelo procedimento PROC GLM com posterior comparação de médias pelo teste de Tukey em 5% de significância. As variáveis qualitativas (integração de kDNA, produção de resposta imunitária humoral – IgG e IgM anti-*T. cruzi*, anti-proteínas cardíacas e intestinais, além de presença ou ausência de nDNA de *T. cruzi* no coração, intestino e medula) foram submetidas ao teste Qui-quadrado

(PROC FREQ) para averiguar se houve diferença na frequência dos resultados em virtude do sexo, cepa e fase. Análise de Correlação de Pearson (PROC CORR) foi realizada com os dados quantitativos para averiguar as relações entre as respostas das variáveis medidas. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SAS® (versão 9.3, Cary, North Carolina).

5. RESULTADOS

5.1. Quantificação de carga parasitária e da integração de kDNA

A presença do parasito foi confirmada no coração e intestino de todos os animais durante a fase aguda da DC, independentemente da cepa infectante. Entretanto, ao se usar o DNA extraído da medula óssea como molde, não foi possível amplificar o DNA do parasito em 40% dos camundongos infectados com a cepa Colombiana, 10% dos animais infectados com CL Brener e 30% dos infectados com a cepa Y (Figura 9A).

Já na fase crônica da infecção (Figura 9B), a distribuição dos parasitos entre os diferentes tecidos apresentou maior variação de acordo com a cepa infectante. Por exemplo, ao se avaliar animais infectados com a cepa Colombiana, observou-se uma positividade de 90% para coração e intestino e de 60% para medula óssea. Já para a cepa CL Brener, 100% dos animais foram positivos ao se avaliar o intestino e medula óssea e 60% foram positivos para o coração. Em relação à cepa Y, 100% dos animais foram positivos ao se avaliar o tecido cardíaco, 70% ao se avaliar o tecido intestinal e 90%, a medula óssea.

Apesar dessas diferenças na porcentagem de animais que apresentaram qPCR positiva, a análise dos dados em conjunto (fase aguda e crônica) só verificou significância estatística ao se comparar a medula óssea de animais infectados com as cepas Colombiana (60%) e CL Brener (75%) ($p=0,008$).

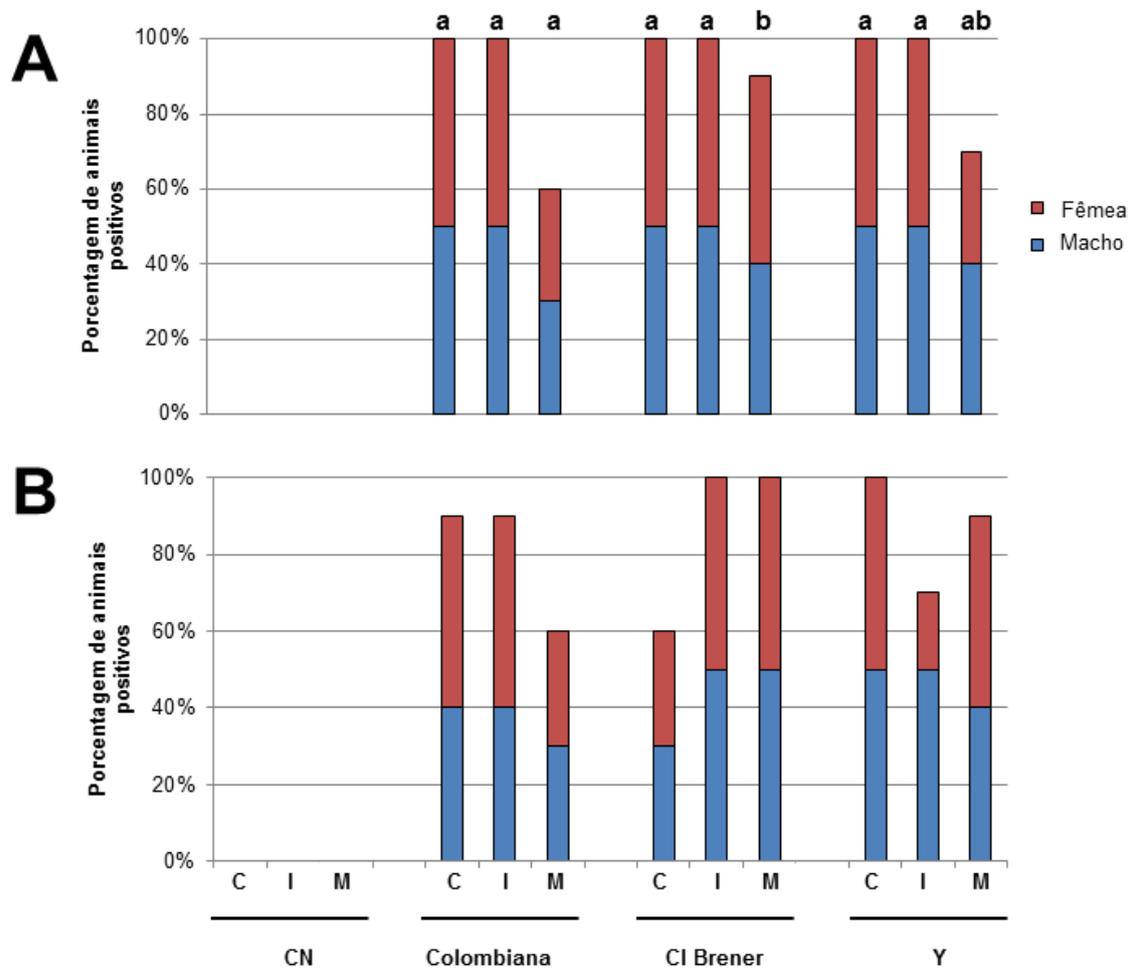


Figura 9. Detecção do DNA nuclear do *Trypanosoma cruzi* em tecidos de camundongos infectados com diferentes cepas do parasito. As barras representam a porcentagem de animais em que foi possível se amplificar o DNA do parasito. **A)** Fase aguda; **B)** Fase crônica. Azul=machos; Vermelho=fêmeas. CN: controle negativo; C = coração; I = intestino; M = medula. Considerando a porcentagem total (fase aguda e crônica) de animais com carga parasitária positiva, as letras diferentes (a,b) acima das barras dos mesmos tecidos diferem significativamente: **Medula** - Colombiana X CI Brener $p=0,008$.

A qPCR também foi utilizada para se estabelecer a carga parasitária nos diferentes tecidos dos animais experimentais (Figura 10). A grande discrepância de valores obtidos para alguns animais dos diferentes grupos experimentais se traduziu na ausência de significância estatística entre as quantidades de parasitos, independentemente do sexo e da cepa infectante, para cada fase analisada.

Ainda assim, foi possível se verificar uma importante redução no número de parasitos presentes nos animais da fase crônica, com destaque para os animais infectados com a cepa CL Brener, os quais apresentam cargas parasitárias muito baixas nos três tecidos analisados durante a fase crônica da infecção (coração: $0,66 \pm 1,05$ parasitos equivalente/100 ng de DNA; intestino: $0,80 \pm 10,02$ parasitos equivalente/100 ng de DNA; medula óssea: $1,15 \pm 1,08$ parasitos equivalente/100 ng de DNA).

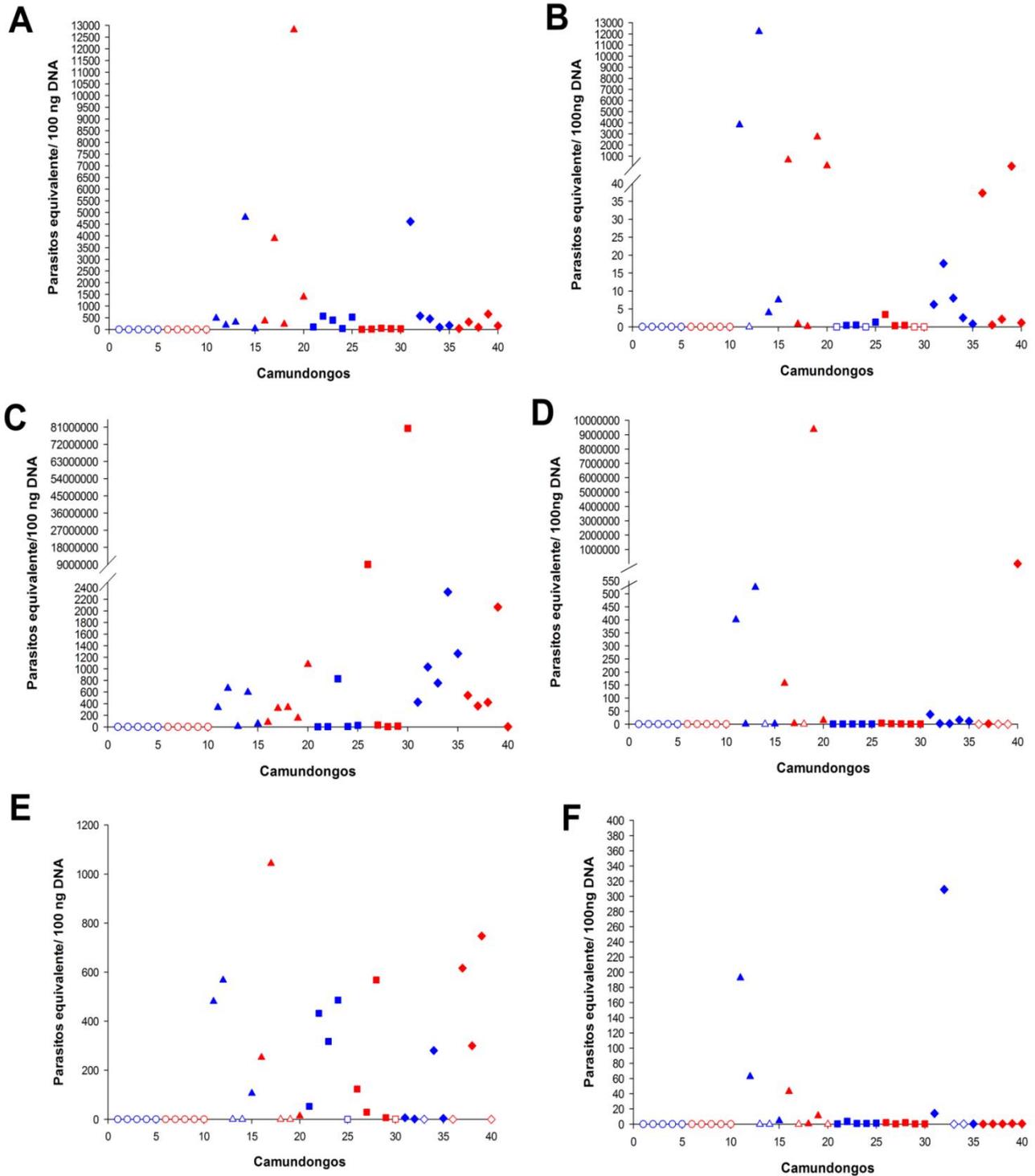


Figura 10. Quantificação da carga parasitária de camundongos machos e fêmeas, infectados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, nas fases aguda e crônica da infecção. A) grupo agudo, tecido cardíaco; B) grupo crônico, tecido cardíaco; C) grupo agudo, tecido intestinal; D) grupo crônico, tecido intestinal; E) grupo agudo, tecido medular; F) grupo crônico, tecido medular. 1-10: controle negativo; 11-20: camundongos infectados com a cepa Colombiana; 21-30 camundongos infectados com a cepa CI Brener; 31-40: camundongos infectados com a cepa Y. Azul=machos; Vermelho=fêmeas. Os símbolos preenchidos representam os camundongos positivos.

No que diz respeito aos resultados referentes à integração de kDNA, verificou-se uma maior porcentagem de animais com integração na fase aguda em relação à crônica ao se avaliar o tecido cardíaco, e essa diferença mostrou-se estatisticamente significativa ($p = 0,0003$) (Figura 11). Assim, observou-se que, na fase aguda da DC, 80% dos camundongos infectados com a cepa Colombiana apresentaram integração no tecido cardíaco, dado semelhante ao que foi encontrado no grupo infectado com a cepa CL Brener, que apresentou 100% dos animais com integração nesse tecido. Já o grupo infectado com a cepa Y apresentou apenas 40% dos animais com integração. Ao se avaliar os dados da fase crônica, nota-se uma diminuição da porcentagem de animais kDNA-positivos em todos os grupos, com destaque para o grupo infectado com a cepa CL Brener, onde não foi possível se detectar a integração em nenhum animal.

