

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Diego Costa Borges**

**PAPEL DA MICROBIOTA NA INFECÇÃO INTRAGÁSTRICA POR *TRYPANOSOMA***  
***CRUZI***

**Belo Horizonte – MG**  
**2017**

**Diego Costa Borges**

**PAPEL DA MICROBIOTA NA INFECÇÃO INTRAGÁSTRICA POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Leda Quercia Vieira

**Belo Horizonte – MG  
2017**

043

Borges, Diego Costa.

Papel da microbiota na infecção intragástrica por *Trypanosoma cruzi*  
[manuscrito] / Diego Costa Borges. – 2017.

89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Leda Quercia Vieira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Doença de Chagas. 3. Inflamação. 4.  
Microbiota. I. Vieira, Leda Quercia. II. Universidade Federal de Minas Gerais.  
Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DIEGO COSTA BORGES.** Aos dezenove dias do mês de outubro de 2017 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Papel da microbiota na infecção intragástrica por *Trypanosoma cruzi*"" , requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof<sup>a</sup>. Leda Quercia Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Ricardo Gonçalves (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Nobuko Yoshida (Universidade Federal de São Paulo), aprovado; Dr. Momtchilo Russo (Universidade de São Paulo), aprovado; Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de outubro de 2017.

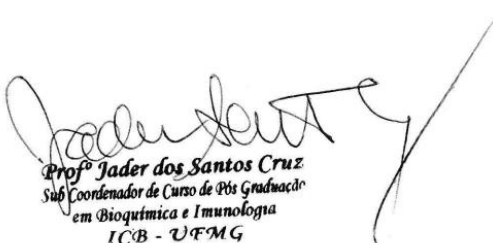
Dr. Ricardo Gonçalves (UFMG)

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Dr. Nobuko Yoshida (Universidade Federal de São Paulo)

Dr. Momtchilo Russo (Universidade de São Paulo)

Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (UFMG)

  
 Prof<sup>o</sup> Jader dos Santos Cruz  
 Sub-Coordenador de Curso de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

*Dedico esse trabalho aos meus  
pais, meu irmão e à minha  
namorada, Natalia pelo constante  
apoio e fontes de inspiração.*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Leda Quercia Vieira, pelo tempo dedicado e o constante auxílio durante o desenvolvimento dessa tese. Ainda, obrigado pela paciência e apoio nos momentos de dificuldades por mim enfrentados dentro e fora do laboratório. Obrigado por proporcionar esse ótimo ambiente de trabalho.

Ao Dr. Daniel Mucida, por me acolher durante 1 ano em seu laboratório na Universidade Rockefeller. Esse período foi único, proporcionando grande aprendizado e aprimoramento do meu raciocínio crítico. Obrigado por servir de inspiração e mostrar como é ter amor e dedicação à pesquisa.

A Debora, minha aluna de iniciação científica, por sua dedicação durante toda a execução desse trabalho. Por seu empenho mesmo “órfã” durante o período de 1 ano que não pude acompanhar durante os experimentos. Pelos bons momentos de risadas que você sempre proporcionou, inclusive naqueles momentos onde pessoas estranhas achavam que eu era o aluno de iniciação e você a pós-graduanda.

A todos os integrantes do LAGI, por fazerem do nosso laboratório um ambiente harmonioso e divertido, onde trabalhar se torna mais prazeroso. Agradeço especialmente ao Caio, Paula, Peter, Liliane, Ana Clara, Alícia, Ana Elisa, Mateus, Debora, Pierre e Leonardo pela amizade, conversas e boas risadas proporcionadas. Agradeço ainda a Grazielle, pela amizade, ajuda sempre que preciso, pela companhia de apartamento e, especialmente, por exercer tão bem a função de tomar conta de minha vida!

Ao meu amigo Bruno, pela amizade e pelos momentos felizes na UFMG. Com certeza os bons momentos de diversão vividos proporcionaram tornaram essa trajetória mais fácil.

Às agências financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, que investiram no meu trabalho e formação acadêmica.

Aos meus pais, Regina e Mozart, por todo amor e carinho. O apoio de vocês foi essencial para que eu nunca desistisse. Não tenho palavras para explicar o quanto vocês são importantes para a conclusão de mais essa etapa. Obrigado por terem me proporcionado a melhor educação possível. Finalmente, gostaria de agradecer à minha namorada, Natalia, pela paciência e incentivo constante. Obrigado por ter sido minha inspiração e em muitos momentos minha força no decorrer desses anos. Sem você eu jamais teria concluído esse doutorado nesse local onde estou hoje. Muito obrigado hoje e sempre.

## Resumo

A infecção oral por *Trypanosoma cruzi* pode ocorrer por consumo de alimentos, bebidas, frutas e sucos com as fezes de triatomíneos infectados, preparados em áreas onde os seres humanos invadiram o nicho ecológico e onde ocorre o ciclo de reservatório vetorial enzoótico; ingestão direta de vetores infectados por *T. cruzi*; consumo de alimentos contaminados com urina ou secreções de marsupiais contendo tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*; ingestão de carne de caça crua ou pouco cozida; aleitamento materno. Têm sido relatados surtos da doença na região Amazônica, Sul do Brasil e na Venezuela. Sabe-se que a interação entre a microbiota, o epitélio intestinal e as células imunes inatas e adaptativas na homeostase favorece a dominância das redes reguladoras que previnem a inflamação ou a doença imunomediada. No caso da infecção por *T. cruzi* hipotetizamos que a microbiota auxilia na regulação da resposta inflamatória exacerbada e na proteção dos neurônios do plexo mioentérico durante a infecção intragástrica. Observamos que camundongos isentos de germes (GF) apresentaram menos parasitemia e mortalidade quando comparados com camundongos convencionais (CV). Além disso, apresentaram menor lesão hepato-celular. Ao analisarmos o perfil de citocinas, notamos que no homogenato tecidual do cólon, os animais CV não apresentaram aumento de TNF, IL-12p70 e IL-17 após 21 dias de infecção, ao contrário do que pode ser visto nos animais GF. Apenas durante a fase crônica (90 dias de infecção) podemos observar aumento no perfil de citocinas inflamatórias nos animais CV, no entanto, nota-se uma manutenção na concentração de IL-10 desses animais quando se compara com a fase aguda. Ainda demonstramos que a microbiota parece exercer papel fundamental no controle da resposta inflamatória intestinal, favorecendo a manutenção da função intestinal avaliada como o trânsito intestinal e, ainda, menor dano neuronal no plexo mioentérico após a infecção intragástrica com *T.*

*cruzi*. Concluimos que a microbiota fornece regulação da resposta inflamatória desencadeada pela infecção por *T. cruzi*, resultando em maior multiplicação parasitária, mortalidade e lesão hepática. Em contraste, a microbiota auxilia na proteção neural do plexo mientérico e na manutenção da função intestinal.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, infecção oral, camundongos isentos de germes, resposta inflamatória intestinal, microbiota.

## Abstract

Oral infection by *Trypanosoma cruzi* can be caused by consumption of food, beverages, fruits and juices as feces from infected triatomines, prepared in areas where humans have invaded the ecological niche and where the enzootic vector reservoir cycle occurs; direct ingestion of vectors infected by *T. cruzi*; consumption of food contaminated with urine or marsupial secretions containing *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes; ingestion of raw or undercooked game meat; breastfeeding. Outbreaks of the disease have been reported in the Amazon region, south Brazil and Venezuela. It is known that the interaction between the microbiota, intestinal epithelium and innate and adaptive immune cells in homeostasis favors a dominance of regulatory networks that prevent inflammation or an immune-mediated. We hypothesized that the microbiota helps in the regulation of exacerbated inflammatory response and protection of myenteric plexus neurons during *T. cruzi* intragastric infection. We observed that germ-free (GF) mice had less parasitemia and mortality when compared to conventional (CV) mice. In addition, they presented less hepatocellular lesion. When we analyzed the cytokine profile of colon tissue homogenate, we noticed that CV animals did not show increased TNF, IL-12p70 or IL-17 after 21 days of infection, contrary to GF animals. Only during the chronic phase (90 days of infection) we observed an increase in the levels of inflammatory cytokines in CV animals. However, a maintenance in the concentration of IL-10 in the colon was observed when compared to the acute phase. We have also demonstrated that the microbiota seems to play a fundamental role in the control of bowel inflammation, favoring a better maintenance of the intestinal function evaluated with the intestinal transit, and also some control of neuronal damage in the myenteric plexus after the intragastric infection with *T. cruzi*. We conclude that the microbiota provides desregulation of the inflammatory response triggered by *T. cruzi* infection, resulting in increased parasite multiplication, mortality, and liver injury. In contrast, a microbiota helps in the neural protection

of the myenteric plexus and in the maintenance of intestinal function.

