

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Farmácia - EF  
Laboratório de Morfopatologia – LMP

**AVALIAÇÃO DO DUODENO E CÓLON DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR  
VIA ORAL COM A CEPA VL-10 DO *Trypanosoma cruzi***

ALINE TONHELA FERRAZ

OURO PRETO  
NOVEMBRO DE 2018

ALINE TONHELA FERRAZ

**AValiação DO DUODENO E CÓLON DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR  
VIA ORAL COM A CEPA VL-10 DO *Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico generalista.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Melo de Abreu Vieira

Co-orientadora: Ms. Lívia Mendes Carvalho

OURO PRETO

2018

F368a

Ferraz, Aline Tonhela.

Avaliação do duodeno e cólon de camundongos infectados por via oral com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Aline Tonhela Ferraz. - 2018.

42f.: il.: color; grafs; tabs; quadros; fluxograma.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Melo de Abreu Viera.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. MSc<sup>a</sup>. Lívia Mendes Carvalho.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Análises Clínicas.

1. Chagas, doença de. 2. *Trypanosoma cruzi*. I. Viera, Paula Melo de Abreu. II. Carvalho, Lívia Mendes. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: [ficha.sisbin@ufop.edu.br](mailto:ficha.sisbin@ufop.edu.br)



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

### TERMO DE APROVAÇÃO

## Avaliação do duodeno e cólon de camundongos infectados por via oral com a cepa vl-10 do trypanosoma cruzi

Trabalho de Conclusão de Curso defendido por **Aline Tonhela Ferraz** e aprovado com nota 10, em 28 de Novembro de 2018, pela comissão examinadora:

*Wanderson Geraldo de Lima*

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima  
DECBI-ICEB-UFOP

*Katia S. Fonseca*

Dra. Katia da Silva Fonseca  
NUPEB-UFOP

*Livia Mendes Carvalho*

Doutoranda Livia Mendes Carvalho (Coorientadora)  
PPG CEBIOL-ICEB -UFOP

*Paula Melo A. Vieira*

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu (Orientadora)  
DECBI-ICEB-UFOP

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a São Judas Tadeu pela interseção!

Aos meus pais por toda força, carinho, paciência e por não medirem esforços para fazer com que o sonho de ser farmacêutica se tornasse realidade, vocês foram meu motivo para persistir e nunca desistir.

À minha irmã Amanda, por todo carinho e por me fazer sorrir até nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Caio, por sempre estar ao meu lado me apoiando em todo momento, me mostrando que sou capaz e por todo amor e carinho que foram essências para tornar tudo mais fácil, te amo!

À professora Cláudia pelo exemplo de pesquisadora e por todo ensinamento.

Agradeço imensamente a todos do Laboratório de Morfopatologia por todo apoio e ajuda, sem vocês esse TCC não teria saído, especialmente a Flávia por ter me acolhido desde o primeiro dia no laboratório, a Thays, Vivi, Thaís por toda ajuda e ensinamentos.

Aos meus amigos Lucas e Amanda, por sempre estarem no meu lado mesmo que longe, vocês sabem o quanto são especiais para mim, gratidão por todo apoio e carinho!

A todos meus familiares, ir para casa revigorava minhas forças para continuar, cada abraço dado e oração se fizeram importante. Em especial a minha madrinha Chanda e a tia Solange, por sempre estarem próximas a mim, o carinho de vocês foi essencial!

Obrigada Kátia e Wanderson por terem aceitado o convite para minha banca!

À Lívia pela co-orientação, obrigada por todo apoio!

E, por fim, mas não menos importante a Paula, pela orientação e por ter me acolhido no laboratório, obrigada por despertar em mim a paixão pela pesquisa e por sempre estar disposta ajudar, sem você nada disso seria possível!

## EPÍGRAFE

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser vitoriosa.”

Albert Einstein

## RESUMO

A doença de Chagas é uma protozoonose endêmica na América Latina, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*. No Brasil após programa de controle do seu principal vetor domiciliar, o *Triatoma infestans*, o perfil epidemiológico se modificou, e após inúmeros surtos devido a infecção por ingestão de alimentos contaminados pela forma tripomastigota metacíclica, a infecção pela via oral se tornou a principal via de transmissão da doença no país. Nesse sentido, o trato gastrointestinal se tornou a principal via de entrada para o parasito, porém pouco se sabe do perfil parasitológico e imunopatológico envolvendo esta infecção. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil leucocitário sistêmico, a carga parasitária e o processo inflamatório no duodeno e cólon de camundongos *Swiss* infectados pela via oral com a cepa VL-10 do *T. cruzi*. Para isso, 130 camundongos foram distribuídos em três grupos experimentais: controle não infectado; infectado pela via intraperitoneal (VIP) e infectado pela via oral (VO). Foram inoculadas nesses animais  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas metacíclicas provenientes de culturas acelulares por gavagem incompleta (VO) ou por via intraperitoneal (VIP). Foram realizadas eutanásias nos dias 14, 21 e 28 após a infecção (DAI), onde foram coletados fragmentos do duodeno e do cólon, obtendo então curva de parasitemia e a taxa de sobrevivência; a fenotipagem de células mononucleares (monócitos, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B) do sangue periférico por citometria de fluxo; o parasitismo tecidual pela técnica de PCR em tempo real e o processo inflamatório, por meio da coloração de Hematoxilina-Eosina. Em ambos os grupos o pico de parasitemia ocorreu no 17° DAI, a taxa de sobrevivência no grupo VIP foi de 7,23%, já no grupo VO observou-se uma taxa de 23,40%, no 28° DAI. No que se diz respeito a resposta imune, observou-se aumento de monócitos em ambos os grupos no 14° e 21° DAI. Não foi observada alteração no percentual de linfócitos B e T CD4<sup>+</sup> em relação aos animais controle, já para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi observado que independente da via de inoculação houve um aumento no percentual dessas células no 21° DAI. Além disso observa-se um aumento no 21° DAI quando comparado ao 14° DAI no grupo VIP. O parasitismo mostrou-se aumentado no duodeno no grupo VO no 14 DAI, com uma queda no 21 DAI; já no cólon foi observado maior carga parasitária no grupo VIP quando comparado com o grupo VO. Em relação ao processo inflamatório no duodeno o grupo VO apresentou intenso processo inflamatório se mantendo durante todo o experimento, já no grupo VIP observa-se queda a partir do 21° DAI. Em relação ao cólon, o grupo VIP manteve a inflamação aumentada quando comparado ao grupo controle, no grupo VO houve aumento apenas a partir do 21° DAI. Diante disso, esses dados sugerem que infecção pela via oral possui um distinto perfil de resposta parasitológica e histopatológica, observando elevada carga parasitária no duodeno dos animais infectados pela via oral, o que pode se relacionar com a manutenção do processo inflamatório neste órgão, não sendo observado o mesmo perfil nos animais infectados pela via intraperitoneal.

## ABSTRACT

The Chagas disease is an endemic protozoan in Latin America, in Brazil after control program of your principal household vector *Triatoma infestans*, the epidemiological profile has been modified, and after outbreaks the infection for food contaminated intake with the metacyclic form of *Trypanosoma cruzi*, the oral infection if you do the main route of the disease in the country. The gastrointestinal tract became the main route of entry for the parasite, but little is known about the parasitological and immunopathological profile involving this infection. Thus, the objective of this study was to evaluate the systemic leukocyte profile, the parasitic load and the inflammatory process in the duodenum and colon of Swiss mice infected with *T. cruzi* VL-10 strain. For this, 130 mice were distributed in three experimental groups: uninfected control; infected by intraperitoneally route (IR); infected by oral route (OR). These animals received an inoculum of  $1 \times 10^5$  metacyclic trypomastigotes forms from acellular cultures by incomplete gavage (OR) or intraperitoneally (IR). Euthanasia was performed on days 14, 21 and 28 after the infection (DAI), where fragments of the duodenum and colon were collected, thus obtaining the parasitemia curve and the survival rate; the phenotyping of mononuclear cells (monocytes,  $CD4^+$  T,  $CD8^+$  and B lymphocytes) of the peripheral blood by flow cytometry; Tissue parasitism using the real-time PCR technique and the inflammatory process, using the Hematoxylin-Eosin staining. In both groups the peak of parasitemia occurred in the 17th DAI, the survival rate in IR group was 7,23% and the OR group was 23,40%. Regarding the immune response, monocytes increased in both groups at 14th and 21th DAI. No change was observed in the percentage of B and  $CD4^+$  T lymphocytes in relation to the control animals, already the  $CD8^+$  T lymphocytes independent of the route of inoculation there was an increase in the percentage at 21th DAI, in addition there was an increase at 21th DAI when compared at 14th with the IR group. The parasitism was increased in the duodenum in the OR group at 14 th DAI, with a drop at 21th DAI; already in the colon was observed a greater parasitic load in the IR group when compared to the OR group. Regarding to the inflammatory process in the duodenum the OR group presented an intense inflammatory process during throughout the experiment, already in the IR group, there was a decrease from the 21th DAI, in the colon the IR group maintained the inflammation increase when compared to the control group, in the OR group there was no increase from the 21th DAI. Therefore, these data suggest that oral infection has a different profile of parasitological and histopathological response, observing a high parasitic load in the duodenum of animals infected by the oral route, which may be related to the maintenance of the inflammatory process in this organ, being that the same profile wasn't observed in the animals infected by the intraperitoneally route.