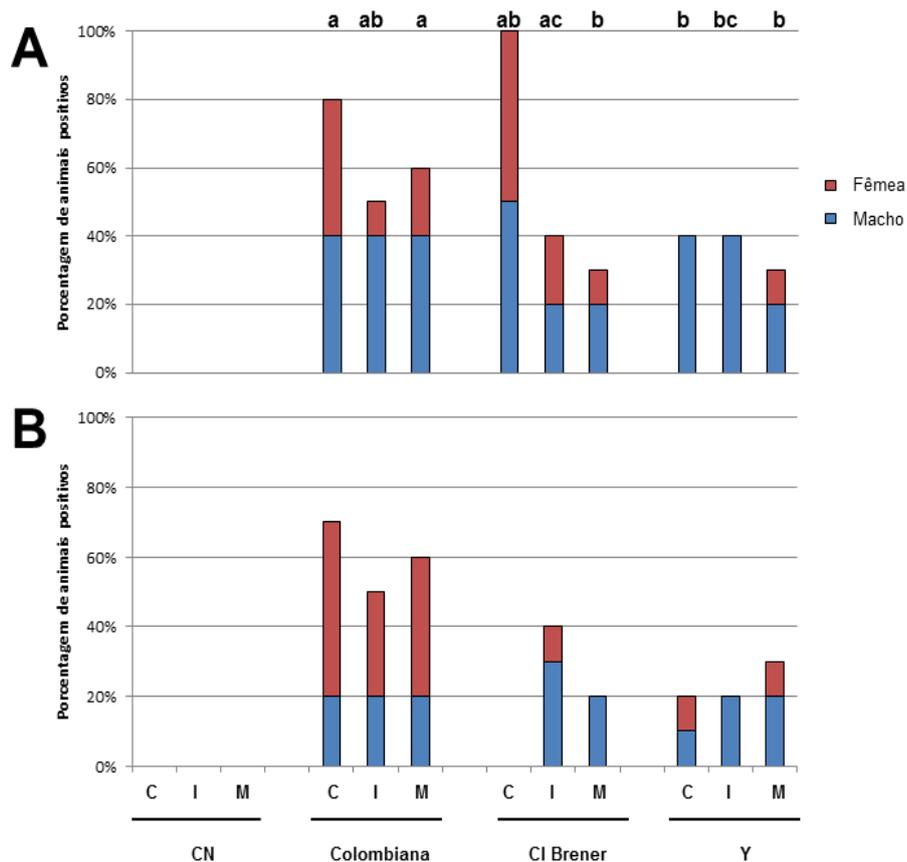


Figura 11. Integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de camundongos infectados. O ponto de corte para cada cepa, indicativo de que houve integração, foi estabelecido a partir da razão kDNA/nDNA das médias dos 5 *pools* de cada uma somada ao valor máximo do desvio padrão **A)** Fase aguda; **B)** Fase crônica. Azul=machos; Vermelho=fêmeas. C = coração; I = intestino; M = medula marrom. Considerando a porcentagem total (fase aguda e crônica) de animais com carga parasitária positiva, as letras diferentes (a,b, c) acima das barras dos mesmos tecidos diferem significativamente: **Coração** - Colombiana X Y $p=0,0016$. **Medula** - Colombiana X CL Brener $p=0,0267$; Colombiana X Y $p=0,0267$.

De interesse, existe uma maior possibilidade de que a integração ocorra no coração e medula óssea de animais infectados com a cepa Colombiana ($p=0,007$ e $p=0,003$, respectivamente), na fase crônica da infecção, onde 70% dos animais foram positivos para o tecido cardíaco e 60% para o medular. Entretanto, ao analisarmos a porcentagem total de integrações em cada tecido, independente da cepa utilizada, verificamos que a média de animais que apresentaram integração na fase crônica é similar entre os diferentes tecidos avaliados (tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem geral de integrações em cada tecido, independente da cepa

Tecido	Fase	
	Aguda	Crônica
Coração	73,30%	30%
Intestino	43,30%	36,60%
Medula	40%	36,60%

Ademais, observou-se que a integração do kDNA no intestino ocorre preferencialmente em camundongos machos quando comparados às fêmeas ($p=0,04$). A esse respeito, chama atenção o fato de somente ter sido possível identificar a integração no tecido cardíaco e intestinal de camundongos machos infectados com a cepa Y. Já na fase crônica, nota-se uma maior porcentagem de integração no intestino e medula óssea de camundongos machos infectados com as cepas CL Brener e Y. Entretanto, não observamos diferença estatística na porcentagem de animais com integração de kDNA no intestino ao se levar em consideração as cepas utilizadas no estudo.

Diferentemente do que se detectou com a avaliação qualitativa (negativo e positivo), a avaliação quantitativa dos eventos de integração demonstrou que o sexo do animal não interfere na quantidade de integrações verificada, seja na fase aguda ou na fase crônica ($p>0,05$). Além disso, diferença significativa foi detectada ao se comparar a quantidade de integração nos diferentes tecidos em relação à cepa infectante, em ambas as fases da infecção ($p < 0,001$) (Figura 12). Apesar de existir uma grande variabilidade dos resultados intragrupo, o que pode ser estimado pela dispersão dos animais nos gráficos, alguns aspectos podem ser destacados: em todos os grupos se observou uma redução significativa da quantidade de

integrações no coração à medida que os animais passaram da fase aguda para a crônica da DC ($p < 0,001$), a infecção com a cepa Y resulta em uma menor quantidade de integrações de kDNA no coração e intestino (ambos $p < 0,001$), enquanto a infecção com a cepa CL Brener resulta em menos integrações de kDNA na medula óssea a 30 dpi ($p < 0,001$).

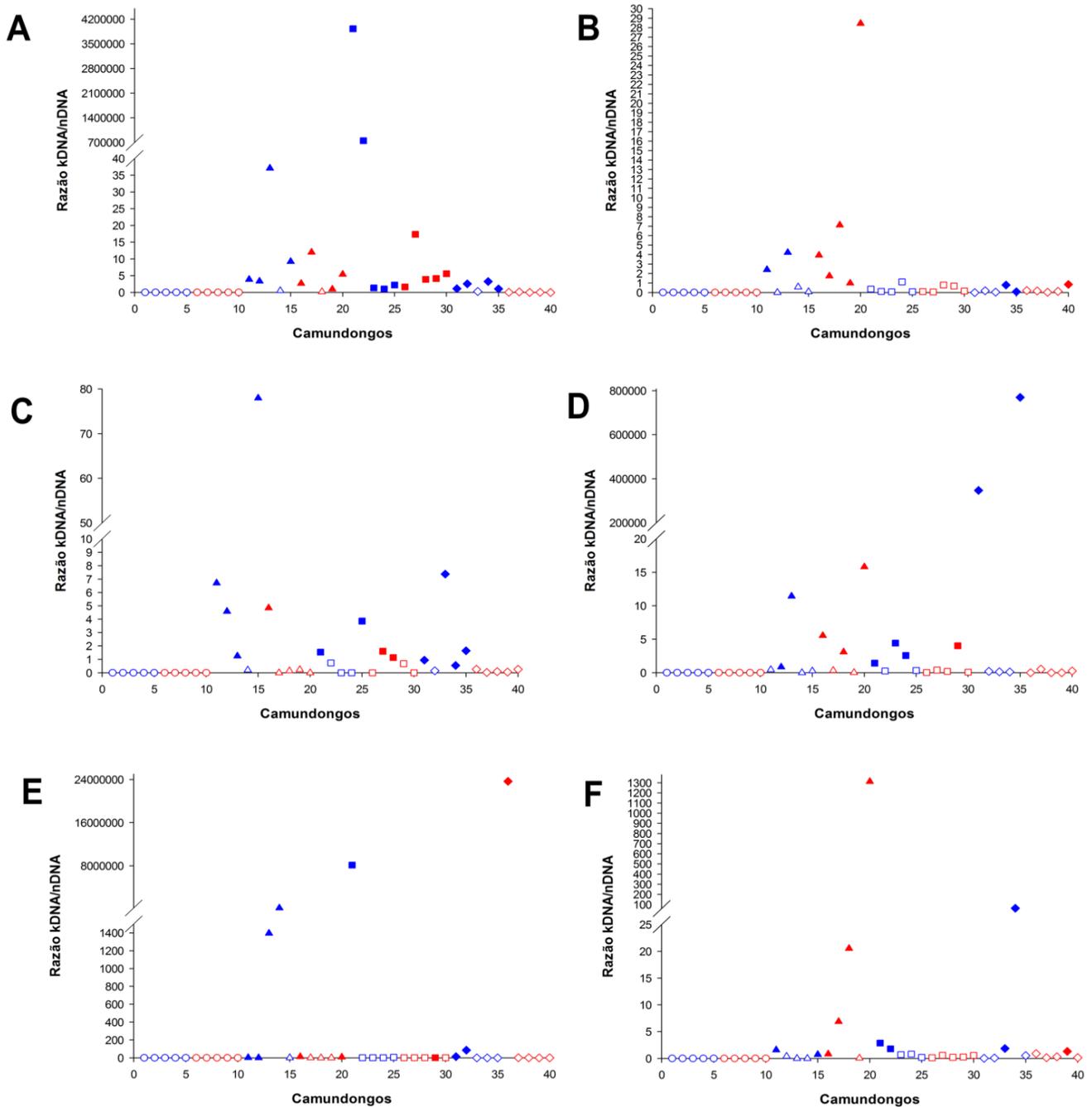


Figura 12. Quantificação de integrações de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de camundongos nas fases aguda e crônica da DC. A) grupo agudo, tecido cardíaco; B) grupo crônico, tecido cardíaco; C) grupo agudo, tecido intestinal; D) grupo crônico, tecido intestinal; E) grupo agudo, tecido medular; F) grupo crônico, tecido medular. 1-10: controle negativo; 11-20: camundongos infectados com a cepa Colombiana; 21-30: camundongos infectados com a cepa CI Brener; 31-40: camundongos infectados com a cepa Y. Azul=machos; Vermelho=fêmeas. Os símbolos preenchidos representam os camundongos positivos.

5.2. Ativação da resposta Imune

A resposta imune produzida contra o *T. cruzi* foi avaliada inicialmente pela dosagem de citocinas (picogramas por mililitro – pg/mL) do perfil Th1/Th2 (Figura 13). Na fase aguda da infecção, observa-se um perfil pró-inflamatório das citocinas detectadas, com produção aumentada de TNF e IFN- γ , notadamente nos grupos de camundongos infectados com as cepas Colombiana (TNF 64,5 \pm 78,9 pg/mL; IFN 36,9 \pm 3.0 pg/mL) e CL Brener (TNF 45,5 \pm 50,4 pg/mL; IFN 47,5 \pm 13.4 pg/mL). À medida que a infecção crônica, observa-se uma queda acentuada nas concentrações dessas citocinas, ainda que a infecção seja persistente. Na fase crônica, destaca-se uma maior produção de IL-5 em fêmeas infectadas com a cepa Colombiana (21,1 \pm 26,4 pg/mL) e de TNF (18,5 \pm 28,40 pg/mL) em machos infectados com essa mesma cepa.