**Key-words:** *Trypanosoma cruzi*, oral infection, germ free mice, gut inflammatory response, microbiota.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos hospedeiros invertebrado e vertebrado (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC)).....	19
<b>Figura 2.</b> Distribuição dos casos de infecção oral por <i>T. cruzi</i> na América do Sul e a classificação das cepas de acordo com seu DTU (distintas unidades gênicas de caracterização do parasita) [30].....	26
<b>Figura 3.</b> Curva de parasitemia e sobrevida de camundongos infectados por via intragástrica com <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	51
<b>Figura 4.</b> Quantificação das enzimas hepáticas de camundongos infectados por via intragástrica com <i>Trypanosoma cruzi</i> durante a fase aguda da infecção (21 dias).....	52
<b>Figura 5.</b> Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato do cólon de camundongos infectados por via intragástrica com <i>Trypanosoma cruzi</i> durante a fase aguda da infecção (21 dias).....	54
<b>Figura 6.</b> Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato do baço de camundongos infectados por via intragástrica com <i>Trypanosoma cruzi</i> durante a fase aguda da infecção (21 dias) .....	55
<b>Figura 7.</b> Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato do linfonodo mesentérico de camundongos convencionais e isentos de germes infectados por via intragástrica com <i>Trypanosoma cruzi</i> durante a fase aguda da infecção (21 dias).....	56
<b>Figura 8.</b> Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato do fígado de camundongos infectados por via intragástrica com <i>Trypanosoma cruzi</i> durante a fase aguda da infecção (21 dias).....	57
<b>Figura 9.</b> Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato do intestino (cólon) de camundongos infectados por via intragástrica com <i>Trypanosoma cruzi</i> durante a fase crônica da infecção (90 dias)..	58
<b>Figura 10.</b> Alterações intestinais decorrentes da infecção aguda com <i>Salmonella Typhimurium</i> mutante	

spiB (spiB).....	60
<b>Figura 11.</b> Alterações intestinais decorrentes da infecção aguda com <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	62
<b>Figura 12.</b> Avaliação dos aspectos funcionais do intestino de camundongos CV e GF após infecção intragástrica (IG) .....	64
<b>Figura 13.</b> Estratégia de gate utilizada para a identificação e quantificação de macrófagos contidos na lâmina própria e camada muscular do intestino grosso .....	65
<b>Figura 14.</b> Frequência de macrófagos na camada muscular e lâmina própria do intestino grosso em camundongos CV e GF após 21 dias de infecção .....	66
<b>Figura 15.</b> Imunofenotipagem de dois tipos celulares da linhagem celular monocítica no fígado e no baço de camundongos infectados por via oral com <i>Trypanosoma cruzi</i> durante a fase aguda da infecção.....	67
<b>Figura 16.</b> Avaliação do parasitismo de macrófagos derivados de medula infectados in vitro pela cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	69

## Sumário

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.</b>	<b>Doença de Chagas</b> .....	<b>17</b>
1.1.1	Aspectos Gerais.....	17
1.1.2	Epidemiologia.....	20
1.1.3	Fases da doença .....	21
1.1.4	Fisiopatologia .....	22
1.1.5	A infecção oral.....	24
1.1.6	Resposta imunológica na doença de Chagas experimental e correlação com dados encontrados em pacientes humanos .....	27
<b>1.2.</b>	<b>Microbiota e sua importância</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3.</b>	<b>Inter-relação entre macrófagos, microbiota e neurônios entéricos</b> .....	<b>32</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1.</b>	<b>Cultivo de parasitos</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.</b>	<b>Animais, infecção e eutanásia</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3.</b>	<b>Parasitemia e sobrevivida</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4.</b>	<b>Enzimas hepáticas</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5.</b>	<b>Quantificação de citocinas</b> .....	<b>43</b>

4.6.	Quantificação de lipocalina 2 no conteúdo fecal.....	44
4.7.	Quantificação de neurônios na camada muscular do cólon.....	<b>44</b>
4.8.	Citometria de fluxo.....	45
4.9.	<i>Salmonella</i> e infecção.....	46
4.10.	<i>Toxoplasma gondii</i> e infecção.....	46
4.11.	Trânsito gastrointestinal .....	46
4.12.	Avaliação miográfica.....	47
4.13.	Ensaio de infecção <i>in vitro</i> .....	47
4.14.	Análise estatística.....	<b>48</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
5.1.	A microbiota determina a multiplicação parasitária e a sobrevivência de camundongos infectados intragastricamente por <i>T. cruzi</i> .....	50
5.2.	Camundongos convencionais apresentam aumento na lesão celular hepática.....	51
5.3.	A ausência de microbiota influencia na resposta inflamatória desenvolvida durante a infecção. .....	52
5.4.	<i>Trypanosoma cruzi</i> e outros patógenos intestinais comprometem funcionalmente o intestino. .....	58
5.5.	<i>T. cruzi</i> e <i>T. gondii</i> comprometem funcionalmente o intestino de forma permanente.....	61
5.6.	Animais GF apresentam maior inflamação intestinal, mas proporcionalmente, mesmo atraso no trânsito intestinal e perda neuronal após infecção intragástrica com <i>T. cruzi</i> quando comparados com camundongos CV.....	63

5.7	A infecção intragástrica promove aumento no recrutamento de macrófagos para a camada muscular e lâmina própria do intestino em animais CV e GF .....	64
5.8	. A infecção por <i>T. cruzi</i> promove aumento no número de fagócitos mononucleares em animais convencionais e isentos de germes .....	66
5.9.	Macrófagos de camundongos isentos de germes possuem menor taxa de fagocitose .....	68
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>70</b>
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>78</b>
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

## **1.1 Doença de Chagas**

### **1.1.1 Aspectos Gerais**

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanosomíase Americana, é uma antropozoonose causada pela infecção do protozoário *Trypanosoma cruzi* [1]. Este é um membro da família Trypanosomatidae da classe Kinetoplastida, que se desenvolve em insetos hematófagos da família Reduviidae, em pequenos mamíferos de vida silvestre e em humanos. O nome da classe dá-se pela presença do cinetoplasto, uma mitocôndria modificada rica em DNA. A análise do seu DNA extranuclear é um dos parâmetros utilizados na caracterização bioquímica de diferentes cepas de *T. cruzi* [2].

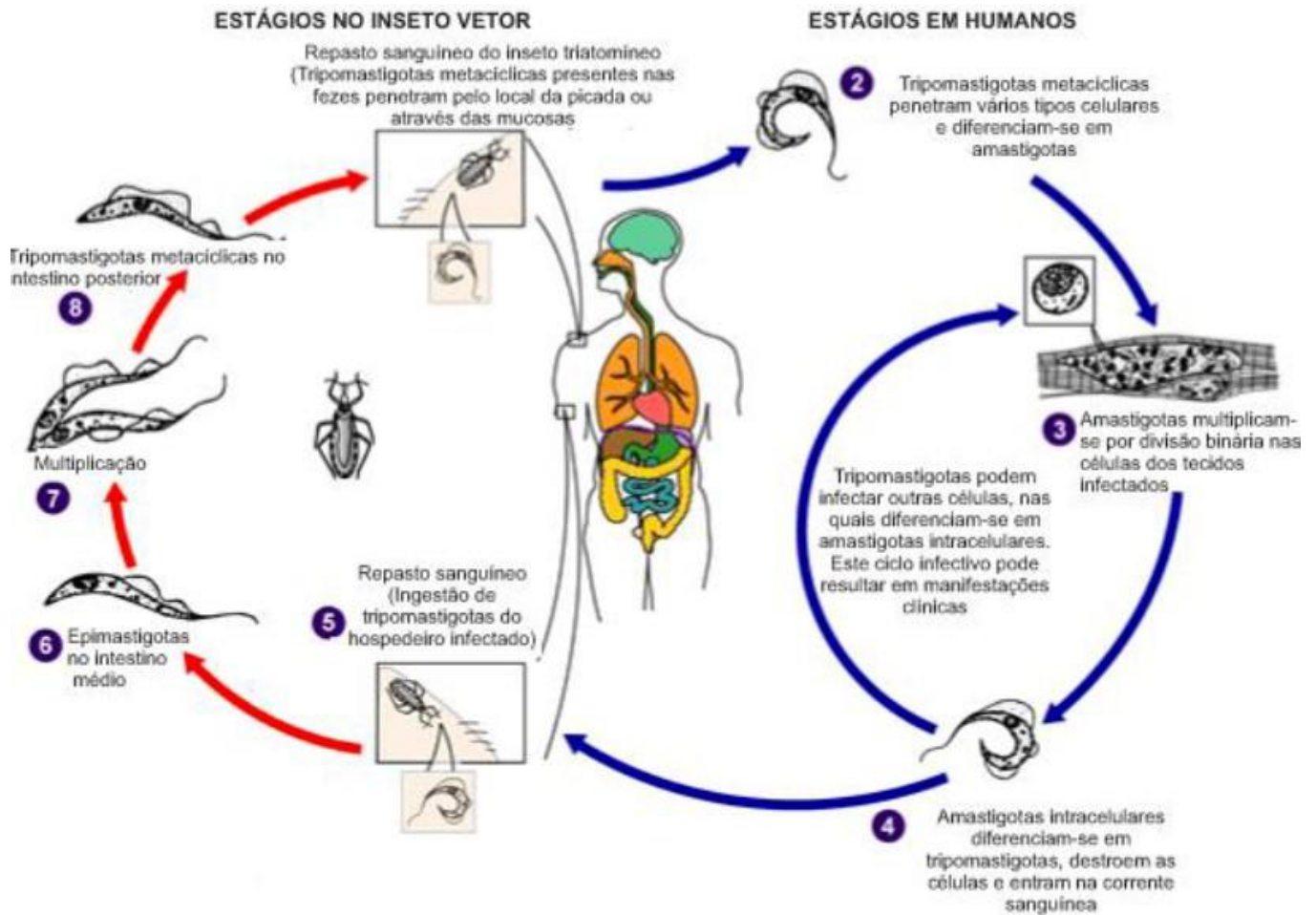
O *T. cruzi* possui ciclo silvestre, no qual o protozoário circula entre animais e triatomíneos silvestres; ciclo peridoméstico, quando animais domésticos e vetores peridomiciliares permutam o parasita com animais e vetores silvestres; e ciclo doméstico, no qual o protozoário circula entre vetores e os habitantes domiciliares [3]