## LISTA DE FIGURAS

- Fluxograma 1:** Delineamento experimental com distribuição dos animais que foram utilizados para caracterização da lesão nos órgãos do trato gastrointestinal.....12
- Figura 1:** Médias das curvas de parasitemia dos camundongos *Swiss* infectados por formas tripomastigotas metacíclicas por via intraperitoneal (VIP) (em cinza) ou por via oral (VO) (em preto) com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*.....18
- Figura 2:** Taxa de sobrevivência dos camundongos *Swiss* infectados por via intraperitoneal (VIP) ou por via oral (VO) com  $1,0 \times 10^5$  tripomastigotas metacíclicas da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*.....19
- Figura 3:** Imunofenotipagem de células do sangue periférico de Camundongos *Swiss* infectados com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* por via intraperitoneal (VIP) ou por via oral (VO) nos dias 14, 21 e 28 após a infecção.....20
- Figura 4:** Quantificação do parasitismo tecidual no duodeno e cólon de camundongos *Swiss* com eutanasiados nos dias 14, 21 e 28 após infecção experimental por via intraperitoneal (VIP) e por via oral (VO) com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*.....21
- Figura 5:** Avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório no duodeno e cólon de camundongos *Swiss*, eutanasiados nos dias 14, 21 e 28 após a infecção experimental com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*.....22
- Figura 6:** Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular do duodeno de camundongos após a infecção pela via oral (VO) e via intraperitoneal (VIP) com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*.....23
- Figura 7:** Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular do cólon de camundongos após a infecção pela via oral (VO) e via intraperitoneal (VIP) com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*.....24

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Quadro 1:** Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares.....14

**Tabela 1:** Níveis parasitêmicos, dia do pico de parasitemia, períodos pré-patente e patente dos camundongos *Swiss* infectados por formas tripomastigotas metacíclicas por via intraperitoneal (VIP) (em cinza) ou por via oral (VO) (em preto) com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*.....18

## ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| <i>T. cruzi</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i>                                  |
| TM              | Tripomastigota Metacíclico                                |
| TS              | Tripomastigota Sanguíneo                                  |
| SMF             | Sistema Mononuclear Fagocitário                           |
| SNE             | Sistema Nervoso Entérico                                  |
| μL              | Microlitros   |
| mL              | Mililitros  |
| EDTA            | Ácido etilenodiamino tetra-acético                        |
| LIT             | Liver Infusion Triptose                                   |
| BOD             | Biochemical Oxygen Demand                                 |
| rpm             | Rotações por minuto                                       |
| PBS             | Tampão fosfato-salino                                     |
| RPMI            | Roswell Park Memorial Institute                           |
| VIP             | Via Intraperitoneal                                       |
| VO              | Via Oral  |
| DAI             | Dias após a infecção                                      |
| qPCR            | Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo |
| DMSO            | Dimetilsulfóxido  |
| HE              | Hematoxilina-Eosina                                       |
| mg              | Miligramas  |
| L               | Litros  |
| ETOH            | Etanol  |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 2  |
| 1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas.....                               | 2  |
| 1.2 Transmissão oral na doença de Chagas .....                                     | 5  |
| 1.3 Trato digestório e a doença de Chagas .....                                    | 6  |
| 1.4 Imunopatologia da doença de Chagas .....                                       | 7  |
| 2. OBJETIVOS.....  | 9  |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....  | 9  |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 9  |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 10 |
| 3.1 Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas de cultura.....               | 10 |
| 3.1.1 Cultivo de epimastigotas em meio LIT.....                                    | 10 |
| 3.1.2 Metaciclogênese das formas epimastigotas .....                               | 10 |
| 3.2 Inóculo e infecção.....  | 10 |
| 3.3 Animais e infecção .....   | 11 |
| 3.4 Curva de parasitemia .....   | 12 |
| 3.5 Taxa de mortalidade .....  | 13 |
| 3.6 Necropsia e coleta dos órgãos para quantificação do parasitismo tecidual ..... | 13 |
| 3.7 Imunofenotipagem do sangue periférico .....                                    | 13 |
| 3.8 Parasitismo tecidual.....  | 14 |
| 3.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) .....                    | 14 |
| 3.9 Análise histopatológica.....   | 16 |
| 3.9.1 Necropsia e coleta dos órgãos para microscopia óptica convencional.....      | 16 |
| 3.9.2 Processo inflamatório .....  | 16 |
| 3.10 Análises estatísticas .....   | 16 |
| 4. RESULTADOS .....  | 18 |
| 4.1 Curva de Parasitemia e Taxa de Sobrevida .....                                 | 18 |
| 4.2 Imunofenotipagem das células do sangue periférico .....                        | 19 |
| 4.3 Parasitismo tecidual.....  | 20 |
| 4.4 Quantificação do processo inflamatório .....                                   | 21 |
| 5. DISCUSSÃO.....  | 25 |
| 6. CONCLUSÃO.....  | 27 |
| 7. REFERÊNCIAS .....   | 28 |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

A doença Chagas humana é uma protozoonose, descoberta em 1909 por Carlos Chagas, em Minas Gerais, Brasil. Seu agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi* (Ordem Kinetoplastida - Trypanosomatidae), possui como vetores insetos hematófagos da família *Reduviidae*, tendo como reservatórios os mamíferos, marsupiais, roedores e primatas no ciclo selvagem; e gatos, cachorros e humanos no ciclo doméstico (DIAS, 2015; ACEIJAS et al., 2016).

Estimam-se que cerca de 8 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*. A doença de Chagas é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos, onde é principalmente transmitida aos seres humanos por vetores, pelo contato com fezes ou urina de insetos de triatomíneos, conhecidos como "barbeiros", entre muitos outros nomes, dependendo da área geográfica (WHO, 2018). Nas regiões endêmicas dos países latino-americanos cerca de 100 milhões de pessoas correm risco de serem infectadas e adquirirem a doença, onde a estimativa é que ocorra 56 mil novos casos por ano, podendo levar a mais de 12 mil mortes anualmente. Além disso, observam-se novos casos em países não endêmicos devido à migração de pessoas infectadas, ocorrendo casos de infecção por transfusão sanguínea e transplantes de órgãos (PAHO, 2018).

A doença de Chagas assume importante posição dentre as doenças endêmicas no Brasil, pelo alto custo econômico e social e pelo impacto na morbimortalidade. As estimativas mais recentes variam de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (1,0 a 2,4% da população brasileira). Este cenário torna-se preocupante levando em consideração que até 30% das pessoas em fase crônica podem apresentar alterações cardíacas e 10% alterações digestivas. No período de 2005 a 2013, o coeficiente médio anual de letalidade foi de 2,7%. A elevada letalidade de 20% no ano de 2005 coincidiu com o surto da forma aguda da doença por transmissão oral em Santa Catarina. Em 2006, a letalidade continuou elevada em torno de 5,9% reduzindo a uma média de 1,7% de 2007 a 2013 (DIAS et al., 2015).

No período de 2000 a 2013 foram notificados 1.570 casos de doença de Chagas aguda (média de 112 casos por ano) no Brasil, sendo o Estado do Pará responsável por 75% de todos os casos no país e por 82% dos casos na região Norte. A transmissão oral foi a mais frequente no período avaliado (1.081,0, 68,2%), seguida pela transmissão vetorial (100 casos, 6,4%) (SVS, 2015).

Os mecanismos de transmissão são classificados como primário: por vetor, transfusão sanguínea, oral e congênita; e secundário: acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos, transmissão sexual e outros (ACEIJAS et al., 2016). De acordo com o Ministério da Saúde (2018), 62 espécies de triatomíneos potenciais vetores da doença de Chagas estão distribuídos pelo Brasil, nos espaços intradomicílio e extradomicílio.

A transmissão vetorial torna-se importante, pois populações mínimas de vetores infectados são capazes de proliferar a doença. Na década de 1940 iniciou-se o combate de transmissão vetorial por meio de medidas como melhoria nas condições de moradia da população e no controle do triatomíneo (DIAS, 2000), que culminou em 2006 com a eliminação da principal espécie vetor domiciliada, *Triatoma infestans*.

Atualmente, o perfil epidemiológico da doença apresenta um novo cenário com a ocorrência de casos e surtos na Amazônia Legal por transmissões oral e vetorial, sendo relacionados à ingestão de alimentos contaminados com cepas do *T. cruzi* (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros) e casos isolados por transmissão vetorial extradomiciliar. Com isso, evidenciam-se duas áreas geográficas onde os padrões de transmissão são diferenciados: a) a região originalmente de risco para a transmissão vetorial, onde ações de vigilância epidemiológica, entomológica e ambiental devem ser concentradas, com vistas à manutenção e sustentabilidade da interrupção da transmissão da doença pelo *Triatoma infestans* e por outros vetores passíveis de domiciliação; b) a região da Amazônia Legal, onde a doença de Chagas não era reconhecida como problema de saúde pública, as ações de vigilância devem ser estruturadas e executadas de forma extensiva e regular na região por meio de: detecção de casos febris, apoiada na vigilância da malária; identificação e mapeamento de marcadores ambientais, a partir do reconhecimento dos ecótopos preferenciais das diferentes espécies de vetores prevalentes e na investigação de situações em que há evidências ou suspeita de domiciliação de alguns vetores (BRASIL, 2014).

O ciclo de vida do *T. cruzi* apresenta diferentes estágios morfológicos. As formas tripomastigotas metacíclicas (TM) e tripomastigotas sanguíneas (TS) apresentam condições necessárias para interação e invasão das células do hospedeiro. O parasito apresenta quatro diferentes formas morfológicas: no triatomíneo pode-se observar formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. Os demais estágios, tripomastigotas sanguíneas e amastigotas, são visualizadas no hospedeiro vertebrado. O triatomíneo pode ingerir formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados pelo *T. cruzi*. No estômago do triatomíneo, as formas tripomastigotas sanguíneas transformam-se em epimastigotas e seguem para o intestino onde se reproduzem extracelularmente por divisão binária simples. As

formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas ao alcançarem o reto e são eliminadas nas fezes durante o repasto sanguíneo. Estas últimas podem penetrar através de microlesões na pele ou mucosas, causando infecção do sistema mononuclear fagocitário (SMF). Nessas células, se transformam em amastigotas, dando assim início a uma série de replicações no hospedeiro. Após vários ciclos de replicação, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas e estas são liberadas no interstício e na circulação no intuito de infectar outras células do hospedeiro e iniciar novas replicações. Assim a infecção é disseminada para diversos órgãos e tecidos (ANDRADE & ANDREWS, 2005; STUART, 2008).

A doença de Chagas, apresenta-se nas formas aguda e crônica, sendo que a forma aguda se caracteriza por febre variável, linfadenopatia, mal-estar, hepatoesplenomegalia, geralmente não se observa em crianças, a maioria das infecções apresentam poucos sintomas, sintomas inespecíficos ou são assintomáticas (OPAS, 2016). Esta fase se inicia logo após a infecção, com duração de 6 a 8 semanas, sendo que quando a porta de entrada dos tripanosomas é a conjuntiva ocular, pode ocorrer um edema bipalpebral, unilateral denominado “sinal de Romana-Mazza”. Além disso, pode apresentar também “chagoma de inoculação”, lesão produzida quando o parasita penetra por outros locais da superfície corporal. Por apresentar poucos sintomas nessa fase, a doença de Chagas pode ser confundida com diversas outras infecções. Porém, em alguns pacientes, principalmente criança e imunossuprimidos, quadros de meningites graves e de insuficiência cardíaca podem estar associados a óbitos. A fase aguda é também caracterizada por altos níveis de parasitemia e parasitismo tecidual. (ANDRADE & ANDREWS, 2005)

Posteriormente, dá-se início a fase conhecida como de latência ou indeterminada, caracterizada por não apresentar sintomatologia importante do ponto de vista clínico e podendo se estender por vários anos. Pacientes nesta fase tem o risco de transmitir involuntariamente a infecção, observa-se que a maior parte dos portadores da doença de Chagas persiste nessa fase. Em seguida, uma porção menor de indivíduos evoluem para a fase crônica da doença, caracterizada por sintomas de comprometimento cardíaco (miocardite grave) com cardiomegalia, denominada forma cardíaca ou o aumento do diâmetro de regiões do trato digestivo, conhecido como os “megas” (megaesôfago e megacólon), sendo esta a forma digestiva. Pode-se ocorrer também a forma cardiodigestiva, onde ambos os órgãos são acometidos. Na fase crônica sintomática, há uma redução da qualidade de vida e da capacidade de trabalho do paciente, necessitando de atenção médica constante. No entanto, o aparecimento desses sinais clínicos pode ter início após 30 anos de infecção (JC, 1995; FIOCRUZ, 2018).