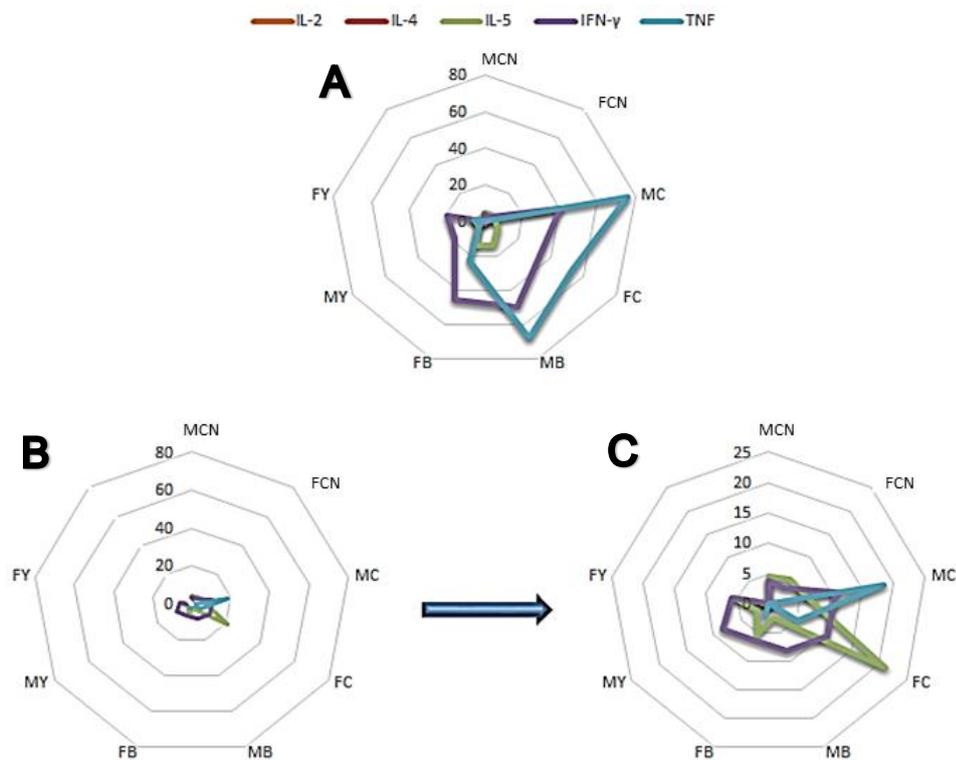


Figura 13. Resultados de Citometria de Fluxo para dosagem de citocinas do perfil Th1/Th2 em camundongos infectados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, nas fases aguda e crônica da DC. A concentração das citocinas foi mensurada no soro dos camundongos infectados há 30 dias (figura 13A) e há 100 dias (B). A figura 13C refere-se a figura 13B em escala diferente a fim de melhorar a visualização dos resultados. Os dados representam a média de cada grupo e a concentração absoluta é medida em pg/mL. FCN, fêmeas controle negativo; MCN, machos controle negativo; FY, fêmeas infectadas com a cepa Y; MY, machos infectados com a cepa Y; FB, fêmeas infectadas com a cepa CL Brener; MB, machos infectados com a CL Brener; FC, fêmeas infectadas com a cepa Colombiana; MC, machos infectados com a cepa Colombiana.

Em seguida, a resposta imune adaptativa foi mensurada pela detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* e contra autoantígenos cardíacos e intestinais em teste de ELISA (Figura 14). A produção de anticorpos da classe IgM contra o parasito não apresentou diferença significativa ao se avaliar o sexo do animal, independentemente da cepa infectante. Em camundongos infectados com a cepa Colombiana, detectou-se a presença de IgM anti-*T. cruzi* em apenas 60% dos animais, porcentagem que foi significativamente diferente ($p=0,04$) a dos animais infectados com as outras cepas (90% para CL Brener e 100% para Y). Ainda na fase aguda, também foi possível se verificar que 50% dos camundongos infectados com a cepa Y apresentaram anticorpos contra antígenos cardíacos, enquanto que tal reconhecimento autoimune não foi verificado em nenhum outro grupo ($p=0,003$). De interesse, nenhum animal apresentou autoanticorpos contra antígenos intestinais a 30 dpi.

Já na fase crônica da infecção (100 dpi), todos os animais passaram a produzir anticorpos da classe IgG contra o *T. cruzi* e contra as proteínas intestinais. Ademais, nota-se que todos os animais infectados com a cepa Colombiana (100%) produziram IgG anti-proteínas cardíacas, enquanto que apenas um animal (10%) infectado com a cepa CL Brener e nenhum animal infectado com a cepa Y (0%) foi reagente, diferença que se mostrou estatisticamente significativa ($p<0,001$).

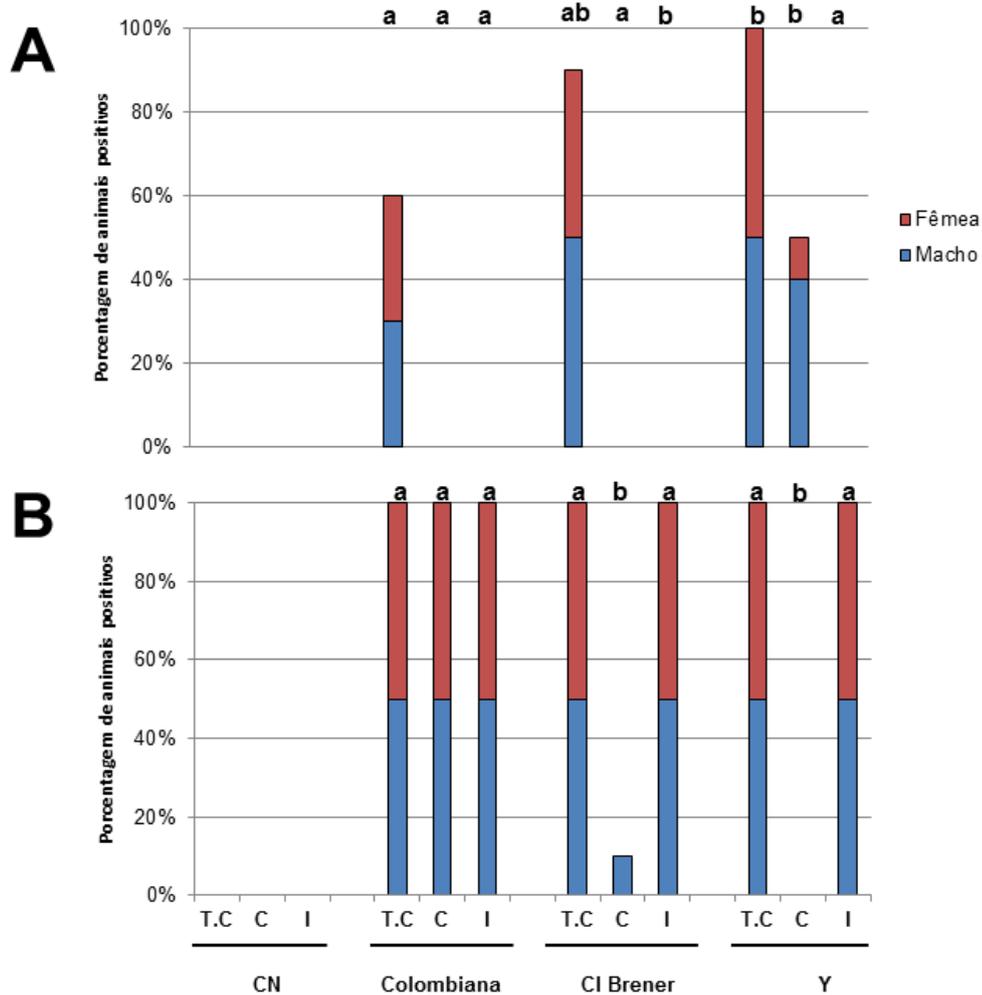


Figura 14. Resultado de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e autoanticorpos em camundongos infectados por diferentes cepas do parasito. A) Fase aguda; B) Fase crônica. Azul=machos; Vermelho=fêmeas. TC = *Trypanosoma cruzi*; C = coração; I = intestino. As letras diferentes (a, b) acima das barras dos mesmos tecidos diferem significativamente: **IgM-TC - Colombiana X Y $p=0,0253$. **IgM-Coração** - Colombiana X Y $p=0,0098$; CI Brener X Y $p=0,0098$. **IgG-Coração** - Colombiana X CI Brener $p<0,0001$; Colombiana X Y $p<0,0001$.**

Ao se avaliar de maneira quantitativa a produção de anticorpos (Figura 15), verificou-se que, durante a fase aguda da DC, animais infectados com a cepa Y produziram maiores quantidades de IgM específico anti-*T.cruzi* e anti-proteínas cardíacas do que os animais infectados com as demais cepas. De interesse, a elevação das médias das taxas de anticorpos produzidos pelos camundongos infectados pela cepa Y se deu em decorrência das altas taxas detectadas nos machos para ambos os antígenos (IgM anti-*T. cruzi*: machos $0,89\pm 0,19$ U/ μ L, fêmeas $0,53\pm 0,18$ U/ μ L, $p=0,01$; IgM anti-proteínas cardíacas: machos $0,37\pm 0,07$ U/ μ L, fêmeas $0,22\pm 0,05$ U/ μ L, $p=0,007$).

Na fase crônica da infecção, os machos infectados com a cepa Y permaneceram produzindo maiores taxas de imunoglobulinas IgG anti-*T.cruzi* do que as fêmeas (machos $0,93 \pm 0,04$ U/ μ L; fêmeas: $0,57 \pm 0,31$ U/ μ L, $p=0,03$), resultado oposto ao que se observou para as cepas Colombiana (machos $1,1 \pm 1,4$ U/ μ L; fêmeas: $2,1 \pm 1,6$ U/ μ L, $p=0,3$) e CL Brener (machos $0,8 \pm 0,2$ U/ μ L; fêmeas: $1,3 \pm 0,3$ U/ μ L, $p=0,01$).

Novamente, destaca-se o fato de que a produção de IgG contra o tecido cardíaco ocorreu quase que exclusivamente nos animais infectados com a cepa Colombiana, sem se verificar diferença estatística de acordo com o sexo (macho: $0,42 \pm 0,23$ U/ μ L; fêmeas: $0,66 \pm 0,26$ U/ μ L, $p>0,05$).

No que se refere à produção de anticorpos contra proteínas intestinais próprias, nota-se que essas proteínas passam a ser reconhecidas com a progressão do processo infeccioso, isto é, enquanto nenhum animal apresentou produção de IgM autorreativo contra proteínas intestinais, todos os animais tornaram-se positivos ao se avaliar a produção de IgG autorreativo na fase crônica da doença, com concentração dos anticorpos produzidos pelos animais dos diferentes grupos bastante similar (Colombiana, $0,22 \pm 0,12$ U/ μ L; CL Brener, $0,22 \pm 0,05$ U/ μ L; Y, $0,23 \pm 0,05$ U/ μ L; $p>0,05$) e independente do sexo.