O ciclo de vida do protozoário ocorre em hospedeiro vertebrado e invertebrado. Nos hospedeiros vertebrados, os tripomastigotas eliminados nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o repasto sanguíneo, penetram pelo local da picada e interagem com células do sistema fagócito mononuclear da pele ou mucosas. Neste local, ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que aí se multiplicam por divisão binária simples. A seguir, ocorre a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, que são liberados da célula hospedeira caindo no interstício. O *T. cruzi* pode ser encontrado em muitos e diferentes sítios, predominando na fase aguda os tripomastigotas sanguíneos e a infecção por amastigotas de órgãos e sistemas como o músculo

cardíaco, músculos esqueléticos e lisos, células sanguíneas e do sistema fagocítico mononuclear (inclusive em linfonodos, baço e fígado), supra-renal (formas amastigotas e tripomastigotas), sistema nervoso, ovários e testículos, pele, tecido subcutâneo, etc. Em indivíduos crônicos imunodeprimidos (por drogas, irradiações ou co-infecções) a parasitemia pode ser significativamente aumentada (formas tripomastigotas), assim como podem ocorrer lesões dermatológicas repletas de amastigotas [4]. Os hospedeiros invertebrados se infectam ao ingerir as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado durante o repasto. No estômago eles se transformam em formas arredondadas chamadas esferomastigotas e, em seguida, em epimastigotas. No intestino médio as epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples. Na porção terminal do tubo digestivo, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, infectantes para os vertebrados [5].

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes do inseto vetor durante o repasto sanguíneo penetram na pele através do local da picada ou contaminam as mucosas do hospedeiro vertebrado. As tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares (macrófagos, células epiteliais, fibroblastos, células musculares lisas e estriadas) em um processo que envolve o reconhecimento de uma grande variedade de moléculas presentes nas células do parasito e do hospedeiro, dando início ao ciclo intracelular do *T. cruzi*. Após a invasão, as tripomastigotas ficam contidas em uma estrutura conhecida como vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo, as tripomastigotas afiladas e alongadas gradualmente se diferenciam em formas amastigotas arredondadas. Esse processo ocorre paralelamente à lise da membrana do vacúolo parasitóforo por enzimas secretadas pelo parasito, possibilitando então, que as amastigotas, em contato direto com o citoplasma, iniciem seu processo de divisão binária [6]. Após alguns ciclos de divisão, as amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que

são liberadas após a ruptura da célula hospedeira, alcançando a corrente sanguínea ou invadindo outras células e mantendo a infecção [7]. Estes parasitos circulantes podem então, infectar um novo hospedeiro invertebrado durante seu repasto sanguíneo, fechando o ciclo de vida natural do *T. cruzi* (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros invertebrado e vertebrado (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC)).

Dentre as formas de transmissão, a oral tem caráter habitual, através da ingestão de vetores e reservatórios infectados. No caso do homem, esta transmissão tem apresentado aumento

no número de incidência no Nordeste, Norte, casos isolados em Santa Catarina, através da ingestão de caldo de cana e açaí contaminados com dejetos dos triatomíneos ou até mesmo com o próprio vetor [8,9].

### **1.1.2 Epidemiologia**

Desde a descoberta da Doença de Chagas por Carlos Chagas em 1909, o conhecimento sobre a epidemiologia da doença e seu controle evoluiu em três fases: a fase da descoberta, a fase de divulgação do conhecimento e da fase de aplicar esse conhecimento para o controle e vigilância de infecção humana. Sendo assim, foi somente em 1983 que o controle da Doença de Chagas foi estabelecido no Brasil de uma forma regular e contínua, e isto foi estendido a outros países através da criação do chamado Cone Sul, em 1991, dos países andinos, em 1997, da América Central e México, em 1998, e dos países amazônicos, em 2004. Mais recentemente, uma iniciativa entre os países não-endêmicos foi criada, em resposta à intensa migração de pacientes provenientes de países endêmicos para os não-endêmicos [10].

A distribuição geográfica da infecção chagásica, incluindo os seus reservatórios e seus vetores, se estende desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. Assim, ele abrange todas as Américas, e 90 milhões de pessoas nesta região estão expostos à infecção. Atualmente, é estimado que 15 milhões de pessoas apresentam infecção por *T. cruzi* [5].

A crescente migração de indivíduos moradores de áreas endêmicas para os Estados Unidos e Europa, propiciou a disseminação da Doença de Chagas por essas regiões, devido à ausência de testes de triagem para chagas em bancos de sangue e a falta de informação desses

países em relação à tripanosomíase americana. Estima-se que nos Estados Unidos, na década de 90 existiam entre 100 mil e 370 mil pessoas infectadas na fase crônica da Doença de Chagas, desse total, 75 mil apresentavam cardiomiopatias [11]. A cada ano, cerca de 20 mil pessoas morrem de cardiopatia chagásica crônica nos países endêmicos e anualmente pode matar cerca de 250 imigrantes infectados com *T. cruzi* nos Estados Unidos [12].

No Brasil, a prevalência de soros-reagentes entre doadores nos hemocentros foi de 0,69% em 1996, em comparação a uma mediana superior aos 2% nos anos 70 [13]. O coeficiente de mortalidade específica para doença de Chagas caiu de 5,2/100.000 habitantes, em 1980, para 3,5/100.000 em 1997. Um número progressivamente menor de internações causadas pela enfermidade é registrado a cada ano na rede de assistência médica pública e particular. Segundo dados gerados através de autorizações de internações hospitalares pelo SUS, o número de internações por Doença de Chagas em 1990 foi de 1.836 internações contra 1.343 em 1998 [14].

### **1.1.3 Fases da doença**

São descritas duas fases distintas na evolução da doença: a fase aguda com duração de aproximadamente 60 dias, e a fase crônica com duração indeterminada. A fase aguda da na maioria das vezes é assintomática e quando apresenta sintomatologia é caracterizada por febre e miocardite relacionadas ao parasitismo intracelular, sinal de porta de entrada, febre, sinais de insuficiência cardíaca, edema de face e de membros inferiores, enfartamento ganglionar e hepatoesplenomegalia. Os sintomas da fase aguda tendem a resolver espontaneamente com 3 a 8 semanas [15]. A maiorias dos pacientes, após a fase aguda, permanecem com sorologia positiva. A evolução dessa fase da

doença irá culminar na fase crônica da, na qual é difícil a observação do protozoário no sangue circulante, mas é possível verificar na intimidade dos tecidos, isso já fora observado nos trabalhos iniciais de Chagas [1]. Em um primeiro momento na fase crônica, o indivíduo pode não apresentar sinais e sintomas clínicos, o que caracteriza a forma indeterminada da. Porém, há outros indivíduos que durante a fase crônica podem manifestar sintomas e estes irão determinar formas anátomo-clínicas distintas. As formas anátomo-clínicas na fase crônica são: cardíaca, digestiva, mista (cardíaca e digestiva), nervosa e nas últimas décadas, a reativação da [16]. Na fase crônica cerca de 20% a 30% dos pacientes infectados evoluem para forma clínica cardíaca ou digestiva em até 30 anos, além disso, cerca de 20% a 25% dos infectados apresentam progressivo dano cardíaco resultante da destruição maciça de cardiomiócitos, do sistema condutor e fibrose exacerbada, conduzindo a disfunções como arritmias, distúrbios de condução e insuficiência cardíaca congestiva, a cardiomiopatia chagásica crônica [17].