## 1.2 Transmissão oral na doença de Chagas

Casos de surtos agudos têm sido frequentemente notificados no Brasil nos últimos anos. Esses casos se devem à ingestão das formas tripomastigotas metacíclicas presentes em caldos de cana de açúcar e açaí, dentro outros frutos, onde os triatomíneos junto as suas fezes contendo parasitos são provavelmente triturados durante o preparo, culminando na contaminação desses alimentos. Além disso, a literatura demonstrou a sobrevivência de *T. cruzi* em bebidas por mais de 24 horas após sua contaminação, o que gera uma fácil transmissão da doença por via oral, manifestando-se com alta mortalidade e pior prognóstico (FILIGHEDDU et al., 2017).

Considerando que houve uma grande preocupação quanto à morbidade associada à doença de Chagas devido a alta prevalência de casos crônicos no Brasil e na América Latina, atualmente a fase crônica tem-se tornado menos importante, quando comparada aos casos da fase aguda por transmissão via oral, que emergiu como a principal forma de transmissão na Amazônia e em outras regiões onde o controle de triatomíneos intradomiciliares foi efetivo. Entre os anos de 1965 a 2009 foram observados cerca de 112 casos agudos (em 8 surtos) em áreas fora da Amazônia, onde o triatomíneo estava sob controle. Em contraste, entre 2000 a 2010, foram notificados mil casos agudos (em 138 surtos) principalmente na Amazônia, destes casos 776 (71%) foram atribuídos à ingestão de alimentos e bebidas contaminados (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012).

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

Além disso, a infecção por via oral destacou-se devido à gravidade da doença. Uma característica comum aos surtos da doença por via oral é a presença de uma intensa miocardite, além de outras manifestações, como derrame periférico e derrame pleural, que são mais frequentes na transmissão oral quando comparada à vetorial, podendo levar ao óbito em alguns casos ainda na fase aguda. Após um período de latência de cinco dias a partir da ingestão, a infecção oral se caracteriza por manifestações como febre prolongada, miocardites agudas, falha cardíaca e, em alguns casos, meningoencefalites (BASTOS et al., 2010).

Portanto, a transmissão por via oral está associada a uma alta taxa de mortalidade nas primeiras semanas após a infecção, havendo uma estimativa de cerca de 8 a 35% de mortalidade, superando a mortalidade pela via vetorial que tem sido estimada em menos de 5 a 10%. No surto ocorrido em Santa Catarina em 2005, a Secretaria de Saúde do Estado divulgou



que foram constatadas 24 infecções após ingestão de caldo de cana contaminado e destas 3 causaram morte ainda na fase aguda da doença (SVS, 2007).

### 1.3 Trato digestório e a doença de Chagas

O trato gastrointestinal (TGI) pode ser acometido em sua totalidade pela infecção com o *T. cruzi* levando a várias alterações anatômicas, histológicas e morfofuncionais. É responsável pela digestão e absorção de nutrientes, sendo constituído de um tubo oco composto pela cavidade oral, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon e reto) e ânus. No que se diz respeito à histologia, o TGI é formado pelas túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa. A mucosa é a camada mais interna da parede intestinal fazendo contato direto com o bolo alimentar, sendo composta de epitélio, que pode variar ao longo do trato, lâmina própria, constituída de células absorptivas, tecido conjuntivo frouxo, fibras nervosas e fibras musculares, denominando a muscular da mucosa. A submucosa é localizada abaixo da lâmina própria, a qual contém os corpúsculos celulares nervosos nos gânglios do plexo submucoso. Logo abaixo da submucosa, encontra-se a camada muscular circular interna, e abaixo desta, outro plexo celular nervoso, denominado plexo mioentérico. Por fim, as camadas mais externas da parede intestinal são constituídas pela camada muscular longitudinal, denominada túnica muscular e da serosa que forma uma cápsula conjuntiva coberta por camadas mesoteliais escamosas ao redor do tubo digestivo (GUYTON, 2006).

O sistema nervoso autônomo (SNA) é responsável pelo controle neural do TGI através da inervação simpática ou parassimpática, juntamente com o sistema nervoso entérico (SNE) (FURNESS, 2000). No TGI, são encontrados três diferentes tipos de plexos ganglionares: plexo mucoso; plexo submucoso (localizado na túnica muscular), responsável pela secreção e absorção; e o plexo mioentérico presente no plano intermuscular da túnica muscular, sendo responsável pela atividade peristáltica (COSTA et al., 2000; FURNESS, 2000).

Sugerem-se que um dos fatores mais importantes no desenvolvimento dos megas chagásicos seja o processo degenerativo, principalmente nos gânglios nervosos do SNE, que aparentemente tem seu início na fase aguda, persistindo até a fase crônica. Esse processo se deve provavelmente à imunorreatividade de peptídeo intestinal vasoativo e óxido nítrico sintetase, gerando destruição de neurônios inibitórios, que pode levar a dilatação do lúmen intestinal e à perda da contratilidade muscular do esôfago e cólon (DA SILVEIRA, 2007). Além disso, acredita-se que ocorra a presença de infiltrado inflamatório seguida de aumento da área

de tecido conjuntivo principalmente na túnica muscular (DA SILVEIRA et al., 2005; CAMPOS et al., 2016). Isto parece contribuir para desencadear alterações funcionais do trato digestório por modificar a arquitetura desses órgãos, levando a mudanças no peristaltismo com consequente estagnação e retenção do conteúdo alimentar e, posteriormente, perda das microvilosidades e, especialmente, dilatação das vísceras. O primeiro sintoma do megacólon é a constipação, portanto o diagnóstico clínico e o anatômico são em geral tardio (KOEBERLE, 1963; PERNÍÁ et al., 2001).

Na infecção pela via oral, ao invadir o epitélio gástrico, o *T. cruzi* parece ser resistente à lise proteolítica no estômago. Essa resistência é mediada pela presença de glicoproteínas de membrana específicas das formas tripomastigotas metacíclicas, ocorrendo então uma adesão e penetração dos parasitos nas células da mucosa gástrica. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a resistência à digestão péptica da glicoproteína gp82 e sua capacidade de se ligar à mucosa gástrica e células epiteliais, induzindo a mobilização de cálcio e finalmente a entrada de parasito na célula, ocorrendo então a infecção (RUEDA et al., 2014).

#### **1.4 Imunopatologia da doença de Chagas**

Para determinar se o paciente irá evoluir da fase aguda para fase crônica sintomática da doença, a resposta imunológica se torna extremamente importante. Acredita-se que a resposta esteja associada a fatores ligados ao parasito, sendo especulado que o número de parasitos inoculados influencie na progressão da doença (VAGO et al., 2000). Outros fatores ligados à progressão da doença, são aqueles relacionados ao hospedeiro como seu estado nutricional, sexo e características genéticas (ANDERSON et al., 2003; CAMPBELL et al., 2004).

O controle do *T. cruzi* depende tanto da imunidade inata quanto da adquirida, sendo essenciais nos sinais e sintomas do paciente e sua evolução na doença, essas atividades já são observadas no estágio inicial da doença. Há então o envolvimento de macrófagos, células *natural killer* (NK), linfócitos T, linfócitos B e de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12) (KAYAMA e TAKEDA, 2010).

A inflamação depende de linfócitos T, principalmente T CD8<sup>+</sup> sensibilizados contra antígenos de *T. cruzi*, condicionando resistência à infecção. Já a susceptibilidade à infecção associa-se com a produção de IL-10, IL-5, IL-3 e IL-4, responsáveis por inibir a geração de nitritos pelos macrófagos. Na maioria das vezes a resposta inflamatória é desproporcional ao parasitismo tecidual, isso porque a resposta imune parece ser responsável pelo controle da

replicação do *T. cruzi* e pelos danos causados nos tecidos durante a fase aguda da doença (PAVANELLI, 2008).

Na fase aguda, estudos mostram presença de infiltrado inflamatório no intestino rico em células mononucleares em camundongos infectados com a cepa Y, sendo mais intenso nas camadas muscular e da submucosa (CAMPOS, et al., 2016). Sugere-se que ocorre estímulo de ativação das células T, pela presença de cDNA de *T. cruzi*, sinalizando então que há uma persistência do parasito, o que explica então a presença do processo inflamatório na fase crônica da doença (JONES et al., 1993; VAGO et al., 1996; VAGO et al. 2000). O processo inflamatório na fase crônica da doença de Chagas apresenta sempre sinais de atividade celular. No megaesôfago chagásico, os infiltrados inflamatórios são compostos de 72- 93% de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, de 6-29% de macrófagos CD68<sup>+</sup> e 1-4% de linfócitos B CD20<sup>+</sup>. Cerca de 1-35% das células do infiltrado inflamatório nas camadas musculares expressam TIA-1 (antígeno intracelular de célula T) uma proteína encontrada em linfócitos T citotóxicos e células NK (D'AVILA REIS et al., 2001). Linfócitos T citotóxicos produtores de granzima A e células NK foram também demonstrados em lesões do coração de pacientes portadores de cardiopatia chagásica (REIS et al., 1997). Além disso, especula-se que na fase aguda a destruição neuronal associa-se com a elevada carga parasitária no tecido, enquanto que na fase crônica relaciona-se com a ação do sistema imune à infecção (DA SILVEIRA, et al., 2007).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil leucocitário sistêmico, a carga parasitária e o processo inflamatório no duodeno e cólon de camundongos *Swiss* infectados pela via oral com a cepa VL-10 do *T. cruzi* ao longo da fase aguda.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a taxa de sobrevivência e a curva de parasitemia;
- Fenotipar as células mononucleares no sangue periférico;
- Quantificar o parasitismo tecidual;
- Analisar processo inflamatório no trato gastrointestinal.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas de cultura**