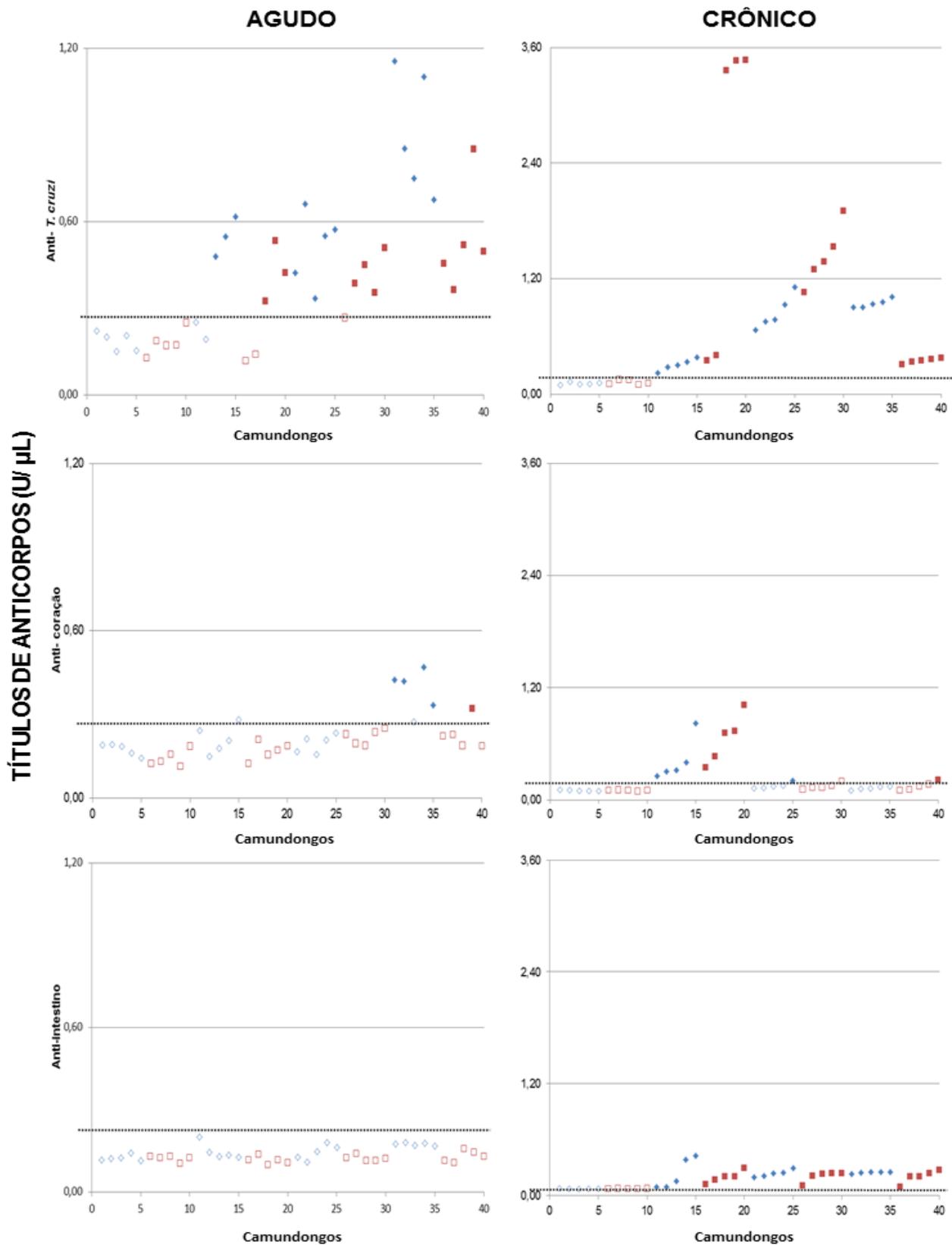


Figura 15. Perfil de taxas de anticorpos produzidos contra antígenos do *Trypanosoma cruzi*, coração e intestino. O soro de camundongos infectados com *T. cruzi* das linhagens Colombiana (animais 11 a 20), CL Brener (animais 21 a 30) e Y (animais 31 a 40) foram submetidos ao teste ELISA para determinação das taxas de anticorpos produzidos na fase aguda (IgM) e crônica (IgG) da infecção contra antígenos específicos do *T. cruzi* e proteínas do coração ou intestino. As linhas pontilhadas representam o ponto de corte de cada experimento. Camundongos 1 a 10: controle negativo, não infectado. Azul, machos; vermelho, fêmeas. Os símbolos preenchidos representam os camundongos positivos.

5.3. Análise histológica

A presença de ninhos de amastigotas e o infiltrado inflamatório foram avaliados em tecido cardíaco e intestinal dos animais dos diferentes grupos experimentais (Figura 16). A observação do parasito só foi possível no tecido cardíaco de animais infectados com a cepa Colombiana, sendo oito animais (80%) em fase aguda (4 machos e 4 fêmeas) e quatro animais (40%) em fase crônica (1 macho e 3 fêmeas). Não se visualizou ninhos de amastigotas no intestino de nenhum animal.

Em relação ao processo inflamatório (Figura 16C, E, F), verificou-se que ele foi mais intenso no coração do que no intestino em relação à fase aguda. No tecido cardíaco de animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, observou-se um grau leve (entre 0,5 e 1,0; correspondendo a 10-25 células/campo) de processo inflamatório a 30 dpi, o qual se dissipou a 100 dpi ($p < 0,001$), passando a ser equivalente ao que se observou no controle negativo. O mesmo ocorreu ao se analisar o tecido intestinal destes camundongos ($p = 0,02$).

O infiltrado inflamatório no coração de animais infectados pela cepa Colombiana foi classificado como moderado (entre 1,1 e 2,0; correspondendo a 25-50 células/campo) nas fases aguda e crônica da infecção, tendo havido uma diminuição significativa da inflamação a 100 dpi ($p = 0,02$). Já para o intestino, o grau de inflamação foi classificado como baixo, tanto na fase inicial quanto tardia da infecção ($p > 0,05$). Animais infectados com a cepa CL Brener apresentaram a menor alteração de severidade ao se progredir da fase aguda para fase crônica ($p > 0,05$), sendo classificados como grau leve no tecido cardíaco e intestinal.

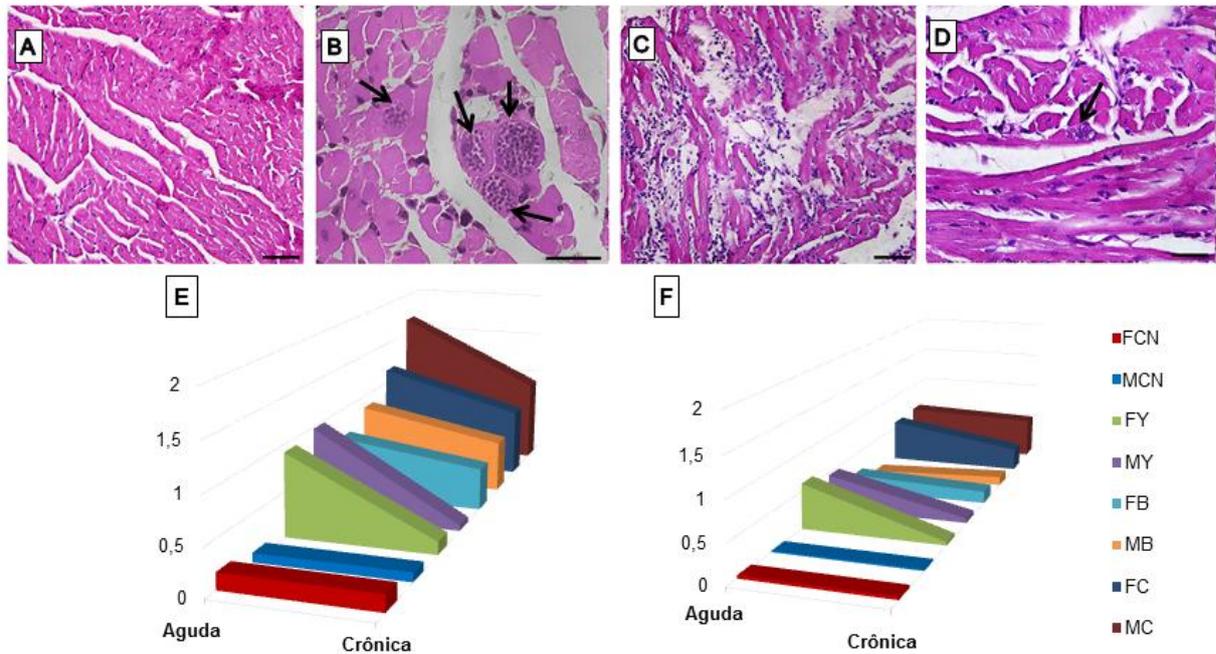


Figura 16. Progressão do processo inflamatório em camundongos infectados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Micrografias de tecido cardíaco mostrando A) integridade do tecido em animal controle negativo; B) ninhos de amastigota (setas) em camundongo macho, fase aguda, infectado com a cepa Colombiana; C) infiltrado inflamatório e lise de fibras em camundongo fêmea infectado com cepa Colombiana, grupo crônico; D) ninho de amastigota (seta) em camundongo fêmea infectado com cepa Colombiana, grupo crônico. A, C e D) Magnificação 40X. B) Magnificação 100X. Barras: 10 μ m. Classificação do infiltrado linfocitário em (E) tecido cardíaco e (F) intestinal durante as fases aguda e crônica da infecção. Grau de inflamação: 0-0,2 normal, 0,3-1,0 leve, 1,1-2,0 moderada, 2,1-3,0 severa. FCN, fêmeas controle negativo; MCN, machos controle negativo; FY, fêmeas infectadas com a cepa Y; MY, machos infectados com a cepa Y; FB, fêmeas infectadas com a cepa CL Brener; MB, machos infectados com a CL Brener; FC, fêmeas infectadas com a cepa Colombiana; MC, machos infectados com a cepa Colombiana.

5.4. Análise de correlação

A interação dos diversos parâmetros quantitativos avaliados neste estudo, ao longo do processo de cronificação da infecção por *T. cruzi*, foi avaliada por uma análise de correlação. Na tabela 4, podemos observar uma importante correlação entre a carga parasitária e a ativação das respostas imunes adaptativa celular e humoral: uma maior carga parasitária no coração está associada a uma maior produção de IgG anti-proteínas do coração ($p < 0,05$) e do intestino ($p < 0,01$), mas não contra as proteínas do parasito. Além disso, também se verificou que uma maior quantidade de parasitos no tecido cardíaco leva a uma maior produção de IL-5, IFN- γ e TNF ($p < 0,05$). Já a carga parasitária do intestino mostrou-se associada ao aumento de imunoglobulinas do tipo G anti-*T. cruzi* ($p < 0,01$) e anti-proteínas cardíacas ($p < 0,001$), mas não contra as proteínas intestinais. No que se refere à produção de citocinas, o número de parasitos no intestino influenciou na produção de IL-4 ($p < 0,01$) e IFN- γ ($p < 0,05$). Destaca-se, ainda, que o parasitismo do

coração e da medula estava correlacionado com o processo inflamatório observado no coração ($p < 0,05$) e no intestino ($p < 0,001$).

Ao se avaliar de maneira quantitativa a integração de minicírculos de kDNA, notou-se uma associação entre a taxa de integração no coração e na medula ($p < 0,01$) e que ambas interagem com a resposta imune humoral dos indivíduos, associando-se a um aumento de IgG anti-*T. cruzi* e anti-proteínas do coração (integração no coração, $p < 0,001$; integração na medula, $p < 0,01$). Em relação à resposta imune adaptativa celular, a única correlação observada foi entre a integração de kDNA no coração e a produção de IFN- γ ($p < 0,05$).

Explorando os resultados da resposta imune como um todo, também pudemos verificar uma ampla interação entre os anticorpos produzidos contra os diferentes antígenos e entre as diversas citocinas avaliadas. Assim, a produção de imunoglobulinas das classes M e G contra cada um dos antígenos (*T. cruzi*, coração e intestino) está relacionada à ativação da resposta imune adaptativa contra os demais ($p < 0,001$: IgM_TC X IgM_C; IgM_TC X IgM_I; IgM_C X IgM_I; IgG_TC X IgG_C; IgG_TC X IgG_I. $p < 0,01$: IgG_C X IgG_I). A produção de anticorpos contra o parasito, seja na fase aguda ou crônica, apresentou correlação com a citocina IFN- γ , a qual também estava associada à produção de IgG anti-proteínas intestinais ($p < 0,01$). Ademais, IL-5 mostrou uma relação significativa com a produção de IgG anti-*T. cruzi* e anti-proteínas cardíacas ($p < 0,001$). Entre as citocinas, pudemos notar as seguintes correlações: IL-2 X IL-4 ($p < 0,001$), IL-5 X IFN- γ ($p < 0,05$), IFN- γ X TNF ($p < 0,001$).

Finalmente, o processo inflamatório observado no coração e intestino dos animais avaliados mostra-se principalmente relacionado com a carga parasitária encontrada no coração e na medula, como mencionado anteriormente, bem como com as taxas de anticorpos específicos. Assim, um maior grau de infiltrado linfocitário no coração associa-se, inicialmente, à produção de IgM anti-*T. cruzi* e anti-proteínas intestinais ($p < 0,05$) e, posteriormente, a anticorpos IgG anti-*T. cruzi* ($p < 0,01$) e anti-proteínas intestinais e cardíacas ($p < 0,001$) e produção de IFN- γ ($p < 0,001$). Já o processo inflamatório do intestino associa-se diretamente ao processo inflamatório do coração ($p < 0,001$) e está relacionado à produção de IgG anti-proteínas do coração.

Tabela 4. Correlações entre carga parasitária, integração de kDNA, produção de anticorpos e citocinas , parasitismo e processo inflamatório.