#### **1.1.4 Fisiopatologia**

Os parasitos depositados na pele ou feridas na mucosa estimulam uma reação inflamatória local (chagoma de inoculação) com uma resposta linfo-reticular. Os tripomastigotas fagocitados pelos macrófagos são transportadas para o fígado, gânglios linfáticos, baço e músculos esquelético e cardíaco, formando pseudocistos. Quando ocorre desmembramento do pseudocisto no miocárdio, tem-se a miocardite aguda. Esta é mediada por células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e interleucinas, principalmente IL-2 e IL-4 [18].

Têm-se várias explicações para o dano cardíaco: resposta imune parasita-específicos contra o *T. cruzi* ou antígenos persistentes no coração; miocitólise mediada pelo parasita; dano neural primário; lesão da microvasculatura cardíaca; citotoxicidade mediada por anticorpos e

danos não específicos por eosinófilos e neutrófilos; secreção de toxina pelo parasita; autoimunidade induzida pelo parasita [19]. As lesões da fase aguda da doença são caracterizadas pela presença de reação inflamatória localizada, com predominância de células mononucleares nos focos de ruptura de pseudocistos, ocasionalmente com a formação de granulomas, localizado principalmente no músculo e no tecido cardíaco. A miocardite chagásica crônica se caracteriza por miocardite focal após a invasão do parasita e infiltração de células inflamatórias em miofibras cardíacas e extensa fibrose, destruição do sistema de condução e grande redução dos neurônios cardíacos. Frequentemente nota-se hipertrofia das fibras miocárdicas e dilatação das cavidades, com a presença de trombos, fibrose e afinamento do ápice do ventrículo esquerdo [19,20].

A infecção direta pelo *T. cruzi* de células cardíacas pode retardar a condução cardíaca e alterar o padrão de propagação do impulso como consequência da diminuição da força de acoplamento elétrico [21]. Esse acoplamento elétrico é realizado pelas chamadas junções gap, que têm o papel de mediar o fluxo de corrente elétrica, coordenar a propagação da excitação e contração ao longo do miocárdio [22]. Além disso, as junções unem os cardiomiócitos vizinhos e oferecem uma aderência mecânica, bem como de acoplamento elétrico e metabólico. O aumento da produção local e secreção de TGF- $\beta$  pode contribuir para a redução da comunicação juncional em cardiomiócitos. Através de uma redução da conexina 43, principal proteína que compõe os canalículos das junções gap [23]. Tem sido demonstrado que o aumento da expressão de TGF- $\beta$  promove a redução de conexina 43 mesmo em cardiomiócitos não infectados, similarmente ao que foi observado nas células infectadas por *T. cruzi* [33]. Além disso, TGF- $\beta$ , que é uma citocina que intercede os efeitos pró-inflamatórios em baixas concentrações e os efeitos antiinflamatórios em altas concentrações, garante um equilíbrio entre o controle e a eliminação de organismos infecciosos por um lado, e de prevenção de patologias auto-imunes por outro lado. O TGF- $\beta$  também contribui para a fibrose, aumentando a síntese de colágeno e outras proteínas da matriz

extracelular e diminui sua degradação [24].

Na doença de Chagas observam-se distúrbios autonômicos e da microcirculação que, na verdade, constituem peculiaridades proeminentes na cardiomiopatia chagásica sendo fundamental no mecanismo da doença. Apesar disso, a patogênese da cardiopatia chagásica crônica está totalmente dependente de uma baixa mas persistente presença do parasita que pode expressar proteínas de membrana análogas às encontradas nas miocélulas, fazendo com o sistema imune reconheça cardiomiócitos como estranhos, resultando na agressão do miocárdio [25]. Por outro lado, sabe-se que a falta de correlação entre a infecção por *T. cruzi* e os danos produzidos na Doença de Chagas deve-se a um problema de baixa sensibilidade das técnicas empregadas para a identificação do parasita, em vez de uma verdadeira ausência de parasitas nos tecidos dos pacientes infectados [26].

A infecção por *T. cruzi* na fase crônica também pode afetar o sistema digestório, principalmente esôfago e cólon. No megacólon, distúrbios da motilidade estão associados com o alargamento do cólon e com a constipação intestinal. O reto e o cólon sigmóide são os segmentos mais comprometidos, nos quais se observa o alargamento luminal e a hipertrofia muscular. Lesões inflamatórias no sistema nervoso entérico estão associadas com uma substancial redução do número de neurônios ocasionando destruição do plexo mioentérico com redução neuronal que começa na fase aguda e continua na fase crônica da doença. Nesta última, pode ocorrer redução do peristaltismo e dilatação acompanhada de hipertrofia da muscular sem obstrução mecânica, caracterizando o quadro de megacólon chagásico [27]. No cólon, a presença de parasitas é muito baixa sendo necessário métodos moleculares para detectar o DNA do parasita [28,29].

### **1.1.5 A infecção oral**

As seguintes formas de transmissão por via oral já foram postuladas: (I) Consumo de

alimentos, bebidas, frutas e sucos com as fezes de triatomíneos infectados, preparados em áreas onde os seres humanos invadiram o nicho ecológico e onde ocorre o ciclo de reservatório vetorial enzoótico. (II) Ingestão direta de vetores infectados por *T. cruzi*. (III) Consumo de alimentos contaminados com urina ou secreções de marsupiais contendo tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*. (IV) Ingestão de carne de caça crua ou pouco cozida. (V) Consumo de sangue de animais selvagens durante rituais religiosos ou medicina popular em algumas áreas rurais e selvagens. (VI) Aleitamento materno [30].

Até agora, no estado de Amazonas, foram apresentadas três descrições de surtos de doença aguda de Chagas por transmissão oral, em Tefé, em 2004 [31], em Coarí, ao lado do rio Solimões, em 2008 [32] e em Santa Izabel do Rio Negro, em 2010 [33]. Vários outros surtos isolados da doença foram observados no Brasil, sem grande repercussão. O maior surto de transmissão oral da infecção por *T. cruzi*, que envolveu 103 casos agudos de doença de Chagas, ocorreu em Caracas, Venezuela [34] (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição dos casos de infecção oral por *T. cruzi* na América do Sul e a classificação das cepas de acordo com seu DTU (distintas unidades gênicas de caracterização do parasita) [30].

Do ponto de vista clínico, após a infecção oral os sinais inflamatórios cutâneos oculares tradicionais não estão presentes e as manifestações clínicas na fase aguda tendem a ser mais graves em comparação com a doença de Chagas adquirida por contato dérmico ou mucoso com o vetor.

Além disso, desconhece-se se o curso clínico da fase crônica da doença e a resposta ao tratamento diferem dos indivíduos infectados pelo mecanismo vetorial clássico [30].

Dentre os sintomas, a febre alta e prolongada inexplicada é o sinal dominante de infecção oral. No entanto, dor de cabeça e fraqueza podem ocorrer independentemente da febre. A cardiopatia aguda com arritmia e derrame pericárdico podem estar presentes. A ocorrência de arritmia, derrame pericárdico e cardiomegalia com causalidade desconhecida também sugerem doença de Chagas aguda [35]. Além disso, a sintomatologia durante a infecção oral, similar ao que ocorre durante as outras formas de infecção, é determinada pela resposta imune do indivíduo infectado e pelo inóculo de parasitos que promoveu a infecção [30].

A infecção oral ocorre por intermédio da forma tripomastigota metacíclica do parasito, que possui a molécula de superfície gp82, mediadora da invasão das células hospedeiras induzindo o sinal de  $Ca^{2+}$  [36] e a dispersão do lisossomo para a periferia celular, seguida de exocitose [37], que contribui para a biogênese do vacúolo parasitóforo e, por conseguinte, multiplicação do parasito [38,39].

### **1.1.6 Resposta imunológica na doença de Chagas experimental e correlação com dados encontrados em pacientes humanos.**

O *T. cruzi* provoca intensa resposta imunológica inata e específica, gerando áreas focais de inflamação vistos principalmente no tecido cardíaco em camundongos infectados [40]. No início da infecção, o controle do parasitismo é dependente da imunidade inata, com a síntese de citocinas e a ativação de diversos tipos celulares, como células natural killer (NK) e macrófagos [41]. O parasitismo é controlado por vários mecanismos de imunidade: macrófagos ativados, opsonização por anticorpos, citotoxicidade celular mediada por células T, resposta imune parasita-específico

contra o *T. cruzi* ou antígenos persistentes no tecido cardíaco [19].