##### **3.1.1 Cultivo de epimastigotas em meio LIT**

Foram coletados com EDTA aproximadamente 100 µL de sangue do plexo orbital de um camundongo sabidamente infectado com a cepa VL-10 do *T. cruzi*. Essa quantidade foi transferida para um tubo tipo Falcon de 15 mL, previamente autoclavado, contendo EDTA, onde foram adicionados 2 mL de meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT – produzido *in house*) 20% de soro fetal bovino (SFB) (1:3). Esta hemocultura foi mantida em estufa de BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) à temperatura de 28°C por 15 dias. Após este período, foi feito o repique transferindo 1 mL da cultura para outro tubo tipo Falcon de 15 mL e adicionando 2 mL de meio LIT 20%. O repique foi repetido de 15 em 15 dias, mantendo a proporção de 1:3, e completando cerca de 1,5 mês, até à purificação da cultura tornando-a axênica com observação da presença de epimastigotas viáveis (vivos e com morfologia e motilidade normais) em microscópio óptico em objetiva de 40x. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

##### **3.1.2 Metaciclo gênese das formas epimastigotas**

A cultura rica em formas epimastigotas viáveis obtida seguindo o procedimento descrito acima foi submetida à metaciclo gênese. Para isto, em uma garrafa de cultura de 40 mL esterilizada, foram adicionados 5 mL dessa cultura e 10 mL de meio LIT 20% estéril (1:3). Feita a homogeneização em movimentos circulares, a garrafa contendo a cultura foi mantida na horizontal em estufa de BOD à 28°C, durante 7 dias. Após este período, a cultura foi diluída 10 vezes em PBS estéril (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 2,55g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,83g/L, NaCl 87,6g/L, pH 7,2) para observar a presença e posterior contagem das formas tripomastigotas metacíclicas em câmara de Neubauer em microscópio óptico e ajuste do inoculo para 1x10<sup>5</sup> parasitos/mL.

#### **3.2 Inóculo e infecção**

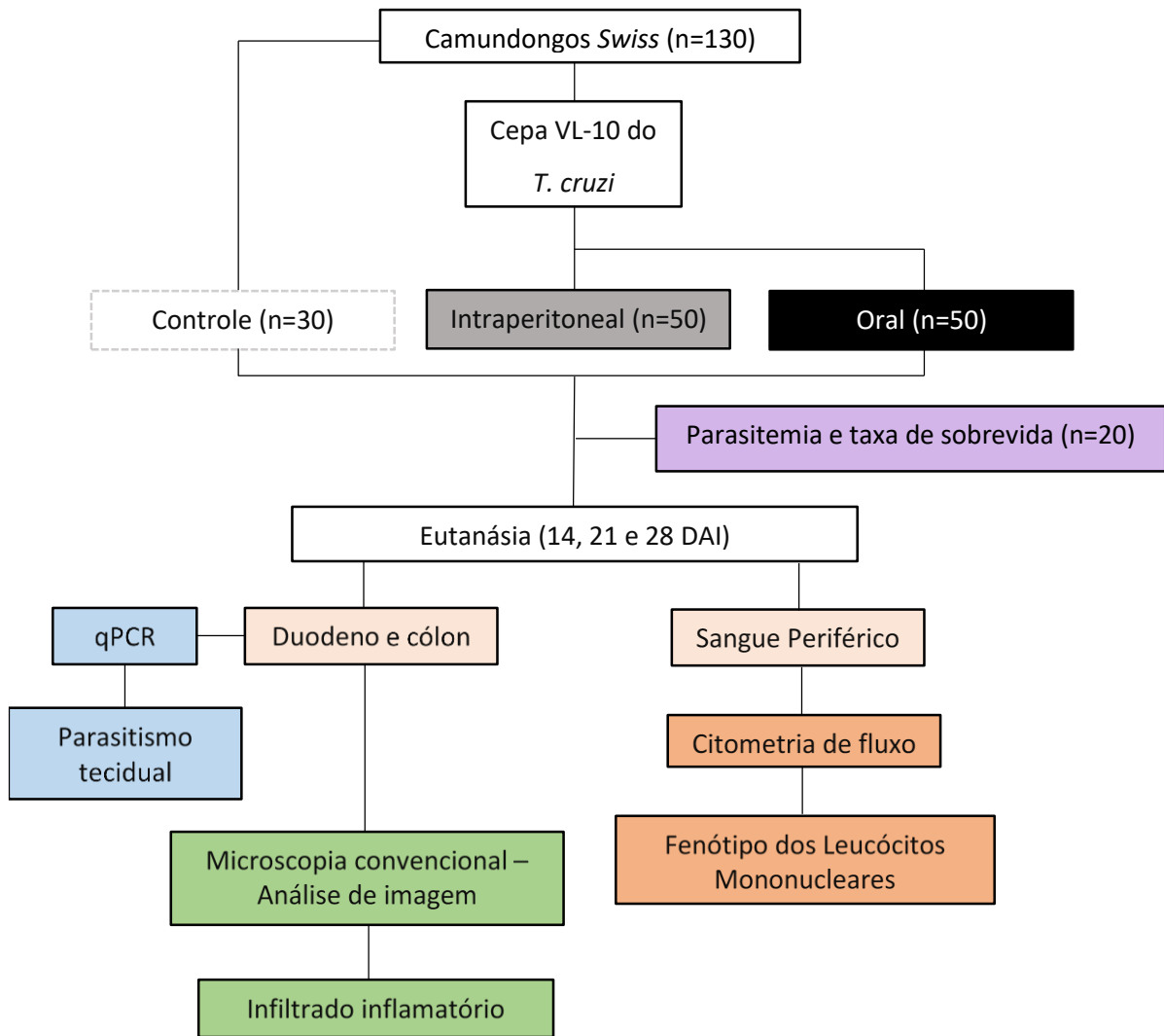
Após a contagem das formas tripomastigotas metacíclicas em câmara de Neubauer, o número de parasitos encontrado em 1000 µL foi ajustado para valor do inóculo de 1x10<sup>5</sup> formas

por animal. A cultura, com a quantidade de parasitos conhecida, foi então centrifugada a 2200 rpm por 10 minutos à 4°C de forma a obter a formação de um *pellet* no qual estavam presentes as formas tripomastigotas metacíclicas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em PBS para a infecção intraperitoneal ou RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich®) para a infecção oral dos animais. Após a preparação do inóculo, foi feita a infecção de 100 camundongos, 50 por via intraperitoneal, e 50 por via oral. A infecção pela via oral foi realizada através da gavagem incompleta, procedimento em que se introduz a agulha de gavagem até a parte inicial do esôfago do camundongo.

### **3.3 Animais e infecção**

Foram utilizados 130 camundongos *Swiss*, jovens (idade: 30 dias), machos, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, MG, os quais foram distribuídos em três grupos experimentais: controle não infectado (NI); infectado por via intraperitoneal (VIP); infectado por via oral (VO). Os animais receberam o inóculo de  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas metacíclicas provenientes de culturas acelulares da cepa VL-10 por gavagem incompleta (VO) ou por via intraperitoneal (VIP). Esse último grupo foi o controle de infecção, visto que essa é a principal via utilizada em trabalhos experimentais da doença de Chagas.

No fluxograma 1 encontra-se a distribuição dos animais nos diferentes grupos, constando o número total de animais em cada grupo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº2012/13).



**Fluxograma 1:** Delineamento experimental com distribuição dos animais que foram utilizados para caracterização da lesão nos órgãos do trato gastrointestinal (verde), para avaliação do perfil leucocitário sistêmico (laranja) e para a quantificação da carga parasitária tecidual (azul). Grupo controle não infectado em branco com linhas tracejadas. Grupo infectado pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) por via intraperitoneal em cinza. Grupo infectado pelo *T. cruzi* por via oral em preto. Dias após a infecção (DAI).

### 3.4 Curva de parasitemia

Para determinação da parasitemia, 10 camundongos de cada grupo foram avaliados diariamente a partir do 4º dia após a infecção (DAI) até a negatificação do exame, por cinco dias consecutivos, segundo a metodologia adaptada de Brener (1962). Para isso, 5 µL de sangue da veia caudal dos camundongos foram analisados diariamente ao microscópio óptico e a curva de parasitemia foi plotada para cada grupo experimental, empregando a média diária da parasitemia detectada nos animais. Esta foi expressa em número de tripomastigotas sanguíneos

por 0,1 mL de sangue. O período pré-patente, período patente e o pico máximo de parasitemia foram determinados.

### **3.5 Taxa de mortalidade**

Os animais utilizados para a determinação da curva de parasitemia foram acompanhados diariamente até o 28º DAI sendo a mortalidade registrada e expressa em porcentagem cumulativa.

### **3.6 Necropsia e coleta dos órgãos para quantificação do parasitismo tecidual**

Quatro animais de cada grupo foram eutanasiados, por deslocamento cervical, no 14º, 21º e 28º DAI sendo procedida a necropsia. Foram coletados o duodeno e cólon. Esses órgãos foram armazenados no freezer -80°C para posterior realização da quantificação do parasitismo tecidual por PCR em tempo real.

### **3.7 Imunofenotipagem do sangue periférico**

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

Para cada tubo contendo 20µL da diluição do anticorpo monoclonal em PBS e soro normal de rato, foram adicionados 25µL de sangue periférico total. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise (citrato de sódio 29g/L, formaldeído 54%, dietilenoglicol 30%, heparina 0,4%, pH 7,85) diluída 10 vezes em água destilada. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e então submetidas à centrifugação (1300rpm, 7 minutos a 18°C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado, os leucócitos foram lavados com 3mL de PBS (pH7,4) e centrifugados como descrito anteriormente. Finalmente, os leucócitos foram fixados com 200µL de solução fixadora (10g/L



de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de pelo menos 15 minutos, os parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® – Becton Dickinson). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e o FlowJo® para a análise dos resultados empregando diferentes estratégias.