	CP_C	CP_I	CP_M	I_C	I_I	I_M	IgM_TC	IgM_C	IgM_I	IgG_TC	IgG_C	IgG_I	IL_2	IL_4	IL_5	IFN_γ	TNF	P_C	Inf_C	
CP_I	-0,02ns																			
CP_M	0,05ns	-0,01ns																		
I_C	-0,03ns	-0,02ns	0,02ns																	
I_I	-0,05ns	-0,02ns	-0,06ns	-0,02ns																
I_M	-0,04ns	-0,02ns	-0,05ns	0,31**	-0,02ns															
IgM_TC	0,26ns	0,07ns	0,12ns	0,05ns	0,16ns	0,05ns														
IgM_C	0,11ns	0,09ns	0,15ns	-0,07ns	0,16ns	0,01ns	0,86***													
IgM_I	0,02ns	-0,08ns	0,21ns	-0,06ns	0,04ns	-0,12ns	0,53***	0,61***												
IgG_TC	0,17ns	0,41**	0,08ns	0,50***	0,03ns	0,41**	-0,04ns	-0,16ns	0,19ns											
IgG_C	0,28*	0,57***	0,09ns	0,51***	-0,06ns	0,37**	0,34ns	0,28ns	0,18ns	0,82***										
IgG_I	0,40**	-0,02ns	0,01ns	0,13ns	-0,05ns	0,09ns	0,34ns	-0,18ns	0,04ns	0,57***	0,37**									
IL_2	-0,04ns	-0,02ns	-0,05ns	-0,01ns	-0,02ns	-0,02ns	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,01ns	-0,07ns	-0,08ns								
IL_4	-0,05ns	0,34**	0,00ns	-0,02ns	-0,03ns	-0,03ns	-0,03ns	-0,01ns	-0,07ns	-0,01ns	-0,08ns	-0,09ns	0,90***							
IL_5	0,22*	0,10ns	-0,07ns	0,06ns	-0,10ns	0,02ns	0,08ns	-0,17ns	0,05ns	0,47***	0,66***	0,04ns	-0,02ns	-0,02ns						
IFN_γ	0,27*	0,25*	0,06ns	0,22*	-0,06ns	0,10ns	0,39**	0,13ns	0,01ns	0,47***	0,46***	0,40**	-0,08ns	-0,01ns	0,23*					
TNF	0,23*	0,03ns	0,03ns	0,09ns	-0,06ns	0,04ns	0,27ns	0,09ns	-0,12ns	0,12ns	0,20ns	0,13ns	-0,04ns	-0,05ns	0,15ns	0,75***				
P_C	0,45***	-0,02ns	0,28*	-0,05ns	-0,06ns	-0,06ns	-0,10ns	-0,13ns	0,07ns	0,45***	0,61***	0,17ns	-0,05ns	0,04ns	0,23*	0,13ns	0,13ns			
Inf_C	0,25*	0,17ns	0,40**	-0,06ns	-0,13ns	-0,04ns	0,36*	0,26ns	0,31ns	0,40**	0,59***	0,46***	-0,08ns	0,04ns	0,19ns	0,41***	0,21ns	0,46***		
Inf_I	0,18ns	-0,04ns	0,46***	-0,09ns	-0,10ns	-0,01ns	0,17ns	0,22ns	0,19ns	0,25ns	0,44***	0,25ns	-0,08ns	-0,03ns	-0,10ns	-0,01ns	-0,08ns	0,46***	0,55***	

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns – não significativo. CP_C: carga parasitária no tecido cardíaco; CP_I: carga parasitária no tecido intestinal; CP_M: carga parasitária no tecido medular; I_C: integração de kDNA no tecido cardíaco; I_I: integração de kDNA no tecido intestinal; I_M: integração de kDNA no tecido medular; IgM_TC: imunoglobulina M anti- *T.cruzi*; IgM_C: imunoglobulina M anti-coração; IgM_I: imunoglobulina M anti-intestino; IgG_TC: imunoglobulina G anti-*T.cruzi*; IgG_C: imunoglobulina G anti-coração; IgG_I: imunoglobulina G anti-intestino; IL_2: interleucina 2; IL_4: interleucina 4; IL-5: interleucina 5; IFN-γ: interferon- gama; TNF: fator de necrose tumoral; P_C: parasitismo no tecido cardíaco; Inf_C: inflamação no tecido cardíaco; Inf_I: inflamação no tecido intestinal.

6. DISCUSSÃO

Várias teorias foram criadas para explicar as lesões produzidas nos tecidos do hospedeiro em decorrência da infecção por *T. cruzi*, sendo as principais a persistência do parasito e a autoimunidade. As dificuldades em se determinar o que é causa e o que é consequência durante o desenvolvimento das manifestações clínicas se devem, em parte, às grandes lacunas de conhecimento que ainda existem neste campo. Por exemplo, o fato de apenas uma porcentagem dos indivíduos infectados apresentarem as manifestações clínicas, o porquê do tempo de infecção ser relevante e a escassez de ninhos de amastigota em proximidade física a fibras musculares destruídas podem ser considerados enormes lacunas a serem preenchidas (Santos-Buch e Teixeira, 1974; Root-Bernstein e Fairweather, 2015).

Nos últimos 20 anos, uma gama de artigos de revisão discutiu as evidências que corroboram ou refutam as teorias propostas para explicar a patogênese da DC (Kierszenbaum, 1999; Engman e Leon, 2002; Cunha-Neto *et al.*, 2006; Gironès *et al.*, 2007; Marin-Neto *et al.*, 2007; Bonney e Engman, 2015; De Bona *et al.*, 2018; Bonney *et al.*, 2019). Porém, na maioria dos casos, esses estudos tratam os diversos elementos que podem contribuir para o surgimento das manifestações clínicas da DC de maneira isolada. Esse tipo de abordagem não se mostrou efetiva no estabelecimento do mecanismo desencadeador das manifestações clínicas da DC, reforçando a necessidade de se fazer uma análise multiparamétrica para se abordar de maneira mais adequada a patogênese da DC.

De interesse, modelos experimentais de doenças autoimunes revelam que os danos ao “próprio” normalmente necessitam de pelo menos dois estímulos coincidentes no tempo zero (Root-Bernstein e Fairweather, 2015). Portanto, é plausível que os vários fatores envolvidos no processo de cronificação da DC descritos neste estudo ocorram em paralelo, representando elementos primários e secundários de indução da doença.

6.1. Persistência do parasito

Em nosso trabalho, nós documentamos, por microscopia, a presença de ninhos de amastigota apenas no tecido cardíaco de camundongos infectados com a cepa Colombiana, sendo que a maioria estava na fase aguda na infecção. Igualmente, as maiores cargas parasitárias estabelecidas pela qPCR se encontravam no tecido cardíaco desses mesmos animais. De fato, a cepa Colombiana apresenta um histotropismo mais intenso por miocárdio e músculos esqueléticos, com lesões mais intensas encontradas a partir do final da fase aguda (Camandaroba *et al.*, 2006). Interessantemente, a maior quantidade de parasitos no coração se correlacionou com um maior processo inflamatório nesse órgão. A esse respeito, aumento de infiltrado inflamatório acompanhado da alteração da função dos cardiomiócitos em camundongos infectados com a cepa Colombiana tem sido relatado na literatura (Andrade, 1990; Cruz *et al.*, 2016).

Exceto para a cepa CL Brener, a carga parasitária do intestino dos diferentes grupos experimentais mostrou-se semelhante à encontrada no coração. Assim, a não visualização de ninhos de amastigota nos cortes histológicos de intestino pode estar relacionada ao fato de não termos utilizado técnicas imuno-histoquímicas (Vazquez *et al.*, 2015; Azevedo *et al.*, 2018). Em relação à medula óssea, não se observou diferença significativa na carga parasitária detectada na fase aguda nos diferentes grupos experimentais. Isso difere do que Melo e Brener (1978) relataram, visto que observaram um alto parasitismo da medula óssea pela cepa Y, enquanto que, com a cepa CL Brener, poucos parasitos estavam presentes nesse tecido.

Nossas análises demonstraram não haver significância estatística na carga parasitária ao se comparar camundongos machos e fêmeas, independente da cepa infectante, em cada uma das fases da DC. Em um estudo que avaliava a correlação da parasitemia aguda por cepa Y com a longevidade de camundongos, verificou-se que os machos eram mais suscetíveis à morte, embora a parasitemia fosse semelhante em machos e fêmeas (Sanches *et al.*, 2014). Desta forma, as diferenças anatômicas e hormonais entre os sexos parecem não influenciar no estabelecimento da infecção, ainda que possam alterar seu desfecho (Barretto *et al.*, 1993). Igualmente, estudo incluindo 499 pacientes soropositivos para DC, sendo 261 (52%) homens e 238 (48%) mulheres, e 488 soronegativos, sendo 241 (49%) homens e

247 (51%) mulheres, verificou-se que, a cardiomiopatia chagásica teve associação significativa com o sexo masculino (Sabino *et al.*, 2013).

Ao se avaliar a presença do parasito pela quantificação do nDNA do *T. cruzi* durante a fase crônica da infecção, verificou-se uma importante redução da carga parasitária das três cepas utilizadas, principalmente na medula óssea e no intestino. Ainda assim, concentrações elevadas de parasitos foram identificadas em alguns camundongos infectados com as cepas Colombiana e Y. A presença de indivíduos com cargas parasitárias discrepantes na fase crônica da infecção também foi verificada por Rodrigues-dos-Santos *et al.*(2018), que observaram quantidades de parasitos variando de 0,12 a 153,66 par. Eq./mL. Assim como em nosso estudo, os autores observaram uma maior carga parasitária em pacientes infectados por TcII em comparação a pacientes infectados por TcVI.

A análise de correlação revelou que cargas parasitárias mais elevadas no coração e no intestino estão associadas com a produção de autoanticorpos contra proteínas cardíacas, representando uma ligação direta entre a persistência do parasito e a autoimunidade, possivelmente por mimetismo molecular. Já o parasitismo na medula óssea está vinculada ao processo inflamatório de coração e intestino, na ausência de correlação com autoanticorpos, indicando que possíveis alterações das células mielóides, decorrentes da presença do parasito, podem estar alterando a regulação da resposta imune (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2018).

6.2. Integração do kDNA

Nossos resultados demonstraram que uma maior porcentagem de animais apresenta a integração na fase aguda da infecção em comparação à fase crônica, notadamente no tecido cardíaco. Entretanto, a integração do kDNA não mostrou associação com a carga parasitária, sugerindo que esse evento seja independente da replicação do parasito. Desta forma, é possível que a transferência de fragmentos do DNA do *T. cruzi* para o genoma da célula-alvo possa ser um mecanismo de adaptação e proteção ao processo de invasão e sobrevivência nas células hospedeiras. Na natureza, existem diversos exemplos de transferência lateral de DNA que beneficiam o invasor, como a necessidade de vírus de RNA inserirem

parte de seu material genético no genoma da célula hospedeira (Weiss, 2017) e a extensa transferência do DNA da *Wolbachia* para o genoma de seu hospedeiro nematóide *Brugia malayi*, onde alguns desses DNAs são biologicamente relevantes para a bactéria (Ioannidis *et al.*, 2013).

Curiosamente, ao se considerar de maneira independente cada tecido, notamos que a porcentagem total de animais que apresentou a integração a 100 dpi decresceu para uma taxa similar à porcentagem de indivíduos infectados por *T. cruzi* que desenvolvem as manifestações clínicas da DC crônica (30 a 40%) (Teixeira, *et al.*, 2011). Esse dado pode ser um indício de que a integração em um ou mais dos tecidos analisados seja um fator que favoreça o surgimento das manifestações clínicas.

A análise quantitativa das integrações do kDNA mostrou que o número de integrações no tecido cardíaco está relacionado ao número de integrações na medula óssea, e que ambas se correlacionam com a produção de IgG anti-*T. cruzi* e anti-proteínas cardíacas. Interessantemente, alguns autores sugerem que a incapacidade do sistema imune de eliminar *T. cruzi*, permitindo que a infecção se torne crônica, esteja associada a uma redução de células B imaturas na medula óssea, em consequência da presença do parasito, o que poderia comprometer toda a resposta imune humoral, limitando a geração de células B maduras na periferia (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2018). Assim, a integração do kDNA na medula óssea é mais um fator que pode estar contribuindo na desregulação do processo de maturação das células B. A esse respeito, o transplante de medula em aves que apresentavam o kDNA integrado em seus genomas inibiu a rejeição do coração por células auto reativas (Guimaro *et al.*, 2014).

Em relação à integração de kDNA no intestino, verificamos que ela não se associou a nenhum fator. Uma vez que esse órgão é visto como um reservatório do *T. cruzi* (Lewis *et al.*, 2014; Silberstein *et al.*, 2018), é provável que, ao se instalar nas células intestinais, o parasito entre em um estado de latência induzido pelo estresse vinculado à resposta imune (Dumoulin e Burleigh, 2018), o que evitaria que novos eventos de integração ocorressem. À medida que o parasito circula para outros tecidos e invade novas células, isso propiciaria a ocorrência de novos eventos de integração, os quais se associam à ativação do sistema imune adaptativo

(produção de anticorpos anti-*T. cruzi* e anti-proteínas do coração). Esse cenário respaldaria o fato de a cepa Colombiana, que tem maior tropismo pelo coração (Camandaroba *et al.*, 2006), ter sido a que apresentou maiores taxas de integração no coração a 100 dpi.