Durante a infecção aguda experimental com *T. cruzi*, quando o parasitismo é elevado, existe um aumento na síntese de quimiocinas no miocárdio em resposta a moléculas do parasita. A infecção inicialmente induz a uma resposta imune inata estimulando as células NK a produzir IFN- $\gamma$  [42]. Além do IFN- $\gamma$ , o TNF estimula os macrófagos a produzirem complexos microbicidas, como o óxido nítrico, útil no controle do parasitismo tecidual, mas que em altas concentrações pode promover citotoxicidade, provocando lesão tecidual e morte dos animais [43]. Por outro lado, foi demonstrado que na primeira semana após infecção de camundongos com *T. cruzi* a produção de óxido nítrico é independente de IFN- $\gamma$  e TNF, sendo o óxido nítrico produzido após coestimulação dos macrófagos por IFN tipo I [44].

O padrão de resposta imune do tipo 1 é caracterizado por uma produção de IL-12 que ativa as células NK e T CD8+, além do estímulo de síntese de IFN- $\gamma$ , com o intuito de aumentar a atividade microbicida com a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. A IL-12 é essencial na diferenciação de células T CD4+ no subtipo Th1 [45]. Como na infecção por *T. cruzi* há uma dependência da resposta imune mediada por célula com produção de IFN- $\gamma$  para ativar a produção de óxido nítrico nos macrófagos, a resposta imune do tipo Th1 é essencial no combate ao parasita. No entanto, o óxido nítrico em altas concentrações está envolvido na patogênese da disfunção neuronal e miocárdica, observada em animais de experimentação, através da indução de apoptose de miócitos cardíacos [46]. Ainda em relação à indução de apoptose de cardiomiócitos pelo óxido nítrico [47] ao analisar o ventrículo esquerdo de pacientes com doença de Chagas necropsiados, relataram a ocorrência de apoptose das miocélulas cardíacas, levantando a hipótese de que a morte celular programada pode ser induzida por mediadores imunes produzidos durante a resposta inflamatória no tecido cardíaco.

Em contrapartida, o óxido nítrico pode suprimir a resposta imune ao *T. cruzi* através da indução de apoptose de células T nos órgãos periféricos durante a fase aguda da, constituindo um mecanismo de escape do parasita [48]. Além disso, a fagocitose de corpos apoptóticos pode induzir a liberação de TGF- $\beta$  e prostaglandina E2, imunomoduladores envolvidos na regulação da resposta imune, acarretando outra forma de escape [49].

Na fase crônica da infecção experimental, o parasitismo tecidual é controlado por uma resposta imune adaptativa dependente de IFN- $\gamma$ , na qual ocorre a produção das quimiocinas CXCL1-3 e CCR5 localizadas em volta do processo inflamatório crônico no coração [40]. Já em humanos, os níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  apresentam diferença significativa entre os grupos da forma indeterminada e cardíaca. A forma cardíaca apresenta um significativo aumento na secreção de IFN- $\gamma$  e diminuição dos níveis de IL-10, quando comparada com a forma indeterminada, que possui alta produção de IL-10 e baixa de IFN- $\gamma$  quantificadas no soro em humanos. [50] demonstrou a relação entre a produção de IFN- $\gamma$  e o desenvolvimento de patologias cardíacas, mostrando que o aumento do nível de IFN- $\gamma$  é paralelo à gravidade do envolvimento cardíaco. Sendo assim, a citocina IL-10 de um modo geral regula a resposta imune controlando a resposta inflamatória, a ação de macrófagos e a produção de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico [51].

O mecanismo regulador do sistema imune envolve células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> reguladoras (Tregs), representando cerca de 5-10% de todas as células T CD4<sup>+</sup> em camundongos adultos [52].

A persistência do parasita está relacionada com a população de Tregs, que são importantes na proteção contra a reação inflamatória crônica por suprimir a resposta imune [53]. Na infecção aguda experimental pelo *T. cruzi* estudada por [52], verificou-se que a inibição de células Tregs acarretava o aumento da miocardite e da mortalidade, além de ocasionar uma significativa redução nos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  após 10 dias de infecção.

Por anos, o balanço da resposta imune foi explicado pelo balanço na produção de citocinas. Nesse sentido, a resposta imune Th17 apresenta importante papel no controle do parasitismo e no processo inflamatório, através da produção de IL-17, IL-21, IL-22 e TNF [54]. Acredita-se que a diferenciação Th17 é mediada pela combinação do fator de transcrição ROR $\gamma$ T, sendo dependente de STAT-3 e requerem a presença de IL-1, IL-6, IL-21, TGF- $\beta$  e a expressão do receptor de quimiocinas CCR6 [55,56]. A resposta Th17 tem sido ligada a inúmeras patologias e doenças auto-imunes. Além disso, [57] sugere o possível envolvimento de IL-17 na patogênese da Doença de Chagas.

Para a manutenção dos níveis de resposta Th17 é importante a ativação do receptor 4 do tipo Toll, que induz a produção de IL-23 por células dendríticas. A citocina IL-23 tem como papel manter os níveis de IL-17 e, por conseguinte, a resposta Th17 [58].

## **1.2 Microbiota e sua importância**

A superfície do trato gastrointestinal possui um número de bactérias da ordem de  $10^{14}$ , sendo o órgão mais colonizado [59]. A microbiota intestinal pode beneficiar o hospedeiro de diversas maneiras, incluindo nas funções metabólicas [60-62], na resposta imune sistêmica [63] e na homeostase intestinal [64-66]. Em adição a essas influências na homeostase, a microbiota possui um importante papel protetor contra patógenos invasores, através de competição por espaço, aumento na competição por nutrientes e na indução de IgA [67,68].

A interação entre a microbiota, o epitélio intestinal e as células imunes inatas e adaptativas na homeostase favorece a dominância das redes reguladoras que previnem a inflamação ou a doença imunomediada. Notavelmente, as defesas inatas são suficientemente robustas, pois grande parte da resposta do hospedeiro à microbiota progride sem o envolvimento de respostas

dependentes de células T CD4<sup>+</sup>. Já quando a resposta imune adaptativa é recrutada, normalmente é limitada à camada mucosa de modo que uma resposta imune sistêmica não é gerada. Isto é devido ao endereçamento de células imunes adaptativas para o trânsito de volta à camada mucosa após a sua diferenciação nas placas de Peyer ou nos linfonodos mesentéricos. Finalmente, a apresentação do antígeno em estado estacionário por células dendríticas intestinais favorece o desenvolvimento de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras, que atuam para suprimir o desenvolvimento de respostas pró-inflamatórias de células T para evitar inflamação excessiva [66].

Para equilibrar o papel da microbiota com a necessidade de organizar defesas do hospedeiro contra patógenos, o sistema imune adaptativo evoluiu para direcionar o desenvolvimento de diferentes populações de células T CD4<sup>+</sup>. Enquanto as células Treg compõem o padrão celular em condição de homeostase, as células Th17 compõem a resposta inflamatória para o controle de patógenos em condições de perda da imunorregulação e ocorrência de disbiose [69].

Mudanças na composição da microbiota intestinal induzida por alterações na dieta, tratamento com antibiótico ou patógenos invasores, podem prejudicar a resposta imune que normalmente tende a controlar a resposta inflamatória no intestino, podendo contribuir para o desenvolvimento de síndromes inflamatórias intestinais [70].

Em animais isentos de germes infectados com *Salmonella*, a ausência de microbiota permite que essa bactéria produza energia de forma mais eficiente. As espécies reativas de oxigênio, ao reagir com um composto contendo enxofre, formam um novo transportador de elétrons da cadeia respiratória que é utilizado pela *S. typhimurium* para produção de energia. [71]. Entretanto, a recolonização de animais isentos de germes com microbiota espécie específica restaura a resposta imune intestinal e reduz as unidades formadoras de colônia de *Salmonella* quatro dias após a infecção [72]. Além disso, células Th17 induzidas pela microbiota também contribuem para a

proteção contra a infecção por *Salmonella* e *Toxoplasma gondii* por produzir IL-17 e IL-22, que promove o estímulo de produção e secreção de IgA, induzindo a produção de peptídeos antimicrobianos e contribuindo para o recrutamento de neutrófilos [66,68,73,74]. Ainda, a microbiota envia sinais para células do sistema imune no compartimento intestinal, através de receptores de reconhecimento padrão como TLRs que promovem a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  por células T e reduz a frequência de células T reguladoras [74,75]. As células dendríticas também recebem sinais mediados por TLRs da microbiota que promovem resposta imune Th1 [74,76] ou induzem produção de IL-22 e IL-23, que podem aumentar a ação protetora exercida pela microbiota [74,77]. Fato similar é descrito em animais isentos de germes infectados com *T. cruzi* [78], em que animais gnotobióticos colonizados com *E. faecalis*, *B. vulgatus* ou *Peptostreptococcus sp.* apresentaram maiores resposta Th1, produção de NO por células esplênicas em cultura e níveis de IgG2a sérica quando comparados com animais isentos de germes [78].