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

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

### 3.8 Parasitismo tecidual

#### 3.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

##### 3.8.1.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Kit *Wizard<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA). Os tecidos previamente armazenados em freezer -80°C foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi e pesados obtendo fragmentos de 20-30mg. Estes foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5mL nos quais foram adicionados 500µL da solução de lise nuclear (*Nuclear Lise Solution*) e, então, foram mantidos em gelo por 2 minutos. Em seguida, as amostras receberam 20µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®), na concentração de 20mg/mL, e após homogeneização, foram incubadas *overnight* em banho-seco a 55°C. No dia seguinte, após digestão completa dos fragmentos, observando a presença de um homogenato, foi adicionado 3µL da Solução de RNase (Promega) e, durante 30 minutos a 37°C, as amostras foram incubadas. Após este tempo e posterior ao resfriamento por 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200µL de solução de precipitação proteica (*Protein Precipitations Solution*). Mantidas no gelo por 5 minutos, as amostras foram, então, homogeneizadas vigorosamente em vórtex durante 20 segundos e centrifugadas a 16.000

rcf (temperatura ambiente, 5,5 minutos) com formação de um *pellet*. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo que continha 600µL de isopropanol e misturado delicadamente por inversão por 1-2 minutos até turvação do DNA. Novamente as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm, à temperatura ambiente, durante 5 minutos, e em seguida foi observada a formação de um *pellet* claro. O sobrenadante foi descartado e após a adição de 200µL de etanol 70% (ETOH), as amostras foram centrifugadas por 3 minutos também à temperatura ambiente. O etanol foi então vertido e as quantidades remanescentes evaporadas. Por fim, 100µL da solução de re-hidratação de DNA (*DNA Rehydration Solution*) foram adicionados às amostras que permaneceram à temperatura ambiente durante 18 horas para posterior quantificação do DNA e de sua pureza os quais foram analisados em nanoespectrofotômetro (Nanodrop® 2000, Thermo Scientific). Após a dosagem, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise por qPCR.

### 3.8.1.2 Amplificação específica do DNA do *T. cruzi*

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

Foram utilizados os iniciadores TCZ-F 5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3', (onde M = A or C) e TCZ-R 5'-CCAA-GCAGCGGATAGTTCAGG-3' que amplificaram o produto de 195 bp do DNA nuclear do *T. cruzi*, conforme descrito por Cumming e Tarleton, 2003. Além disso, foi utilizado, como controle de amplificação, os iniciadores de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) murino, cujas sequências foram: TNF-5241(F) 5'- TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCC-3' e TNF-5411(R) 5'-CAGCAAGCAT-CTATGCACTTAGAC-3'. Cada placa de reação de 96 poços, continha 5µL de mix de *Sybr*® *Green* PCR Mastermix (*Applied Biosystems*) + TCZ/R;F (em duplicata) ou 2µL de mix de *Sybr* Green + TNF/5241;4511 (em unicata), portanto, cada amostra de DNA foi quantificada em triplicata. Além disso, também foram adicionados nos poços 3µL da curva padrão e 3µL da amostra extraída que anteriormente foi diluída em água, contendo 50ng de DNA genômico. A placa continha um controle negativo

da reação constituído por iniciadores específicos do *T. cruzi* e água, sem a presença do DNA. A amplificação do DNA foi feita utilizando o equipamento 7500 *Real Time PCR System*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*).

### **3.9 Análise histopatológica**

#### **3.9.1 Necropsia e coleta dos órgãos para microscopia óptica convencional**

Outros quatro animais de cada grupo foram eutanasiados, por deslocamento cervical, nos dias 14, 21 e 28 após a infecção sendo procedida a necropsia. Foram coletados o duodeno e cólon, que posteriormente foram fixados em solução de Metanol/DMSO (8:2 pH 7,2) para as análises histopatológicas. Fragmentos desses órgãos foram processados rotineiramente e incluídos em parafina. Os blocos de parafina obtidos foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes com espessura de 4µm. As lâminas dos blocos parafinizados dos órgãos coletados foram confeccionadas para coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) e posterior quantificação do infiltrado inflamatório no *software* Leica Qwin V3.

#### **3.9.2 Processo inflamatório**

A quantificação do processo inflamatório foi realizada em cortes de duodeno e cólon submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina. Para avaliação do infiltrado inflamatório, todos os núcleos celulares presentes foram quantificados em 30 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a 1064811µm<sup>2</sup>) para a quantificação. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através de uma microcâmera que foi associada ao microscópio Leica DM5000B. Todas as imagens foram analisadas com o auxílio do *software* de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. O processo inflamatório foi determinado pela diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o número de núcleos celulares presentes nos animais infectados pelo *T. cruzi*, distribuídos nos grupos VIP e VO, e aquele observado nos animais não-infectados.

#### **3.10 Análises estatísticas**

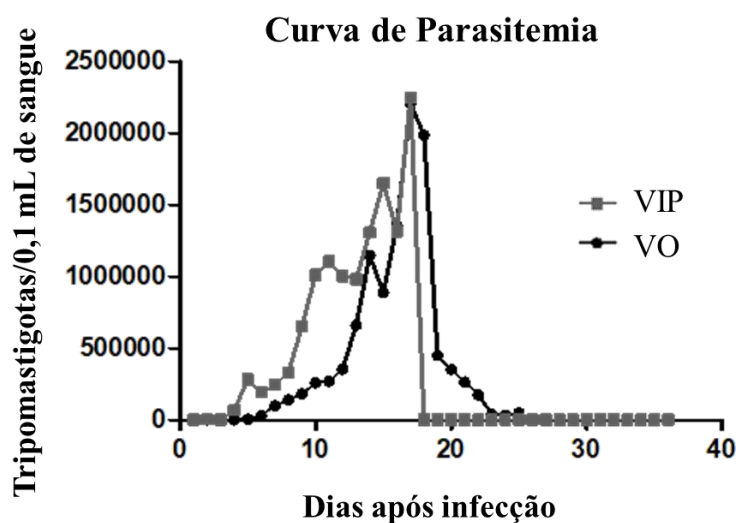
Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.01 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para confirmar os padrões de normalidade. Os dados foram classificados como não-paramétricos e foi realizada as análises de *Mann-Whitney* ou de *Kruskal-Wallis* seguida pelo teste de Dunns. Foram consideradas significativas as diferenças entre médias com valores de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Curva de Parasitemia e Taxa de Sobrevida

A taxa de infectividade obtida foi de 100% em ambos os grupos infectados. Na figura 1 é observada a curva de parasitemia dos animais dos grupos VIP e VO. O período pré-patente observado no grupo VIP foi de 4 dias e patente de 18 dias, com pico de parasitemia no 17º DAI (2.243.625 tripomastigotas/0,1 mL de sangue). Já no grupo VO observou-se um período pré-patente de 6 dias e patente de 23 dias, com o pico de parasitemia também no 17º DAI (2.203.250 tripomastigotas/0,1 mL de sangue). Após realizar análise da área sob a curva foi possível observar que não há diferença entre os grupos VIP e VO no que se diz respeito a curva de parasitemia. Na Tabela 1 estão representados os valores dos níveis parasitêmicos máximos, dia do pico de parasitemia e os períodos pré-patente e patente dos diferentes grupos.

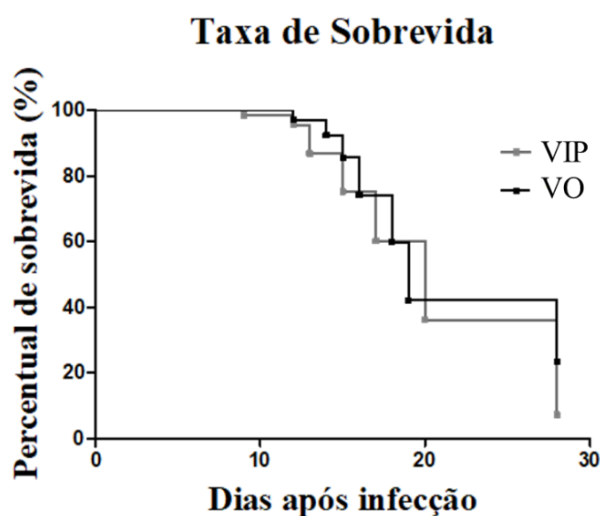


**Figura 1:** Médias das curvas de parasitemia dos camundongos *Swiss* infectados por formas tripomastigotas metacíclicas por via intraperitoneal (VIP) (em cinza) ou por via oral (VO) (em preto) com a cepa VL-10 do *T. cruzi*.

| Grupos | Níveis parasitêmicos máximos<br>(tripomastigotas/0.1 mL de<br>sangue) | Dia do pico de<br>parasitemia | Período pré-<br>patente | Período<br>patente |
|--------|---|-------------------------------|-------------------------|--------------------|
| VIP    | 2.243.625,00  | 17º DAI                       | 4 DAI                   | 18 DAI             |
| VO     | 2.203.250,00  | 17º DAI                       | 6 DAI                   | 23 DAI             |

**Tabela 1:** Níveis parasitêmicos, dia do pico de parasitemia, períodos pré-patente e patente dos camundongos *Swiss* infectados por formas tripomastigotas metacíclicas por via intraperitoneal (VIP) (em cinza) ou por via oral (VO) (em preto) com a cepa VL-10 do *T. cruzi*.

No grupo VIP foi observada uma taxa de sobrevivência de 7,23%, já no grupo VO observou-se uma taxa de 23,40%, como demonstrado na figura 2. Após realizar teste de Kaplan-Meier, observou-se que ambos os grupos apresentam mesmo formato de curva no que se diz respeito ao gráfico de taxa de sobrevivência.



**Figura 2:** Taxa de sobrevivência dos camundongos *Swiss* infectados por via intraperitoneal (VIP) ou por via oral (VO) com  $1,0 \times 10^5$  tripomastigotas metacíclicas da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*.

#### 4.2 Imunofenotipagem das células do sangue periférico

A análise fenotípica das células mononucleares no sangue periférico foi realizada para compreensão do efeito da infecção pela via oral sobre o perfil leucocitário sistêmico na fase aguda da infecção. Os resultados obtidos quanto à porcentagem de células mononucleares do sangue periférico estão representados na figura 3.