É importante ressaltar que o número de integrações de kDNA não se correlacionou com o processo inflamatório presente no coração ou no intestino. Isso pode sugerir que, não a quantidade de integrações, mas sim o local onde o kDNA se insere que seria importante na patogênese da DC. Ou ainda, pode sugerir que as integrações do kDNA não sejam o fator determinante para o surgimento das manifestações clínicas. Entretanto, isso difere dos resultados obtidos ao se estudar a integração de kDNA em aves que, mesmo na ausência do parasito, desenvolveram cardiomiopatia (Diniz, 2011; Teixeira *et al.*, 2011). Estudos induzindo a integração do kDNA em modelo murino por técnicas moleculares modernas, como o CRISP/Cas-9 (Jiang e Doudna, 2017), poderão ajudar a elucidar essa questão.

6.3. Ativação da resposta imune

Nas fases iniciais da infecção, a alta parasitemia resultou na ativação da resposta Th1, com altas taxas de produção de TNF e IFN- γ , fato que já era esperado, visto que o organismo do hospedeiro constrói uma intensa resposta inflamatória visando à eliminação do parasito (Acevedo, Girard e Gómez, 2018; Basso, 2013). Entretanto, diferente do que já foi descrito na literatura (Abrahamsohn *et al.*, 2000; Sathler-Avelar *et al.*, 2009), nossos experimentos não detectaram aumento na produção de IL-4 na maioria dos animais, uma citocina reguladora que deveria reduzir os efeitos prejudiciais associados ao excesso de estimulação do sistema imunológico. Esse fato pode estar relacionado à concentração do inóculo utilizado para infectar os animais (Borges *et al.*, 2013). Ainda sobre essa citocina, a análise de correlação mostrou que uma maior carga parasitária no intestino se associa à produção de IL-4, o que pode justificar o fato da presença do parasito no intestino não estar correlacionado a um processo inflamatório mais intenso nem no intestino e nem no coração. Esse mesmo aspecto também ajudaria a compreender a importância do intestino atuar como órgão reservatório do *T. cruzi* (Lewis *et al.*, 2014; Silberstein *et al.*, 2018).

A redução acentuada na dosagem de citocinas pró-inflamatórias durante a fase crônica da infecção demonstra que a produção exacerbada de citocinas não seria o fator principal na patogênese da DC, como sugerido pela teoria de autoimunidade por ativação *bystander* (Gironès *et al.*, 2005). De interesse, em infecções em que a eliminação completa do patógeno não ocorre, a persistência do antígeno estimula o surgimento de células T "exaustas", com capacidade reduzida de produzir citocinas (Pack *et al.*, 2018).

Entretanto, é importante ressaltar que, ao observarmos a patogênese da DC como um todo, verificamos que a produção de IFN- γ está associada à produção de autoanticorpos contra o coração e ao processo inflamatório do tecido cardíaco. Assim, pode-se dizer que essa citocina tem um importante papel para o organismo "na saúde e na doença". Por exemplo, camundongos incapazes de produzir IFN- γ e seu receptor (IFNGR) mostram dificuldade de resistir naturalmente às infecções (Huang *et al.*, 1993). Ao mesmo tempo, o IFN- γ pode ser promotor de outras doenças, como as autoimunes. Reifenberg *et al.* (2007) mostraram que camundongos transgênicos que constitutivamente expressam IFN- γ em seus fígados desenvolvem miocardite crônica ativa. Ferreira *et al.* (2014) descreveram o duplo-papel do IFN- γ durante a DC crônica, o qual favorece a atuação do infiltrado inflamatório, ocorrendo diretamente sobre os cardiomiócitos.

Ainda na fase crônica da infecção, destaca-se uma maior produção de IL-5 por camundongos fêmeas infectados com a cepa Colombiana, grupo experimental que apresentou quadros severos de inflamação. Assim, vale ressaltar que essa interleucina estava correlacionada à resposta autoimune de produção de IgG contra o coração. Interessantemente, análises de criossecções de corações chagásicos crônicos detectou a produção de IL-5 próxima a regiões do infarto, notadamente na vizinhança de infartos graves após calcificação e fibrose (Sunnemark *et al.*, 1996). Entretanto, esse resultado contrasta com diversos estudos realizados, os quais demonstram que a IL-5 não tem influência sobre a evolução da DC (Kierszenbaum *et al.*, 1996; Basso, 2013). É possível que as diferenças nos resultados se devam à cepa e ao modelo experimental utilizado em cada estudo (Poveda *et al.*, 2014; León *et al.*, 2017).

Outro aspecto que chamou atenção dentre as citocinas produzidas a 100 dpi foi a maior produção de TNF por camundongos machos infectados com Colombiana, os quais também apresentavam infiltrados inflamatórios mais intensos. Curiosamente, Ferreira *et al.* (2003) demonstraram que os níveis de TNF- α são significativamente mais elevados em pacientes com DC com manifestações cardíacas graves, sugerindo que esta citocina pode ser prejudicial para o coração. Igualmente, Mariano *et al.* (2008) mostraram que animais que exibem uma produção aumentada de TNF- α apresentam maior parasitismo no coração e menores taxas de sobrevivência. Entretanto, em nosso estudo, essa citocina apenas apresentou correlação com a carga parasitária presente no coração, sem se associar à produção de autoanticorpos ou ao processo inflamatório. Isso indica que a persistência parasitária pode ser favorecida pela produção dessa citocina, a depender da cepa infectante e do sexo do animal.

A análise da ativação da resposta imune humoral dos animais dos diferentes grupos experimentais mostrou que, independentemente do sexo do animal, as imunoglobulinas são inicialmente produzidas contra as proteínas do parasito e, à medida que a infecção crônica ocorre o autorreconhecimento das proteínas intestinais e cardíacas, existindo, neste último caso, diferenças na produção dos autoanticorpos a depender da cepa infectante. Assim, a produção de IgM contra o parasito, na ausência de anticorpos contra o coração na maioria dos camundongos na fase aguda da infecção, demonstra que a resposta humoral se correlaciona inicialmente com o combate à parasitemia, mas não com a indução de doença autoimune. Nos animais em que se verificou a presença de autoanticorpos cardíacos na fase aguda, é possível que a autoimunidade esteja desempenhando um papel na cicatrização do tecido, em vez de produzir mais danos (Root-Bernstein e Fairweather, 2015), visto que não foi verificada correlação entre IgM anti-proteína cardíaca e inflamação tecidual.

De acordo com nossos resultados, a patogênese da cardiomegalia baseada na teoria de mimetismo molecular por reação cruzada (Bonney e Engman, 2015; De Bona *et al.*, 2018) só se mostrou respaldada em animais infectados com a cepa Colombiana, mas não com as cepas CL Brener e Y. Isso pode indicar que o mimetismo antigênico e a reatividade cruzada entre antígenos do parasito e do hospedeiro não são necessariamente deletérios e podem, até mesmo, serem

importantes para equilibrar a relação parasito-hospedeiro (Cardillo *et al.*, 2015). A esse respeito, Tekiel *et al.*, (1997) descreveram que a cepa infectante não interferiu na capacidade do soro do camundongo de reconhecer antígenos do coração. Além disso, os autores realizaram a adsorção dos soros com antígenos parasitários, o que não aboliu a autorreatividade, sugerindo que a autoimunidade não é dependente do parasito e não surge de mimetismo molecular.

De grande relevância, todos os animais passaram a apresentar autoanticorpos contra proteínas intestinais na fase crônica da infecção, a níveis que podem ser considerados baixos por estarem muito próximos ao ponto de corte estabelecido. Por se tratar do extrato total de proteínas do intestino, não foi possível estabelecermos qual o antígeno causador da reação cruzada, porém já existem relatos do envolvimento da proteína FI-160 do *T. cruzi* no autorreconhecimento de uma proteína de 48 kDA do plexo mioentérico (Voorhis e Eisen, 1989). Entretanto, essa mesma proteína também é expressa no nervo ciático e no cérebro, locais que não costumam ser acometidos durante a DC.

Desta forma, é provável que nossos resultados estejam evidenciando um processo basal de autoimunidade, o qual faz parte do curso natural de regeneração e cura de um organismo: ao serem danificadas, as células têm seus detritos removidos por componentes do sistema imunológico inato, que interagem com os autoanticorpos para que eles contribuam na limpeza das células deterioradas (Nahrendorf *et al.*, 2007). Portanto, células T e B autorreativas podem mediar a homeostase e a cicatrização, e não são necessariamente prejudiciais (Root-Bernstein e Fairweather, 2015). A transformação de uma autoimunidade benigna em uma doença autoimune está relacionada ao equilíbrio do perfil Th1/Th2 de citocinas (Rose, 1998) e, de acordo com nossos resultados, IFN- γ e IL-5 seriam citocinas envolvidas com a progressão para o autorreconhecimento danoso, conforme discutido anteriormente.

6.4. Teoria integradora da patogênese da doença de Chagas – uma nova proposta

Nossos resultados nos permitiram desenvolver uma visão mais dinâmica da evolução da DC, onde vários elementos interagem ao longo do tempo. Isso realça a necessidade de estudarmos a patogênese da DC com uma abordagem multifatorial. Assim, baseados em nossos resultados e em dados já disponíveis na literatura, propomos uma nova teoria integradora para a patogênese da DC (Figura 17), a qual poderá variar em virtude da cepa infectante.

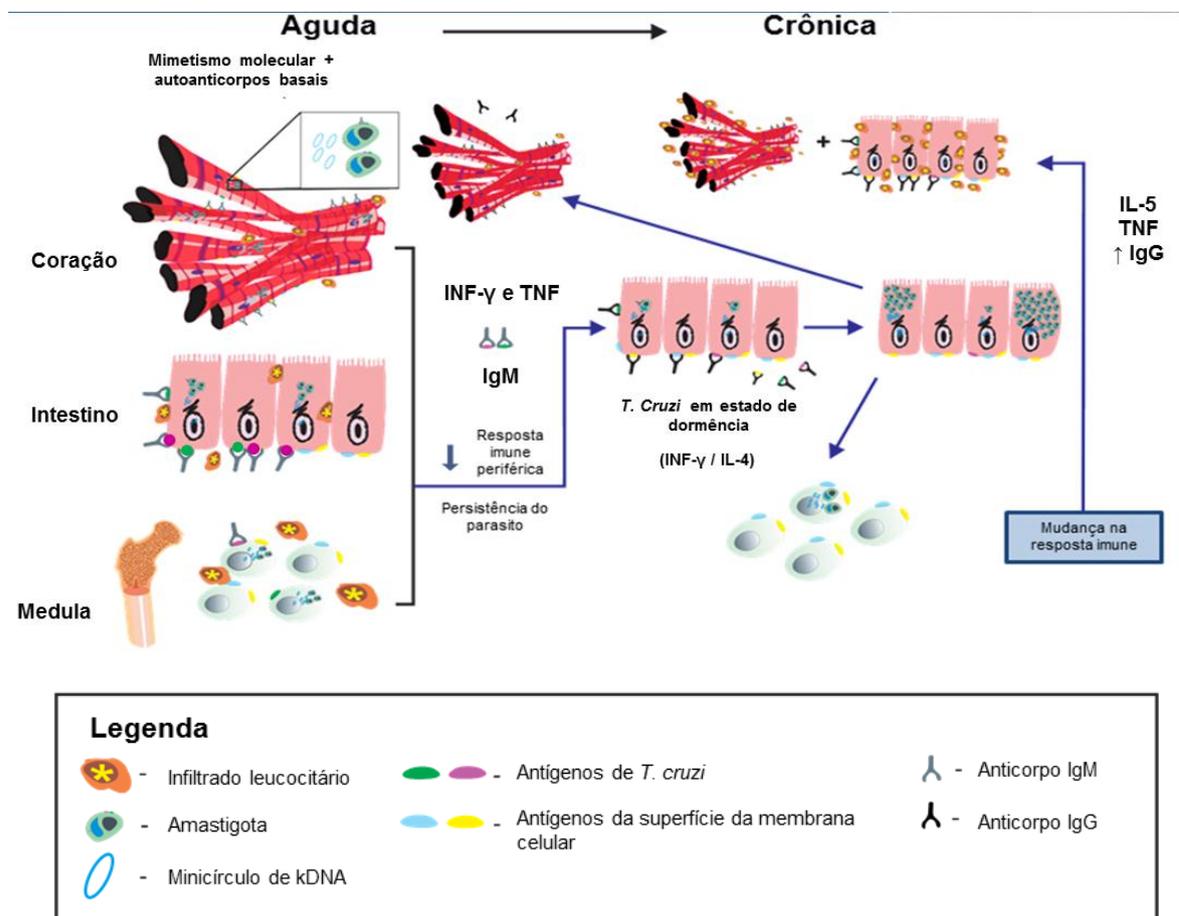


Figura 17. Teoria integradora da patogênese da doença de Chagas.