### **1.3 Inter-relação entre macrófagos, microbiota e neurônios entéricos**

Macrófagos são os produtores primários de mediadores inflamatórios durante doenças autoimunes e autoinflamatórias. A via de sinalização dependente de quinase que emana dos receptores de reconhecimento padrão em macrófagos são bem descritos e ativam fatores de transcrição latentes, como NF- $\kappa$ B, CREB, AP-I, para iniciar a transcrição gênica das citocinas [79]. De forma análoga, os macrófagos podem ser regulados através do controle da resposta inflamatória, inibição das quinases, principalmente da JAK (Janus quinase ativada) e MAP quinase, através da sinalização via TLR e inibição de STAT-1 [79].

Em relação ao intestino, ocorre uma rede de interação entre macrófagos, microbiota entérica e neurônios entéricos que garantem a homeostase do trânsito gastrointestinal e a proteção

dos neurônios mioentéricos [80]. Os macrófagos secretam BMP2 que liga o receptor de BMP2 nos neurônios entéricos. Por sua vez, os neurônios entéricos secretam CSF-1, necessário para o recrutamento e proliferação de macrófagos na camada muscular do intestino. Por fim, a microbiota aparece como fator chave, regulando a expressão de BMP2 por macrófagos e de CSF1 pelos neurônios entéricos. Além disso, a ausência de microbiota determina a perda nesse processo de regulação e culmina em atraso no trânsito intestinal e perda neuronal [80].

## **2. JUSTIFICATIVA**

Tem sido descrita a ocorrência de cerca de 200 casos de infecção oral por *T. cruzi* no Brasil e cerca de 400 nos outros países da América do Sul [30]. De um modo geral, o prognóstico dos pacientes infectados é ruim e o caso tende a evoluir para o óbito em torno de 40 dias após o início do aparecimento dos sintomas [30]. Fatores que podem influenciar a evolução do quadro clínico são a resposta imune do indivíduo e a carga parasitária ingerida [81].

A penetração de um patógeno, em especial intestinal, no organismo, pode desencadear um processo de disbiose, ocorrendo um desequilíbrio na microbiota intestinal e a indução de processos inflamatórios [66]. Assim, a microbiota que auxilia na manutenção de um ambiente tolerogênico, estimulando a secreção de diversas citocinas, como IL-10, IL-33, IL-25 e TGF- $\beta$  que atuam sobre macrófagos e células dendríticas promovendo uma regulação, deixam de exercer sua função. Desse modo, observa-se o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 e Th17 e a ação de células intraepiteliais  $\gamma\delta$ , que estimulam o recrutamento de neutrófilos e o estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório [66].

Então, a perda da homeostase resulta na indução de um perfil pró-inflamatório dos macrófagos, culminando em um aumento no dano neuronal do plexo mioentérico e prejuízo na peristalse intestinal [80]. Por outro lado, a presença da microbiota pode estimular a expressão de BMP2 em macrófagos, molécula que ativa essas células para que desempenhem papel de proteção sobre os neurônios do plexo mioentérico [80].

Desse modo, buscamos avaliar a importância da microbiota durante a infecção oral por *T. cruzi*, enfatizando a relação entre microbiota, macrófagos intestinais e neurônios mioentéricos. Para compreender como a resposta imune pode ser modulada em função da ausência de microbiota e como se dá a interação entre macrófagos e neurônios do ponto de vista de proteção e manutenção dos aspectos funcionais do intestino, como motilidade intestinal e densidade neuronal.

Assim, nossa hipótese foi que a microbiota auxilia na regulação da resposta inflamatória exacerbada e na proteção dos neurônios do plexo mioentérico durante a infecção intragástrica por *T. cruzi*

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da microbiota durante a infecção oral por *T. cruzi* e a relação entre macrófagos e microbiota na proteção dos neurônios mioentéricos.

### 3.2. Objetivos específicos

- Quantificar a parasitemia e a mortalidade de camundongos convencionais e isentos de germes durante a infecção oral por *T. cruzi*.
- Avaliar a existência de lesão celular hepática em camundongos convencionais e isentos de germes durante a infecção.
- Quantificar as citocinas no homogenato hepático, esplênico, intestinal e nos linfonodos mesentéricos em animais convencionais e isentos de germes durante a infecção.
- Imunofenotipar as células mononucleares no intestino, fígado e baço de animais convencionais e isentos de germes durante a infecção.
- Avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos *in vitro* de camundongos convencionais e isentos de germes durante a infecção.
- Quantificar a inflamação intestinal e alterações funcionais do intestino em animais convencionais e isentos de germes após a infecção.

#### **4. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **4.1. Cultivo de parasitos**

Camundongos Swiss foram infectados com inóculo de  $10^4$  tripomastigotas sanguíneos via intra-peritoneal. Após 9 dias de infecção os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado pelo plexo venoso oftálmico de forma estéril. O sangue foi adicionado a meio LIT (infusão de fígado e tripton) suplementado com hemina (Sigma Aldrich) na concentração de 4 mg/mL e o pH ajustado para 7,28. Acrescentaram-se em seguida 10% v/v de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e 1% de penicilina/estreptomicina. O meio foi filtrado em membrana 60 S (Merck Milipore, Tullagreen, Irlanda) e armazenado a 4° C.

Os parasitos mantidos em 40 mL de LIT em frascos de cultura de tecido de 75cm<sup>2</sup> se diferenciaram em epimastigotas no período de 15 dias. Após esse período os parasitos aderiam à garrafa e iniciava-se o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos. Após outros 15 dias de cultura os parasitos foram coletados e centrifugados a 1800 g por 10 minutos a 4° C. Em seguida foram lavados 2 vezes em PBS (salina tamponada com fosfato de sódio 1 M, pH 7,4) ressuspendidos em 2 mL de PBS e quantificados em câmara de Neubauer para ajuste do inóculo utilizado na infecção.

#### **4.2. Animais, infecção e eutanásia**

Camundongos Swiss/NIH com 6 a 8 semanas foram mantidos em biotério convencional, sem restrição de água e comida, tendo ciclos controlados de claro-escuro com intervalos de 12 horas. Camundongos Swiss/NIH isentos de germes com 6 a 8 semanas foram mantidos em isoladores plásticos flexíveis (Class Biologically Clean, Madison, WI, EUA) e mantidos no

Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais sem restrição de água e comida autoclavadas e com ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os animais foram infectados com o inóculo de  $10^7$  tripomastigotas metacíclicos por via intragástrica, sendo administrados 300  $\mu$ l a cada animal com o auxílio de agulha de gavagem em aço inox possuindo cânula de 1 mm de diâmetro, esfera de 1,7 mm e comprimento de 35 mm.

Após 22 dias de infecção, os animais Swiss convencionais e isentos de germes foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos foram coletados para as devidas análises.

Este estudo foi conduzido em estrita conformidade com as diretrizes brasileiras sobre o trabalho animal e o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde. O comitê de ética animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA / UFMG - 26/2016) aprovou todos os procedimentos experimentais.

### **4.3. Parasitemia e sobrevida**

A determinação da parasitemia foi realizada diariamente após a data da infecção, com a finalidade de se estabelecer a curva parasitológica. O procedimento do exame parasitológico foi realizado conforme estabelecido abaixo:

- a) Assepsia da cauda de cada animal com gaze embebida em álcool etílico a 70%;
- b) Corte a 5mm da extremidade distal da cauda e coleta da segunda gota de sangue (5 $\mu$ l) sobre lâmina de vidro para microscopia e cauterização da ferida. A gota de sangue sobre a lâmina foi coberta com lamínula de 22x22mm;

c) O exame ao microscópio de luz comum foi feito com objetiva de 40x e analisados 50 campos {Brenner, 1962 81 /id}.

A sobrevivência dos camundongos foi avaliada diariamente e dados de letalidade foram computados para a formulação da curva de sobrevivência.

#### **4.4. Enzimas hepáticas**

O sangue dos animais foi coletado e centrifugado a 1800 g por 10 minutos a temperatura ambiente para a obtenção do soro. Em seguida as dosagens de aminotransferase da alanina (ALT) e aminotransferase do ácido aspártico (AST) foram realizadas segundo as normas preconizadas pelo fabricante (Biotécnica, Varginha, MG, Brasil). A avaliação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de luz e as concentrações foram calculadas a partir de regressão linear feita tendo como referência os padrões utilizados.

A validação das análises bioquímicas foi realizada com dois controles de qualidade, sendo um normal e outro patológico (Biotécnica, Varginha, MG, Brasil). Para isso projetamos, segundo as instruções do fabricante, três valores de dosagens de cada controle para a construção de um gráfico de Levey-Jennings. Assim, criamos um par de limites com o cálculo de média  $\pm 2$  desvios-padrão para cada controle utilizado. Previamente às realizações de todas as análises eram feitas dosagens dos controles normal e patológico. Essas dosagens eram então, projetadas no gráfico de Levey-Jennings e avaliadas segundo as regras múltiplas de Westgard.