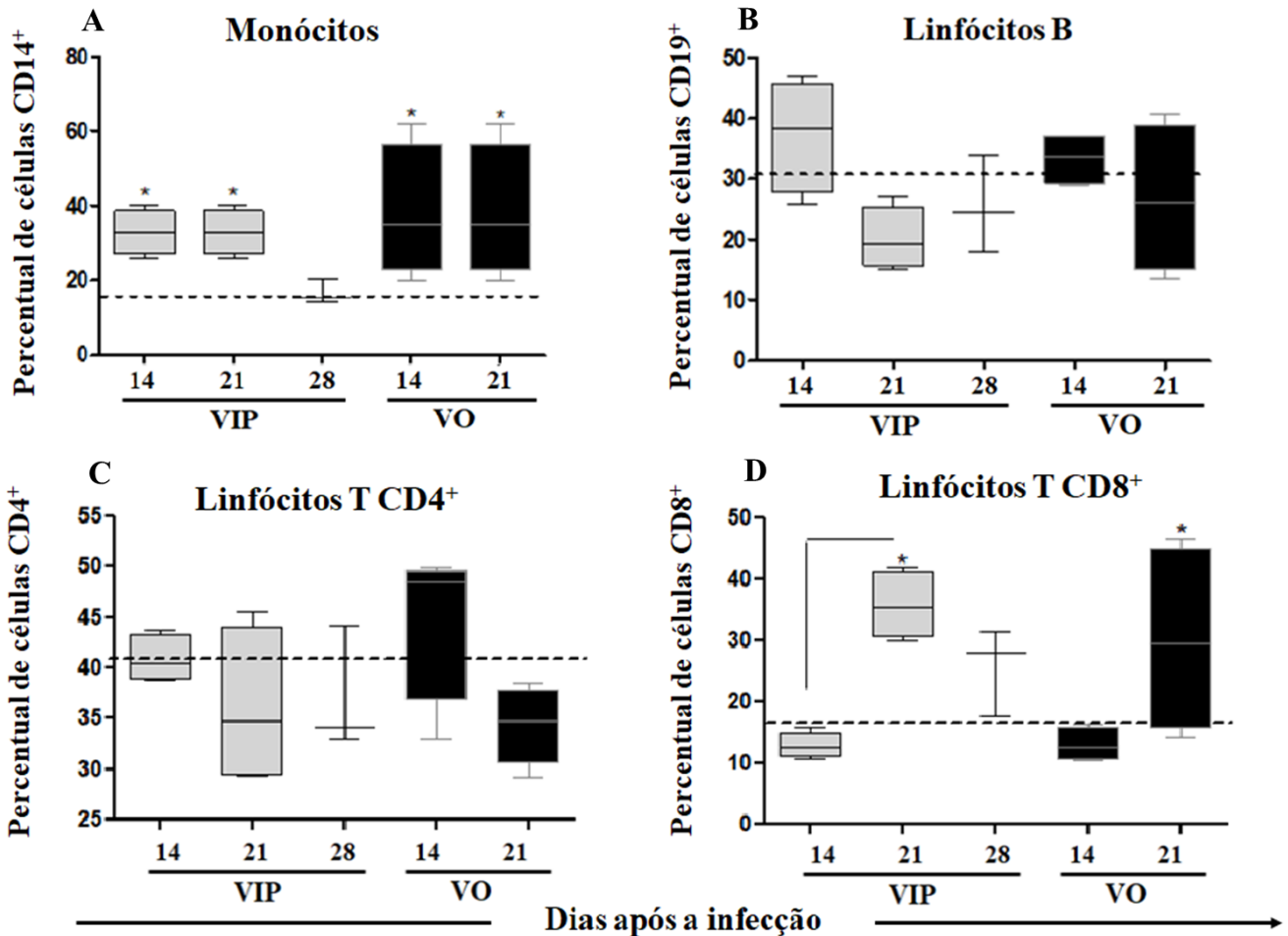
Foi observado aumento de monócitos em ambos os grupos infectados ao longo da fase aguda em relação ao grupo controle, nos dias 14 e 21 após a infecção (Figura 3A).

Em relação aos linfócitos B, não foi observada nenhuma alteração no percentual dessas células em relação aos animais controles ao longo da fase aguda (Figura 3B).

No que se diz respeito aos linfócitos T  $CD4^+$ , não foi observada diferença significativa entre os grupos VIP e VO e os animais não infectados, portanto os níveis de linfócitos T  $CD4^+$

permaneceram em níveis basais ao longo da fase aguda na infecção pela cepa VL-10 (Figura 3C).

No que se refere aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, foi observado que independente da via de inoculação, houve um aumento no percentual dessas células no 21º DAI em relação aos animais



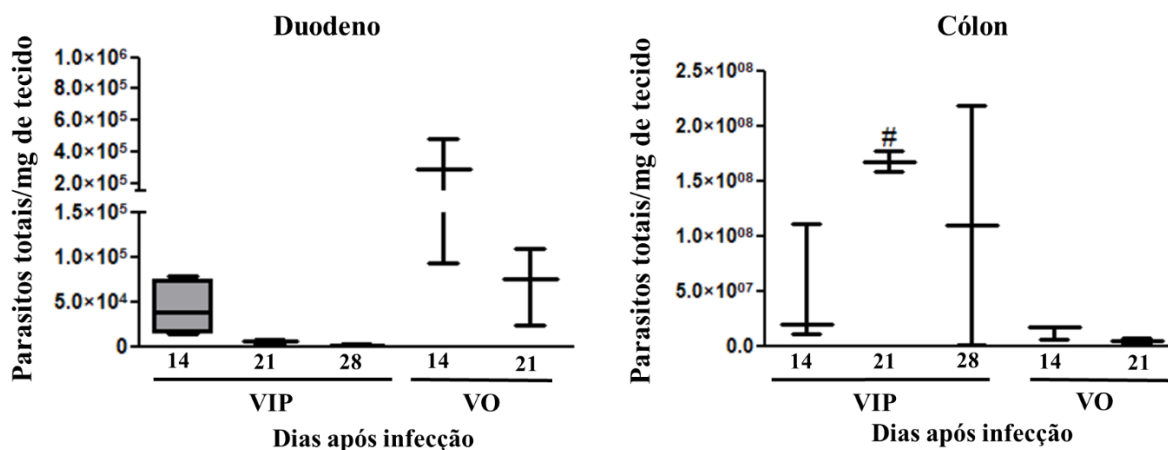
não infectados. Além disso, no grupo VIP observa-se um aumento no 21º DAI quando comparado ao 14º DAI (Figura 3D).

**Figura 3:** Imunofenotipagem de células do sangue periférico de camundongos *Swiss* infectados com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* por via intraperitoneal (VIP) ou por via oral (VO) nos dias 14, 21 e 28 após a infecção. (A) Porcetagem de monócitos (CD 14<sup>+</sup>), (B) linfócitos B (CD19<sup>+</sup>), (C) T CD4<sup>+</sup> e (D) T CD8<sup>+</sup>. Linhas tracejadas representam a média do número de células do grupo não infectado. “\*” indica diferenças significativas (p<0.05) entre o grupo não infectado e os grupos VIP ou VO. Os dados são apresentados como mediana ± mínimo e máximo de 4 camundongos de cada grupo em cada tempo de infecção.

### 4.3 Parasitismo tecidual

Para quantificar o parasitismo tecidual foi utilizada a técnica de qPCR em fragmentos do duodeno e cólon dos animais infectados e os resultados estão apresentados na figura 4.

Observa-se no duodeno uma queda do parasitismo tecidual tanto no grupo VIP, quanto no grupo VO. Já no cólon, há aumento no grupo VIP com o passar dos dias após a infecção, o que não é observado no grupo VO. Ainda no cólon, observa-se um aumento significativo da quantidade de parasitos no 21 DAI do grupo VIP quando comparado com o 21 DAI do grupo VO. Por fim, é possível observar no cólon um parasitismo mais intenso quando comparado com o duodeno.



**Figura 4:** Quantificação do parasitismo tecidual no duodeno e cólon de camundongos *Swiss* com eutanásia nos dias 14, 21 e 28 após infecção experimental por via intraperitoneal (VIP) e por via oral (VO) com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. “#” indica diferença significativa ( $p < 0.05$ ) quando comparado com o 21 DAI do grupo VO. Os dados são apresentados como mediana  $\pm$  mínimo e máximo de 4 camundongos de cada grupo em cada tempo de infecção.

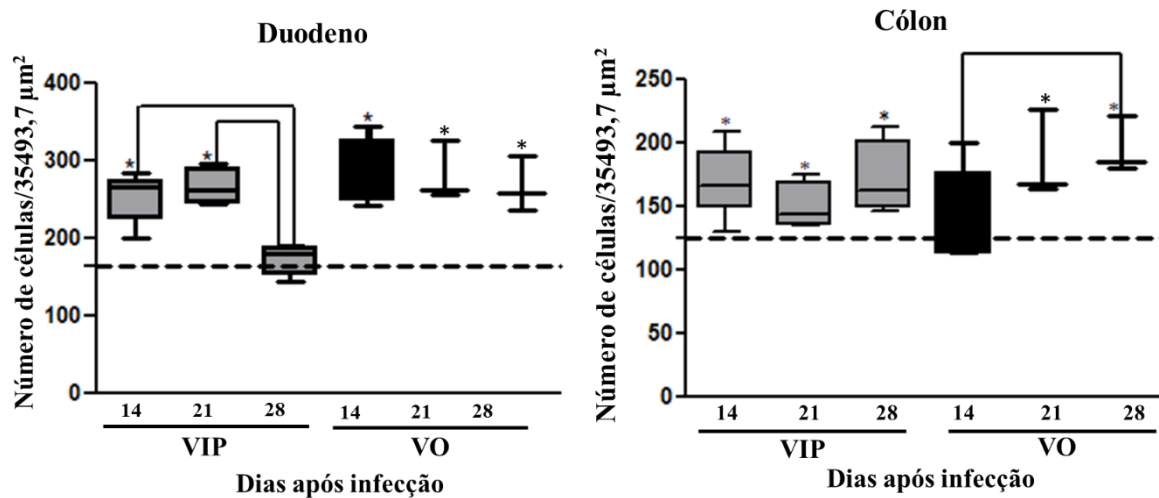
#### 4.4 Quantificação do processo inflamatório

Foi quantificada a inflamação nos tecidos do cólon e duodeno dos animais dos grupos VIP e VO, os resultados estão apresentados nas figuras 5, 6 e 7.