Após a invasão inicial, segue-se um momento de intensa multiplicação do *T. cruzi*, com disseminação por todo o organismo. A presença do parasito é reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro, com ativação das respostas imune

inata e adaptativa. Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF, são produzidas visando à eliminação do organismo invasor. Igualmente, imunoglobulinas da classe IgM, específicas contra antígenos de *T. cruzi*, tentam combater o avanço da infecção. O aumento desses anticorpos se correlaciona com a produção de IgM anti-proteínas cardíacas, sinalizando um esforço sinérgico para a recuperação do organismo, onde os autoanticorpos estariam envolvidos na cicatrização do tecido (Root-Bernstein e Fairweather, 2015), corroborando a ausência de correlação entre IgM anti-proteína cardíaca e IgM anti-proteína intestinal com inflamação tecidual.

Paralelamente, à medida que as células estão sendo invadidas pelo *T. cruzi*, ocorre a transferência lateral de minicírculos de kDNA para o genoma hospedeiro, evento que pode representar um mecanismo adaptativo do parasito. A presença do parasito na medula óssea pode resultar em alteração das células B imaturas da medula e redução das células B maduras na periferia (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2018), o que favorece a persistência do protozoário no organismo.

Mesmo com uma menor ativação das células B, o estresse representado pela ativação da resposta imune levaria o *T. cruzi* a se resguardar no interior das células, entrando em um estado de dormência (Dumoulin e Burleigh, 2018). Como demonstrado pelos recentes sistemas de imagens de bioluminescência em tempo real, o principal órgão reservatório do *T. cruzi* é o intestino (Lewis *et al.*, 2014; Silberstein *et al.*, 2018), o que poderia ser explicado pela correlação da presença do parasito no intestino e a produção das citocinas IFN- γ e IL-4, as quais vão atuar sobre a infecção sem estimular em excesso a resposta imune, evitando o autorreconhecimento deletério.

A quebra do equilíbrio entre essas citocinas poderia retirar o *T. cruzi* da latência, e este voltaria a se multiplicar e a circular pelo organismo, alcançando o coração e medula novamente. Esse fenômeno pode ocorrer várias vezes ao longo da vida de um indivíduo, de maneira intermitente (Lewis e Kelly, 2016).

A elevação da carga parasitária no intestino promove um aumento da produção de imunoglobulinas IgG anti-*T. cruzi*, indicando que a saída do parasito do aparelho gastrointestinal ativaria rapidamente a resposta imune humoral protetiva à infecção. Esse aumento também resulta na produção de autoanticorpos cardíacos, possivelmente por mimetismo molecular, que se associam ao processo inflamatório.

Em seguida, o aumento do parasitismo do coração promove a produção de IgG contra proteínas do coração e intestino e correlaciona-se com o processo inflamatório em ambos os órgãos. Esses aspectos indicam que o mimetismo molecular se vincula ao dano tecidual observado na fase crônica da DC.

Já a migração do parasito para a medula não induz a produção de autoanticorpos da classe IgG, mas associa-se ao processo inflamatório observado no coração e no intestino, mostrando que o comprometimento das células mielóides seria um fator desencadeador das lesões nesses órgãos. Uma vez que a integração de kDNA em células da medula está correlacionada com a produção de autoanticorpos cardíacos na fase crônica da infecção, esse fenômeno também ajuda a impulsionar a autoimunidade na DC.

7. CONCLUSÃO

- O sexo não se mostrou determinante para o surgimento de lesões cardíacas nem intestinais, bem como o parasitismo é semelhante entre machos e fêmeas.
- A cepa tem relação com o grau de lesão tecidual e, conseqüentemente, com a patogênese. Os dados da presente pesquisa demonstram que a cepa Colombiana se apresentou como mais virulenta.
- Existe relação entre carga parasitária e evolução da doença. Nossos dados demonstram que a elevação da carga parasitária nos tecidos cardíaco e intestinal se relaciona a produção de autoanticorpos contra proteínas do coração. Enquanto a presença do parasito na medula óssea tem relação com o processo inflamatório nos tecidos cardíaco e intestinal.
- A porcentagem de animais, considerando cada tecido, que apresentaram integração de kDNA na fase crônica se assemelha a porcentagem de indivíduos que desenvolvem as manifestações clínicas nessa fase. A quantidade de integrações no coração se relacionou a quantidade de integrações na medula e as duas se correlacionam com a quantidade de IgG anti-*T.cruzi* e anti-proteínas cardíacas.
- A produção de IgG anti-*T.cruzi* e anti-proteínas cardíacas e intestinais teve relação com o processo inflamatório cardíaco. A produção de IgG anti-proteína cardíaca também teve relação com o processo inflamatório no tecido intestinal.
- A diminuição das citocinas pró-inflamatórias durante a fase crônica demonstra que a ativação *bystander* não seria o fator principal na patogênese da DC. Os dados apontam para o fato de que uma maior carga parasitária no intestino se associa à produção de IL-4 e que a produção de IFN- γ se relacionou com a produção de autoanticorpos contra o coração e ao processo inflamatório do tecido cardíaco.
- A análise dos nossos resultados juntamente com a análise dos dados já registrados na literatura permitiu o desenvolvimento de uma observação mais

dinâmica e inter-relacionada do processo de patogênese da doença de Chagas, verificando-se que vários elementos das teorias de persistência do parasito e autoimunidade interagem ao longo do tempo. O que reforça a necessidade de uma abordagem multifatorial. Dessa forma, foi possível estabelecer uma nova teoria, que pode variar de acordo com a cepa infectante. Conclui-se, portanto, que a teoria integradora da patogênese da doença de Chagas contribui para melhor entendimento dessa enfermidade.

8. PERSPECTIVAS

Em vista dessa nova teoria sugerida, vários aspectos ainda precisam ser analisados, tais como:

1. A interação da imunidade inata com os demais fatores envolvidos na patogênese da doença de Chagas;
2. Estabelecer os fatores que rompem o equilíbrio entre as citocinas;
3. A importância do *background* genético do hospedeiro na progressão da doença;
4. Verificar se a transferência de minicírculos realmente traz algum benefício para *T. cruzi*;
5. Determinar o sítio de integração do kDNA associado às alterações de funcionamento das células do sistema imune
6. Estabelecer porque o tempo é um fator determinante para o desenvolvimento da doença;
7. Avaliar o papel da resposta imune periférica;
8. Utilizar o conhecimento da teoria integradora da doença de Chagas para elaborar novas opções de prevenção e tratamento.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, L. C. J. *et al.* T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 11–12, p. 1184–1195, 2005.
- ABEL, L. C. J.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: Identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 11, p. 1305–1308, 1997.
- ABRAHAMSOHN, I. A.; SILVA, A. P. G. DA; COFFMAN, R. L. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 1975–1979, 2000.
- ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. August, p. 1–23, 24 ago. 2018.
- ACOSTA RODRIGUEZ, E. V. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: Can we strike first? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 137–142, 2007.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 31 jul. 2014.
- ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 17–27, mar. 1990.
- ANDRADE, V. *et al.* Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 143–154, set. 1985.
- AOKI, M. P. *et al.* Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 286, n. 2, p. C206-12, 2004.

- ARAUJO, P. F. *et al.* Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 437–446, jun. 2017.
- ASSUNÇÃO, A. N. *et al.* Chagas' heart disease: gender differences in myocardial damage assessed by cardiovascular magnetic resonance. **Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance**, v. 18, n. 1, p. 88, 28 jan. 2016.
- AZEVEDO, P. H. R. *et al.* Anti-serum validation for use in immunohistochemistry for *Trypanosoma cruzi* detection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 467–474, ago. 2018.
- BARRETTO, A. C. *et al.* [Male sex. Prognostic factor in Chagas' disease]. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 60, n. 4, p. 225–7, abr. 1993.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.
- BERMEJO, D. A. *et al.* BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 5, p. 1–12, 4 maio 2010.
- BONA, E. DE *et al.* Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1–8, 2018.
- BONNEY, K.; ENGMAN, D. Chagas Heart Disease Pathogenesis: One Mechanism or Many? **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p. 510–518, 1 set. 2008.
- BONNEY, K. M. *et al.* Heat-killed *Trypanosoma cruzi* induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.
- BONNEY, K. M. *et al.* Cardiac damage induced by immunization with heat-killed *Trypanosoma cruzi* is not antibody mediated. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2013.
- BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. annurev-pathol-020117-043711, 2019.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back, looking ahead. **American Journal of Pathology**, v. 185, n.

6, p. 1537–1547, 2015.

BORGES, D. C. *et al.* Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.

Immunology, v. 138, n. 2, p. 145–156, 2013.

BOSSENO, M.-F. *et al.* Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico.

Journal of clinical microbiology, v. 40, n. 2, p. 627–32, fev. 2002.

BRABIN, L.; BRABIN, B. Parasitic Infections in Women and their consequences.

Advances in Parasitology, v. 31, n. i, p. 1–81, 1992.

BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory.

PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 10, n. 8, p. 1–19, 29 ago. 2016.

CAMANDAROBA, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism.

International Journal of Experimental Pathology, v. 87, n. 3, p. 209–217, 2006.

CARDILLO, F. *et al.* B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection.

Immunology, v. 122, n. 4, p. 584–95, dez. 2007.

CARDILLO, F. *et al.* Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. 1–8, 2015.

CARRANZA, J. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 9, p. 963–973, 2009.

CASTRO-SESQUEN, Y. E. *et al.* *Cavia porcellus* as a model for experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 281–288, 2011.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl, n. August, p. 113–22, 30 out. 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.

104, n. i, p. 31–40, 2009.

CRUZ, J. S. *et al.* Altered cardiomyocyte function and *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 1028–1033, 2016.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: A case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, v. 39, n. 1, p. 41–54, 2006.

CURA, C. I. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. **Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 516–521, 2012.

DHIMAN, M. *et al.* MnSODtg Mice Control Myocardial Inflammatory and Oxidative Stress and Remodeling Responses Elicited in Chronic Chagas Disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, n. 5, p. 1–13, 2013.

DIAS, J. C. P. *et al.* [Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 25, n. spe, p. 7–86, jun. 2016.

DINIZ, M.C.C.G. **Herança e fixação de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de *Gallus gallus*: alterações genotípicas e miocardiopatia autoimune.** Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, p. 171. 2012.

DUMOULIN, P. C.; BURLEIGH, B. A. Stress-Induced Proliferation and Cell Cycle Plasticity of Intracellular *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. **mBio**, v. 9, n. 4, p. 1–15, 10 jul. 2018.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 287–292, jun. 2008.

EL-SAYED, N. M. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 15 jul. 2005.

ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta tropica**, v. 81, n. 2, p. 123–32, fev. 2002.

ERSCHING, J. *et al.* A Human Trypanosome Suppresses CD8+ T Cell Priming by

Dendritic Cells through the Induction of Immune Regulatory CD4⁺ Foxp3⁺ T Cells. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. 1–23, 22 jun. 2016.

FERREIRA, L. R. P. *et al.* Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. **World journal of cardiology**, v. 6, n. 8, p. 782–90, 26 ago. 2014.

FERREIRA, R. C. *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 407–11, abr. 2003.

GARCIA, M. N. *et al.* Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 151–156, 2017.

GASPARIM, A. Z. *et al.* Short Communication Epidemiological and clinical profile of patients with Chagas disease in the Central-North area of Paraná , Southern Brazil. v. 51, n. May 2017, p. 225–230, 2018.

GIRONÈS, N. *et al.* Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1107, p. 434–444, 2007.

GIRONÈS, N.; CUERVO, H.; FRESNO, M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 296, p. 89–123, 2005.