#### 4.5. Quantificação de citocinas

Os tecidos do intestino, baço, fígado e linfonodo mesentérico foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos, na presença de inibidor de proteases e, após centrifugação a 300 g por 10 minutos a 4 C, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de citocinas. Todos os tecidos foram homogeneizados e os sobrenadantes coletados no mesmo dia, garantindo a reprodutibilidade dos resultados. A quantificação por ELISA foi realizada utilizando kits para detecção de citocinas BD (Franklin Lakes, NJ, EUA) para as citocinas IL-12p70, TNF e IL-10 e eBioscience (Waltham, MA, EUA) para a citocina IL-17, de acordo com as especificações do fabricante.

Placas de polipropileno de alta afinidade, com 96 poços de fundo chato (NUNC – Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais contra cada uma das citocinas (IL-12p70, TNF, IL-10 e IL-17), por uma noite a 4° C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween a 0,05% (PBS/Tween) e bloqueadas com soro fetal bovino 2 % em PBS por 1 hora em temperatura ambiente. As amostras dos sobrenadantes foram distribuídas em diluições 1:2 em PBS com soro fetal bovino 2%. A curva padrão foi padronizada de acordo com as especificações do fabricante para cada citocina. As amostras foram incubadas por uma noite a 4° C, lavadas novamente com PBS/Tween foi adicionado anticorpo secundário anti-citocina conjugado com biotina por 2 horas a 37° C. As placas foram novamente lavadas com PBS/Tween e incubadas com peroxidase (2 horas a 37° C). Finalmente, após nova lavagem com PBS/Tween, as placas foram incubadas com tetrametilbenzidina (Sigma Aldrich) protegidas da luz, até a parada das reações com solução de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas em leitor de microplacas com o filtro de 450 nm. A concentração das citocinas foi determinada por análise de regressão comparando a absorbância obtida nas amostras com aquelas da curva padrão realizadas em cada

placa para a citocina em questão. Os resultados foram expressos em pg/g de tecido. Os limites de detecção para cada citocina foram: IL12-p70 de 0,05, TNF de 0,063, IL-10 de 0,056 e de IL-17 de 0,042 pg/g.

#### **4.6. Quantificação de lipocalina 2 no conteúdo fecal**

Para a quantificação de lipocalina 2 (Lcn-2) uma amostra de fezes fresca foi coletada a cada três dias de todos os grupos experimentais. As amostras foram devidamente pesadas e armazenadas em tubos cônicos de 1,5 ml, sendo congeladas a -20° C a seco em seguida.

Para a quantificação, todas amostras foram descongeladas simultaneamente e homogeneizadas em solução contendo 0,05% de Tween 20 em PBS. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 300 g por dez minutos a 4° C. Então, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a quantificação de Lcn-2 de acordo com o protocolo do fabricante R&D systems (Minneapolis, MN, EUA).

#### **4.7. Quantificação de neurônios na camada muscular do cólon**

Inicialmente, após a eutanásia, a porção do cólon dos camundongos foi coletada e as fezes foram removidas com o auxílio de dois swabs embebidos em RPMI contendo 2% de soro fetal. Em seguida, o cólon foi cortado ao longo de seu eixo longitudinal e planificado com a face muscular voltada para cima em superfície plana. Então, com o auxílio de 2 pinças foi separada a camada muscular da lâmina própria. A camada muscular foi fixada utilizando solução de formol 10% por 2 horas e posteriormente armazenado em PBS.

Posteriormente, os tecidos fixados foram corados com corante específico para neurônios denominado azul cuprolínico de acordo com as especificações do fabricante (Polysciences,

Warrington, PA, EUA). Então lâminas de microscopia foram montadas contendo o tecido corado.

Para a quantificação neuronal, foram capturadas dez imagens de cada órgãos utilizando objetiva de 20X. Então as imagens foram analisadas com o auxílio do programa ImageJ, sendo quantificados todos neurônios nas imagens e avaliada a área total, sendo o resultado expresso em número de neurônios por área.

#### **4.8. Citometria de fluxo**

Após a eutanásia dos animais, o baço foi coletado, macerado em PBS contendo 1% de soro fetal bovino e centrifugado a 50 g por 5 minutos a 4 C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 300 x g por 10 minutos a 4 C. Em seguida, fizemos a lise dos eritrócitos utilizando solução de lise ACK. A lise foi realizada por 2 minutos, sendo adicionado PBS contendo 1% de soro fetal para parar a reação. Então, as células foram quantificadas na câmara de Neubauer,

Para o fígado, o órgão foi perfundido via cava inferior para a retirada das hemácias presentes no tecido. Posteriormente o órgão foi macerado e realizada centrifugação diferencial utilizando Percoll 37 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O material foi centrifugado a 800 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. O pellet foi coletado, lavado 2 vezes em PBS contendo 1% de soro fetal. Então, as células foram quantificadas na câmara de Neubauer.

Para a citometria as células foram marcadas por 30 minutos com F4/80 (eBioscience.), CD11b, CD11c e MHCII (BD), em seguida o material foi lavado 3 vezes em PBS 1% de soro fetal e utilizado para aquisição de macrófagos (F4/80 e CD11b) e células dendríticas (CD11c e MHCII). As aquisições foram realizadas em citometro de fluxo FACs Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

#### **4.9. *Salmonella* e infecção**

A cultura de *Salmonella enterica* Var., Thyphimurium (SL1344) foi realizada em meio de infusão de fígado e cérebro por uma noite. Então, uma amostra de 100 µl foi repassada pra um novo meio e cultivada por três horas e trinta minutos. Em seguida, os animais foram infectados por via oral com o auxílio de uma agulha de gavagem com uma concentração de 10<sup>9</sup> bactérias, concentração definida pela subcultura realizada.

Para o estabelecimento da curva de infecção as fezes frescas foram coletadas diariamente e homogeneizadas. Posteriormente foi realizada uma diluição seriada para que as amostras fossem plaqueadas em meio ágar MRS.

#### **4.10. *Toxoplasma gondii* e infecção**

Para a infecção por *Toxoplasma gondii* animais foram mantidos infectados com um inóculo de 10 cistos por via intraperitoneal. Após 30 a 40 dias, os animais são eutanasiados e o encéfalo coletado. Então, o encéfalo foi macerado por aspiração com o auxílio de seringa e agulhas 18G e 22G em 1 mL de PBS.

Para a infecção, os parasitos são quantificados em 10 µl de macerado colocado em lâmina coberta com lamínula 22x22 mm. a quantificação foi realizada em microscópio óptico utilizando objetiva de 10x. Após quantificação os animais foram infectados por via oral com um inóculo de 5 cistos.

#### **4.11. Trânsito gastrointestinal**

Para a definição do tempo total de trânsito gastrointestinal, foi preparada uma solução de 6% p/v de carmine (Sigma Aldrich) em 1% p/v de metil-celulose. Então foram administrados a

cada camundongo 300  $\mu$ l da solução, sendo que esses animais foram monitorados constantemente em gaiolas isoladas até o início da liberação das fezes marcadas com o corante. Assim, é definido o tempo total de trânsito gastrointestinal como o primeiro momento onde se observa a eliminação de fezes.

#### **4.12. Avaliação miográfica**

Após os camundongos serem eutanasiados, uma porção de 3 mm da região distal do íleo foi coletada e introduzida em um sistema transdutor de sinal banhado em solução fisiológica nutritiva de tampão de Krebs. Os fragmentos foram mantidos por 3 intervalos de 15 minutos para estabilização do órgão e então a cada 10 minutos o tecido foi alvo de uma aplicação de tensão de 0,5 g. Os dados foram registrados em um transdutor de sinal e analisado a força de contração em um intervalo de 200 minutos.

#### **4.13. Ensaio de infecção *in vitro***

Os macrófagos utilizados neste estudo foram derivados do lavado da medula óssea de camundongos, como previamente descrito [83]. As células foram centrifugadas a 300 g, por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina-estreptomicina e 2mM de glutamina. Após serem contadas em câmara de Neubauer,  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  células foram plaqueadas em cada poço das placas de 24 e 96 poços respectivamente e incubadas a 37° C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Posteriormente, tripomastigotas de *T. cruzi* purificadas foram adicionadas na proporção 5:1 (parasito/macrófago), e as culturas incubadas por mais 2 horas. Após esse período de infecção, as placas foram lavadas três vezes com PBS para remoção dos parasitos extracelulares e fixadas ou incubadas novamente

em meio DMEM por 48 e 72 horas. As lamínulas foram coradas utilizando-se o sistema de coloração hematológica Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). O número de amastigotas e macrófagos infectados foi determinado pela contagem de pelo menos 300 células por amostra. Os resultados foram expressos como índice de infecção (% de células infectadas x N<sup>o</sup> de amastigotas/N<sup>o</sup> total de células). As placas de 96 poços foram usadas para contagem de parasitos liberados no sobrenadante dos macrófagos infectados entre 3 e 7 dias após a infecção.