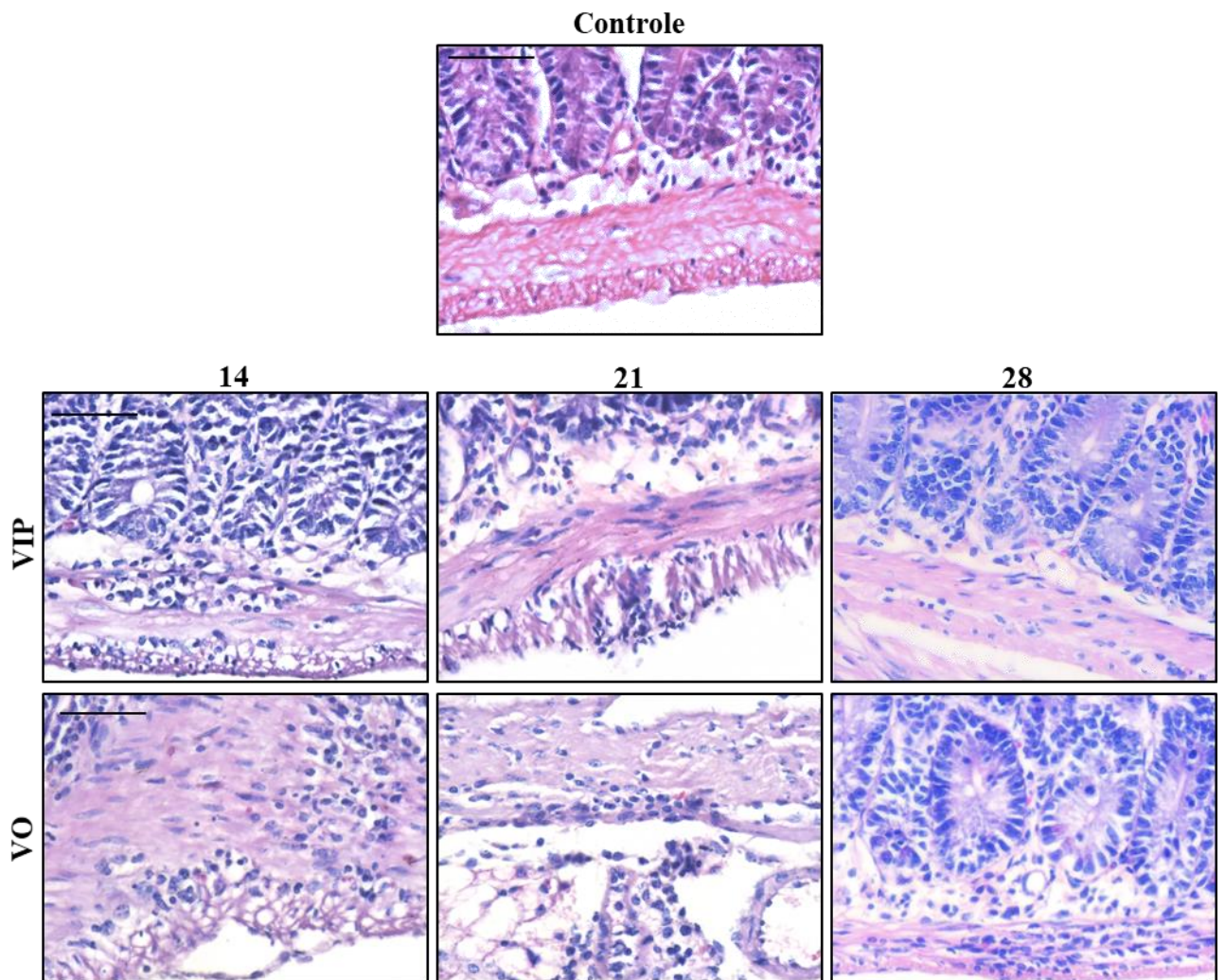
No duodeno, no grupo VIP observa-se presença de processo inflamatório nos dias 14 e 21 após a infecção quando comparado ao grupo de animais não infectados. Já no grupo VO é possível observar um comportamento diferenciado, ocorrendo um aumento do processo inflamatório durante toda fase aguda quando comparado ao grupo de animais não infectados.

No cólon, o grupo VIP mostra um aumento do processo inflamatório nos dias 14, 21 e 28 após infecção quando comparado aos animais não infectados. Já no grupo VO observa-se um aumento crescente do processo inflamatório com o passar dos dias, com uma diferença significativa no 21° e 28° DAI quando comparado aos animais não infectados. Além disso observa-se também um aumento do processo inflamatório no 28° DAI quando comparado ao 14° DAI nesse grupo.

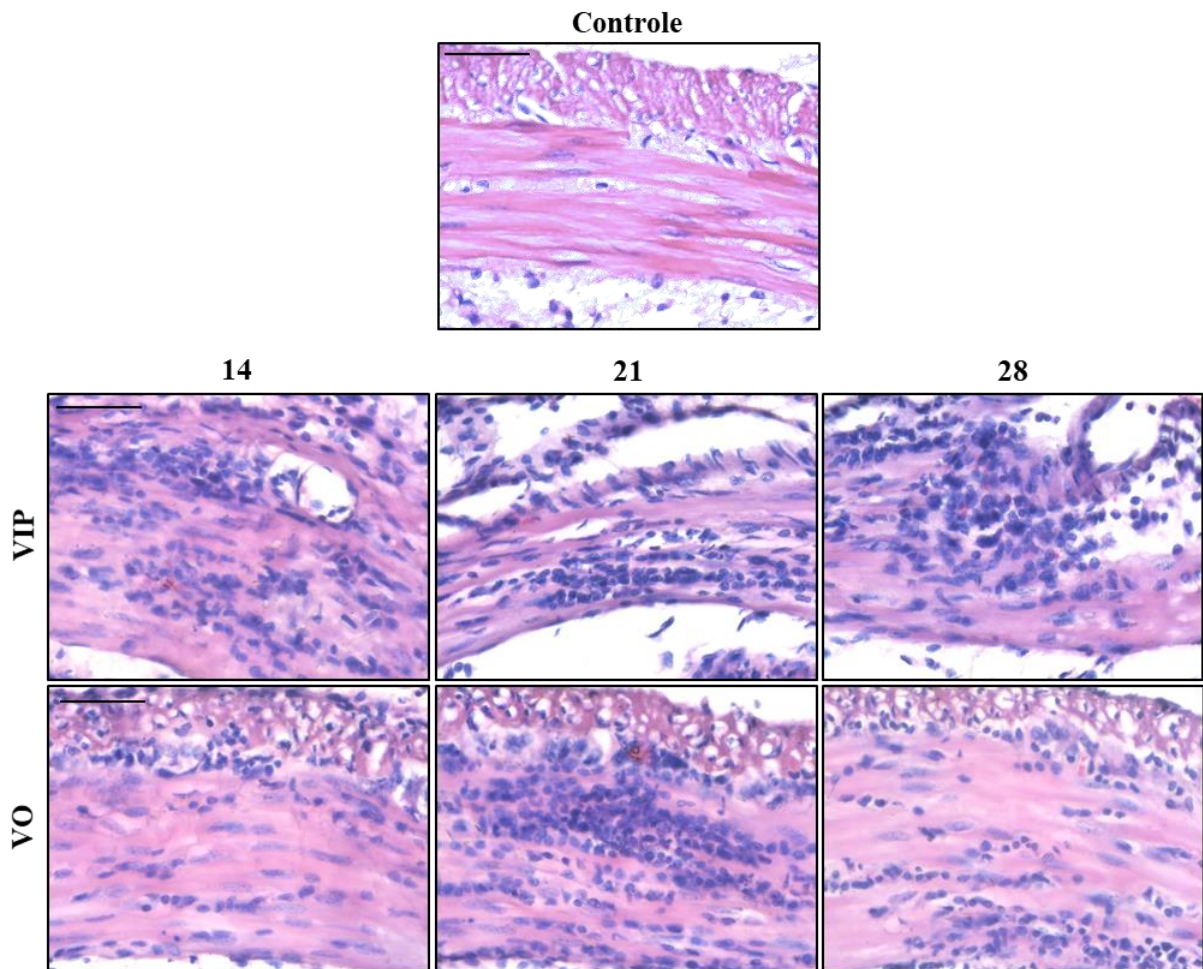




**Figura 5:** Avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório no duodeno e cólon de camundongos *Swiss*, eutanasiados nos dias 14, 21 e 28 após a infecção experimental com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. Linhas tracejadas indicam a médias dos valores de núcleos do grupo não infectado. “\*” indica diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) entre o grupo não infectado e os grupos VIP e VO. As linhas conectoras inteiras indicam diferenças entre tempos, dentro dos grupos VIP e VO. Os dados são apresentados como mediana  $\pm$  mínimo e máximo de 6 camundongos de cada grupo em cada tempo de infecção.



**Figura 6:** Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular do duodeno de camundongos após a infecção pela via oral (VO) e via intraperitoneal (VIP) com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. Aspecto histológico muscular normal em animais não-infectados (Controle). Infiltrado inflamatório moderado em 14 e 21 dias após a infecção, e ausência de processo inflamatório no 28º dia após a infecção no grupo VIP. Infiltrado inflamatório moderado nos 14º, 21º e 28º dias após a infecção no grupo VO. Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm.



**Figura 7:** Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular do cólon de camundongos após a infecção pela via oral (VO) e via intraperitoneal (VIP) com a cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. Aspecto histológico muscular normal em animais não-infectados (Controle). Infiltrado inflamatório intenso em 14 e 28 dias após a infecção, e moderado no 21º dia após a infecção no grupo VIP; infiltrado discreto no 14º dia após a infecção, intenso no dia 21 após a infecção e moderado no dia 28 após a infecção no grupo VO. Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm.

## 5 DISCUSSÃO

Após a realização deste trabalho, foi possível compreender as possíveis diferenças no perfil parasitológico e imunológico na infecção experimental por via oral e por via intraperitoneal em camundongos infectados com as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. Há dez anos tem sido reportado casos de surtos de doença de Chagas com infecção pela via oral no Brasil, principalmente na região do nordeste. Se tornando, atualmente o mecanismo de transmissão mais frequente da doença de Chagas no Brasil e outros países da América Latina.

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* induz manifestações inflamatórias progressivas capazes de afetar a estrutura e função de órgãos, as vias distintas de infecção podem afetar de forma diferente os circuitos imunológicos, estimulando as respostas imunes que impactam no perfil geral da imunidade protetora do hospedeiro. Além disso, a cepa utilizada para inoculação interfere na interação parasito-hospedeiro, gerando perfis diferenciados de resposta no organismo. A cepa VL-10 utilizada nesse trabalho é caracterizada por apresentar tropismo cardíaco, responsável por causar miocardites em camundongos. Sabe-se também que essa cepa pode afetar vários outros tecidos do corpo, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (FIGUEIREDO, et al., 2018).