GONZÁLEZ, C. I.; ORTIZ, S.; SOLARI, A. Colombian *Trypanosoma cruzi* major genotypes circulating in patients: Minicircle homologies by cross-hybridization analysis. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 14, p. 1685–1692, 2010.

GUERRA-SILVEIRA, F.; ABAD-FRANCH, F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–13, 24 abr. 2013.

GUIMARÃES, A.J.B.A. **Associação de locus das mutações de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma com manifestação clínica da doença de chagas**. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, p. 142. 2014.

GUIMARO, M. C. *et al.* Inhibition of Autoimmune Chagas-Like Heart Disease by Bone Marrow Transplantation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12,

2014.

GUTIERREZ, F. R. S. *et al.* The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 673–685, 2009.

HECHT, M. M. *et al.* Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, 2010.

HECKER, H. *et al.* Functional morphology of trypanosome chromatin. **Parasitology Today**, v. 11, n. 2, p. 79–83, 1995.

HERRERA, C. *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 535–539, 2007.

_____. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. **Journal of Parasitology Research**, v. 2009, p. 1–9, 2009.

HOFT, D. F.; EICKHOFF, C. S. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. **Infection and immunity**, v. 73, n. 8, p. 4934–40, ago. 2005.

HUANG, S. *et al.* Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5102, p. 1742–5, 19 mar. 1993.

IOANNIDIS, P. *et al.* Extensively duplicated and transcriptionally active recent lateral gene transfer from a bacterial Wolbachia endosymbiont to its host filarial nematode *Brugia malayi*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 20–30, 2013.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. **Annu.Rev.Biophys**, v. 46, n. March, p. 505–529, 2017.

JUNQUEIRA, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, n. September, p. e29, 15 set. 2010.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 210–223, 1999.

KIERSZENBAUM, F.; LOPEZ, H. M.; SZTEIN, M. B. *Trypanosoma cruzi* downregulates the production of interleukin-2, interferon-gamma, interleukin-4 and

- interleukin-5 by activated human lymphocytes. **The Journal of parasitology**, v. 82, n. 4, p. 652–6, ago. 1996.
- KLEIN, S. L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infections. **Parasite Immunology**, v. 26, n. September, p. 247–264, 2004.
- KRIEGER, N. Genders, sexes, and health: What are the connections - And why does it matter? **International Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 4, p. 652–657, 2003.
- KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite immunology**, v. 20, n. 5, p. 207–16, maio 1998.
- LA CAVA, A. Regulatory immune cell subsets in autoimmunity. **Autoimmunity**, v. 44, n. 1, p. 1–2, fev. 2011.
- LEE, Y. *et al.* Evolution and expression of chimeric POTE-actin genes in the human genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 47, p. 17885–17890, 2006.
- LEÓN, C. M. *et al.* Murine models susceptibility to distinct *Trypanosoma cruzi* i genotypes infection. **Parasitology**, v. 144, n. 4, p. 512–519, 2017.
- LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. Autoimmunity in Chagas heart disease. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 555–61, 2001.
- LEWIS, M. D. *et al.* Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1285–1300, set. 2014.
- LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 899–911, 2016.
- LIU, B. *et al.* Fellowship of the rings: The replication of kinetoplast DNA. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 363–369, 2005.
- LLEWELLYN, M. S. *et al.* Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, 2009.
- LUKES, J. *et al.* Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure.

Eukaryotic cell, v. 1, n. 4, p. 495–502, ago. 2002.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. D. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas**, v. 43, n. 5, p. 483–485, 2010.

MARCON, G. E. B. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 85–91, 2011.

MARCUS, E. Retraction controversy. **Cell**, v. 123, n. 2, p. 173–5, 21 out. 2005.

MARIANO, F. S. *et al.* The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 825–833, 2008.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.

MARSHALL, G. D. *et al.* Exploring the Biological Contributions to Human Health: Does Sex Matter? **Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine**, v. 10, n. 5, p. 433–439, 26 jun. 2001.

MARTINEZ-PEREZ, A. *et al.* Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. **Acta Tropica**, v. 157, p. 145–150, maio 2016.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 167–174, fev. 2014.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219–1224, 2009.

MCCORMICK, T. S.; ROWLAND, E. C. *Trypanosoma cruzi*: recognition of a 43-kDa muscle glycoprotein by autoantibodies present during murine infection. **Experimental parasitology**, v. 77, n. 3, p. 273–81, nov. 1993.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of parasitology**, v. 64, n. 3, p. 475–82, jun. 1978.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Boletim Epidemiológico. Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Secretaria de Vigilância em saúde**, v. 46, n. 2358–9450, p. 1–9, 2015.

- MOORE, S. L.; WILSON, K. Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5589, p. 2015–8, 20 set. 2002.
- MORAES, A.S. **Dinâmica Das Integrações De Minicírculos De Kdna De *Trypanosoma Cruzi* No Genoma Hospedeiro**. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, p.75. 2016.
- MORILLO, C. A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.
- MÜLLER, U. *et al.* Immunosuppression in Experimental Chagas Disease Is Mediated by an Alteration of Bone Marrow Stromal Cell Function During the Acute Phase of Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. December, p. 1–12, 2018.
- NAGAJYOTHI, F. *et al.* High Fat Diet Modulates *Trypanosoma cruzi* Infection Associated Myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2014.
- NAHRENDORF, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 12, p. 3037–3047, 2007.
- NAVARRO, I. C. *et al.* MicroRNA transcriptome profiling in heart of *Trypanosoma cruzi*-infected mice: Parasitological and cardiological Outcomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–17, 2015.
- NDAO, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*, Infection of Squirrel Monkeys: Comparison of Blood Smear Examination, Commercial Enzyme-linked Immunosorbent Assay, and Polymerase Chain Reaction Analysis as Screening Tests for Evaluation of Monkey-Related Injuries. **Comparative Medicine**, v. 50, n. 6, p. 658–665, 2000.
- NITZ, N. *et al.* Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: Insights into human Chagas disease. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 175–186, 2004.
- NYBO, K. Immunology and immunochemistry: ELISA. **BioTechniques**, v. 49, n. 2, p. 555–556, 2010.
- OKUBO, M. *et al.* A novel complex deletion–insertion mutation mediated by Alu

repetitive elements leads to lipoprotein lipase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 92, n. 3, p. 229–233, nov. 2007.

OLIVEIRA, R. P. *et al.* The Population Structure of *Trypanosoma cruzi*: Expanded Analysis of 54 Strains Using Eight Polymorphic CA-repeat Microsatellites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 65–70, 1999.

ORTIZ, S.; OSORIO, G.; SOLARI, A. Minicircle classes heterogeneity within the TcIII and TcIV discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, 2017.

PACK, A. D. *et al.* Highly competent, non-exhausted CD8+ T cells continue to tightly control pathogen load throughout chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 11, p. e1007410, 2018.

PETRAY, P. B. *et al.* Effect of anti-gamma-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Immunology letters**, v. 35, n. 1, p. 77–80, 27 jan. 1993.

PINTO, A. Y. DAS N. *et al.* Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602–614, dez. 2008.

POVEDA, C. *et al.* Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). **PloS one**, v. 9, n. 3, p. 1–8, 2014.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

RAGONE, P. G. *et al.* Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. **Acta Tropica**, v. 123, n. 3, p. 196–201, 2012.

REIFENBERG, K. *et al.* Interferon- γ induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. **American Journal of Pathology**, v. 171, n. 2, p. 463–472, 2007.

RIBEIRO, M. *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model.

Experimental parasitology, v. 162, p. 1–6, mar. 2016.

RIOS, A. *et al.* Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 3–8, jan. 2018.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 476–88, jul. 2001.

RODRIGUES-DOS-SANTOS, Í. *et al.* Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 11, p. e0006939, 2018.

RODRIGUES, M. M. *et al.* Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 3855–63, ago. 1999.

ROELLIG, D. M. *et al.* Genetic Variation and Exchange in *Trypanosoma cruzi* Isolates from the United States. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

ROOT-BERNSTEIN, R.; FAIRWEATHER, D. Unresolved issues in theories of autoimmune disease using myocarditis as a framework. **Journal of Theoretical Biology**, v. 375, p. 101–123, jun. 2015.

ROSE, N. R. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. **Seminars in immunology**, v. 10, n. 1, p. 5–13, fev. 1998.

SABINO, E. C. *et al.* Ten-Year incidence of chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. **Circulation**, v. 127, n. 10, p. 1105–1115, 2013.

SANCHES, T. L. M. *et al.* The use of a heterogeneously controlled mouse population reveals a significant correlation of acute phase parasitemia with mortality in Chagas disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–8, 2014.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, p. 1–20, 2018.

SANTANA, C.A. **Influência da via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na carga parasitária e produção de anticorpos específicos**. Dissertação (Mestrado

em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, p. 95. 2015.

SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. L. The immunology of Experimental Chagas Disease III. Rejection of Allogeneic Heart Cells in Vitro. **Journal of Experimental Medicine**, v. 140, p. 38–53, 1974.

SATHLER-AVELAR, R. *et al.* Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: What must be understood? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 246–251, 2009.

SEN, G.; ÖSTLIN, P. Gender inequity in health: why it exists and how we can change it. **Global Public Health**, v. 3, n. sup1, p. 1–12, 2008.

SILBERSTEIN, E. *et al.* A novel nanoluciferase-based system to monitor *Trypanosoma cruzi* infection in mice by bioluminescence imaging. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195879, 19 abr. 2018.

SILVA, J. S. *et al.* Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 169–174, 1 jan. 1992.

SIMÕES-BARBOSA, A. *et al.* Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 833–843, 2006.

SIMÕES, M. V. *et al.* Cardiomiopatia da Doença de Chagas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173–189, 2018.

SIMPSON, L. Structure and Function of Kinetoplast DNA. **The Journal of Protozoology**, v. 20, n. 1, p. 2–8, 1973.

SOUZA, D. D. S. M. *et al.* Atualização em Doença de Chagas: Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas aguda no Brasil e na América Latina. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v. 26, n. 4, p. 222–229, 2016.

SOUZA, R. T. *et al.* Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

SPOTORNO O, A. E.; CÓRDOVA, L.; SOLARI I, A. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences.

Infection, Genetics and Evolution, v. 8, n. 6, p. 898–900, 2008.

SUNNEMARK, D. *et al.* Cytokine production in hearts of *Trypanosoma cruzi*-infected CBA mice: Do cytokine patterns in chronic stage reflect the establishment of myocardial pathology? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 44, n. 5, p. 421–429, 1996.

TANOWITZ, H. B. *et al.* Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 276–284, 2017.

TARLETON, R. .; ZHANG, L. Chagas Disease Etiology: Autoimmunity or Parasite Persistence? **Parasitology Today**, v. 15, n. 3, p. 94–99, mar. 1999.

TEIXEIRA, A. R. L.; GOMES, C.; *et al.* *Trypanosoma cruzi* in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, 2011.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, jul. 2011.

TEKIEL, V. S.; MIRKIN, G. A.; GONZALEZ CAPPA, S. M. Chagas' disease: Reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 115, n. 5, p. 495–502, 1997.

TORO, G. C.; GALANTI, N. H 1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. **Experimental cell research**, v. 174, n. 1, p. 16–24, jan. 1988.

TZELEPIS, F.; PERSECHINI, P. M.; RODRIGUES, M. M. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. **PloS one**, v. 2, n. 4, p. 1–9, 25 abr. 2007.

VARGAS, A. *et al.* Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 1–8, 2018.

VAZQUEZ, B. P. *et al.* Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 3 abr. 2015.

VOORHIS, W. C. VAN *et al.* FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain two distinct epitopes that mimic nervous tissues.

The Journal of experimental medicine, v. 178, n. 2, p. 681–94, 1 ago. 1993.

WEISS, R. A. Exchange of Genetic Sequences Between Viruses and Hosts. *In*: **Current topics in microbiology and immunology**. [s.l: s.n.]. v. 351p. 1–29.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease** (American trypanosomiasis). <<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em 28 de maio de 2018.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–4, nov. 2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44–48, 2011.

ZREIN, M. *et al.* A novel antibody surrogate biomarker to monitor parasite persistence in *Trypanosoma cruzi*-infected patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2018.

ZUK, M.; MCKEAN, K. A. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. **International journal for parasitology**, v. 26, n. 10, p. 1009–23, out. 1996.