A taxa de infectividade do grupo VO foi de 100% dos animais. Essa taxa de infectividade se deve provavelmente à metodologia empregando a gavagem incompleta, padronizada em nosso laboratório. Dias et al. (2013) infectaram camundongos *Swiss* pela via oral por gavagem “completa” (introduzindo a agulha até o estômago, despejando o conteúdo diretamente no ambiente gástrico) com as formas tripomastigotas sanguíneas e metacíclicas, obtendo uma baixa ou nenhuma taxa de infectividade dos animais independente do estágio evolutivo do parasito. Supõe-se que isso ocorre pelo fato de que na gavagem completa o inóculo é feito diretamente no estômago, fazendo com que o parasito interaja primeiramente com o suco gástrico. Já na gavagem incompleta isso não ocorre, uma vez que inóculo é feito na parte inicial da cavidade orofaríngea, e, portanto, o parasito tem sua primeira interação com a mucosa orofaríngea, e por isso não são eliminados pelo suco gástrico.

No que se diz respeito ao perfil parasitológico, observou-se que os animais de ambos os grupos apresentaram pico de parasitemia semelhantes. O período patente de infecção foi distinto entre os grupos, sendo que o grupo VO apresentou um período maior, sugerindo que o perfil da curva de parasitemia depende da via de inoculação.

Com relação a taxa de sobrevivência, ambos os grupos apresentaram alta taxa de mortalidade, uma vez que no 28º dia após a infecção observou-se no grupo VO uma taxa de mortalidade de 76,6% e no grupo VIP uma taxa de 92,77%. Segundo Albuquerque, et al. (2018), ao comparar a rota da infecção na mucosa pelo trato gastrointestinal, quando infectados pela via intraperitoneal ou pela cavidade oral, camundongos infectados pela via intraperitoneal apresentam maior parasitemia e mortalidade quando comparados com animais infectados pela via oral ou pela via gástrica, mesmo com inóculos similares. Além disso, camundongos infectados pela via intraperitoneal apresentam mortalidade precoce quando comparado aos camundongos infectados pela via gástrica ou oral, apresentando taxa de mortalidade de 80% a 100%, enquanto em ratos infectados pela via gástrica ou oral apresentam taxas de sobrevivência maior.

Sabe-se que as células T CD8<sup>+</sup> desempenham atividades efetoras que eliminam patógenos intracelulares, por isso são chamados de citotóxicos (revisado por Shresta et al., 1998). Estudos também já demonstraram que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são as principais células responsáveis pelo controle do *T. cruzi* (Sato et al., 1992; Rottenberg et al., 1993; Sun e Tarleton, 1993). No presente trabalho, observa-se um aumento do percentual dessas células no 21º DAI em ambas as vias de infecção, o que nos leva a sugerir que a via de inóculo parece não interferir nos níveis de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico. Collins et al. (2011) demonstraram que a infecção por essa via não altera a capacidade do *T. cruzi* de estabelecer uma resposta imune celular mediada por linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

No que se diz respeito a carga parasitária, observa-se que na infecção pela via oral houve uma maior quantidade de parasitos no duodeno, quando comparada com o cólon o que não ocorre na infecção pela via intraperitoneal. Isso sugere que a via de infecção interfere no mecanismo de infecção, uma vez que a infecção pela via intraperitoneal ocorre próximo ao intestino, onde os macrófagos presentes no peritônio fagocitam os parasitos e os leva para o órgão mais próximo, o que não ocorre pela via oral. Além disso, o parasitismo existente no duodeno em ambas as vias de infecção no 14º DAI foi capaz de desencadear um processo inflamatório nesse órgão. Esse infiltrado de células inflamatórias, por sua vez, foi suficiente para controlar os parasitos no duodeno. Ainda sobre o parasitismo, devido à alta taxa de mortalidade em ambas as vias, os parasitos provavelmente migraram para outros tecidos além do TGI, causando lesões graves que culminaram na morte dos animais.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados presentes nesse trabalho sugerem que infecção pela via oral possui um distinto perfil de resposta parasitológica e histopatológica, sendo observada uma elevada carga parasitária no duodeno dos animais infectados pela via oral, o que pode se relacionar com a manutenção do processo inflamatório neste órgão, sendo que não foi observado o mesmo perfil nos animais infectados pela via intraperitoneal.

## 7. REFERÊNCIAS

ACEIJAS, C., CORASSA, B. R., ALVES, PAB., GARELICK, H. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. **Perspectives in Public Health**, XX(X), 7-9. 2016.

ALBUQUERQUE, J. B., SANTOS, D. S., STEIN, J. V., MEIS, J. Oral Versus Intra gastric Inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection From Target Tissues, Parasite Evasion, and Immune Response. **Frontiers in Immunology**, 9:1734, 2018.

ANDERSSON, J.; ORN, A.; SUNNEMARK, D. Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. **Immunol Lett**, v. 86, n. 2, p. 207-12. 2003.

ANDRADE, L. O. & Andrews, N.W. The *Trypanosoma cruzi*-hostcell interplay: location, invasion, retention. **Nat. Ver. Microbiol.** 3,819-823. 2005.

BASTOS, C. J. C., ARAS, R., MOTA, G., DE JESUS, R. S., FREIRE, M. S., DE ARAÚJO, E. G., PRAZERES, J., GRASSI, M. F. Clinical outcomes thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from thow urban outbreaks in Northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4(6), 16-17. 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Insituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 4:389-396, 1962.

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

CAMPOS, C. F., CANGUSSÚ, S. D., DUZ, A. L. C., CARTELLE, C. T., NOVIELLO, M. L., VELOSO, V. M., BAHIA, M. T., ALMEIDA-LEITE, C. M., ARANTES, R. M. E. Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as

Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153038, 2016.

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v.47 Suppl 4, p.15-9. 2000.

COURA, J. R. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39 Suppl 3, p. 113-7, 2006.

D'AVILA REIS, D., LEMOS, E. M., SILVA, G. C., ADAD, S. J., MCCURLEY, T., CORREA-OLIVEIRA, R., MACHADO, C. R. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 2, p. 177-8. 2001.

DA SILVEIRA, A. B. M., LEMOS, E. M., ADAD, S. J., CORRE-OLIVEIRA, R., FURNESS, J. B., D'AVILA REIS, D. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human pathology**, v. 38, n. 8, p. 1256-1264. 2007.

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

DIAS, J. C. Epidemiological surveillance of Chagas disease. **Cad. Saúde Pública**. 2:43-59. 2000.

DIAS, G. B., GRUENDLING, A. P., ARAÚJO, S. M., GOMES, M. L., TOLEDO, M. J. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. **Exp. Parasitol**. 135(3):511-7. 2013.

DIAS, J. C. P. Evolution of Chagas disease screening programs and control programs historical perspective. **Global Heart**, 10(3), 193-202. 2015.

DIAS, J. C. P., *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015\*. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 25:7-86, 2016.



FIGUEIREDO, V. P., JUNIOR, E. S. L., LOPES, L. R., SIMÕES, N. F., PENITENTE, A. R., BEARZOTI, E., VIEIRA, P. M. A., SCHULZ, R., TALVANI, A. High fat diet modulates inflammatory parameters in the heart and liver during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **International Immunopharmacology**, 64:192-200, 2018.

FILIGHEDDU, M. T., GÓRGOLAS, M., RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Medicina Clinica**, 148(3), 125-131. 2017.

FIOCRUZ. Doença de Chagas (Tripanossomíase americana). Disponível em: <[http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao\\_em\\_saude/cict/doenca\\_de\\_chagas.htm](http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/cict/doenca_de_chagas.htm)>. Acesso em: 16/11/18.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 81, n. 1-3, p. 87-96. 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, **Elsevier Ed.**, 2006.

JC, P. D. Natural history of Chagas disease. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 65, n. 4, p. 359-366, 1995. ISSN 0066-782X.

JONES, E. M., COLLEY, D. G., TOSTES, S., LOPES, E. R., VNENCAK-JONES, C. L., MCCURLEY, T. L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 3, p. 348-57.1993.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and infection**, v.12, n. 7, p. 511-517. 2010.

KOEBERLE, F. Enteromegaly and Cardiomegaly in Chagas disease. **Gut**, v.4, p. 399-405. 1963.

MAEDA, F. Y., CLEMENTE, T. M., MACEDO, S., CORTEZ, C., YOSHIDA, N. Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. **Parasites & Vectors**, 9:189, 2018.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Bol Epidemiol.** 2015; 46 (21): 1-9.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. 2016. Doenças Transmissíveis e Não-Transmissíveis. Disponível em:<[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=417:doenca-de-chagas&Itemid=463](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=417:doenca-de-chagas&Itemid=463)> Acesso em: 16/11/18.

PAHO. Organización Panamericana de la Salud. 2018. Enfermedad de Chagas. Disponível em:<[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es)>. Acesso em: 16/11/2018.

PAVANELLI, W. R. Cytokines and nitric oxide in Chagas disease. **Biosaúde**, Londrina, v. 10, n. 2, p. 147-146. 2008.

PERNÍA, K., YARBUH, A. L., MORENO, E.. Dilatación del tracto digestivo de ratones infectados com *Trypanosoma cruzi*. **Investigacion clínica**, v. 42, n. 3. 2001.

REIS, M. M., HIGUCHI, M. L., BENVENUTI, L. A., AIELLO, V. D., GUTIERREZ, P. S., BELLOTTI, G., PILEGGI, F. Na in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 83, n. 2, p. 165-72.1997.

RUEDA, K., TRUJILLO, J. E., CARRANZA, J. C., VALLEJO, G. A. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: um nuevo escenario epidemiológico de la enfermedad de Chagas em Colombia y otros países suramericanos. **Biomédica**, 34(4), 631-641. 2014

SHIKANAI-YASUDA, M. A., CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, 54(6), 845-852. 2012.

STUART, K., BRUN, R., CROFT, S., FAIRLAMB, A., GÜRTLER, R. E., MCKERROW, J., REED, S., TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different disease. **J. Clin. Invest.**, 118(4):1301-10. 2008.

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

VAGO, A. R., MACEDO, A. M., ADAD, S. J., REIS, D. D., CORRÊA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v. 348, n. 9031, p. 891-2. 1996.

WHO. World Health Organization. 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/disease/en/>>. Acesso em: 16/11/2018.



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

ESCOLA DE FARMACIA



### CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que a discente **Aline Tonhela Ferraz**, número de matrícula 13.1.2231, defendeu a Monografia intitulada **"Avaliação do duodeno e cólon de camundongos infectados por via oral com a cepa vl-10 do trypanosoma cruzi"**, em 28 de Novembro de 2018 e **REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.**

Ouro Preto, 28/11 /2018

*Paula Melo A. Vieira*

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Paula Melo de Abreu  
(Orientadora)  
DECBI-ICEB-UFOP