#### **4.14. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada por meio do programa Prisma da GraphPad (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea, utilizaram--se testes paramétricos através do teste *t* Student não pareado e o e do teste ANOVA com comparação múltipla de Tukey. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana, utilizaram-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis com comparação múltipla de Dunn. Os resultados foram expressos em mediana e valores mínimos e máximos. Para as correlações, utilizou-se a Correlação de Spearman. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$  (5%). As diferenças observadas foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$  (5%).

## **5. RESULTADOS**

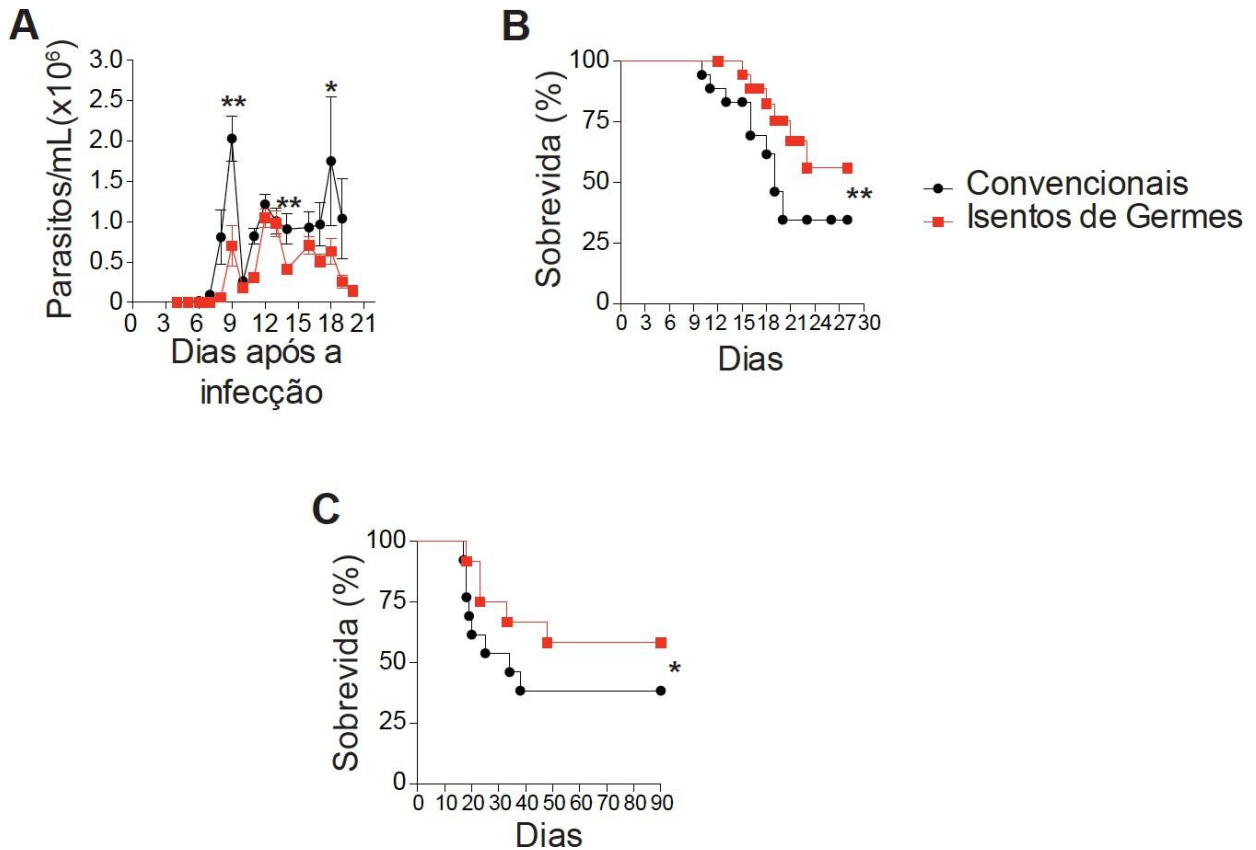
### **5.1. A microbiota determina a multiplicação parasitária e a sobrevida de camundongos infectados intragastricamente por *T. cruzi*.**

A infecção oral por *T. cruzi* apresenta alta gravidade e promove surtos agudos de infecção [84] e a microbiota parece ter papel importante no curso da infecção, já que pode modular a resposta imune inata e adaptativa como demonstrado em camundongos isentos de germes [85-87].

Nesse sentido, avaliamos o curso de infecção de animais convencionais (CV) e isentos de germes (GF) infectados por via intragástrica com a cepa “Y” de *T. cruzi* e a taxa de sobrevida desses animais durante a infecção. Assim, demonstramos que durante a infecção, os animais CV apresentaram maior parasitemia com picos de parasitismo 9 e 18 dias pós infecção, sendo maiores que aqueles apresentados pelos animais GF (Figura 3A).

Observamos que a infecção intragástrica apresenta um curso de infecção diferente daquele exibido quando os animais são infectados por via intraperitoneal. Na infecção intraperitoneal com cepa “Y” observa-se período pré-patente de 3 dias e um pico de infecção único em torno do sétimo dia pós-infecção [88,89]. Como no nosso modelo de infecção a rota do parasito é diferente e o mesmo tende a ficar alojado no estômago por cerca de 5 dias [90], notamos um aumento nesse período pré-patente para o sétimo dia nos animais CV e oitavo nos animais GF.

Ao avaliar a taxa de sobrevida, observamos que tanto na fase aguda de infecção, quanto na fase crônica, os animais CV apresentam estatisticamente maior mortalidade que os animais GF (Figuras 3B e C).



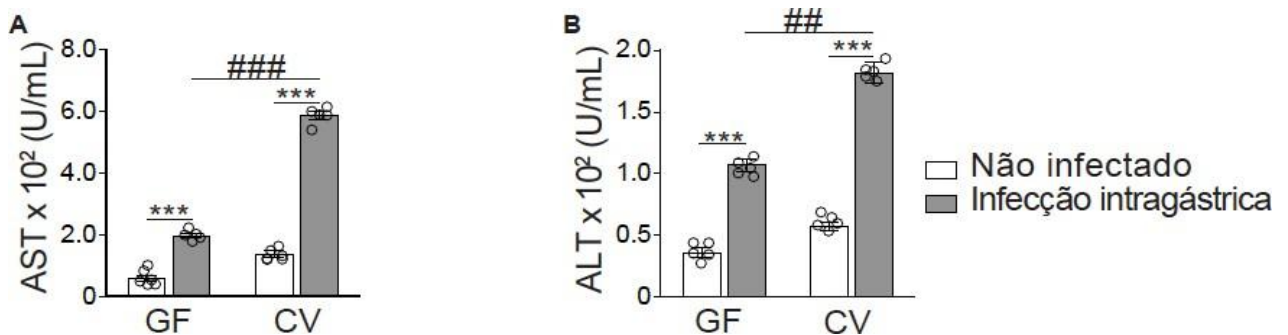
**Figura 3.** Curva de parasitemia e sobrevida de camundongos infectados por via intragástrica com *Trypanosoma cruzi*. (A) Curva de parasitemia de animais convencionais e isentos de germes. (B) Curva de sobrevida de animais convencionais e isentos de germes durante a fase aguda. (C) Curva de sobrevida de animais convencionais e isentos de germes na fase crônica. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste estatístico de Mann-Whitney para a parasitemia e de Mantel-Cox para as sobrevidas. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=5$  animais por grupo.

## 5.2. Camundongos convencionais apresentam aumento na lesão celular hepática.

Como durante a infecção intragástrica tem sido sugerido que a única porta de entrada do parasito é o epitélio gástrico [91], o protozoário pode atingir o sistema porta e ser drenado para o fígado [92]. Assim, avaliamos o dano hepático que a infecção poderia acarretar nesse órgão através da quantificação de aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) no soro dos camundongos.

Observamos que os soros dos animais CV e GF infectados apresentaram maiores

concentrações das enzimas hepáticas comparados com os controles não infectados. Além disso, demonstramos que ambas enzimas possuíam níveis séricos maiores nos animais CV infectados. Não visualizamos diferenças nas concentrações das enzimas marcadoras de dano hepático entre os grupos controles não infectados CV e GF (Figuras 4A e B). Desse modo, pode-se afirmar que os animais CV apresentam maior lesão hepática ocasionada pela infecção oral por *T. cruzi*.



**Figura 4.** Quantificação das enzimas hepáticas de camundongos infectados por via intragástrica com *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção (21 dias). (A) Transaminase do aspartato (AST). (B) Transaminase da alanina (ALT) \*\*\* $p < 0,0001$ ; ## $p < 0,001$ ; ### $p < 0,0001$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas, sendo GF animais isentos de germes e CV animais convencionais. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=5$  animais por grupo.

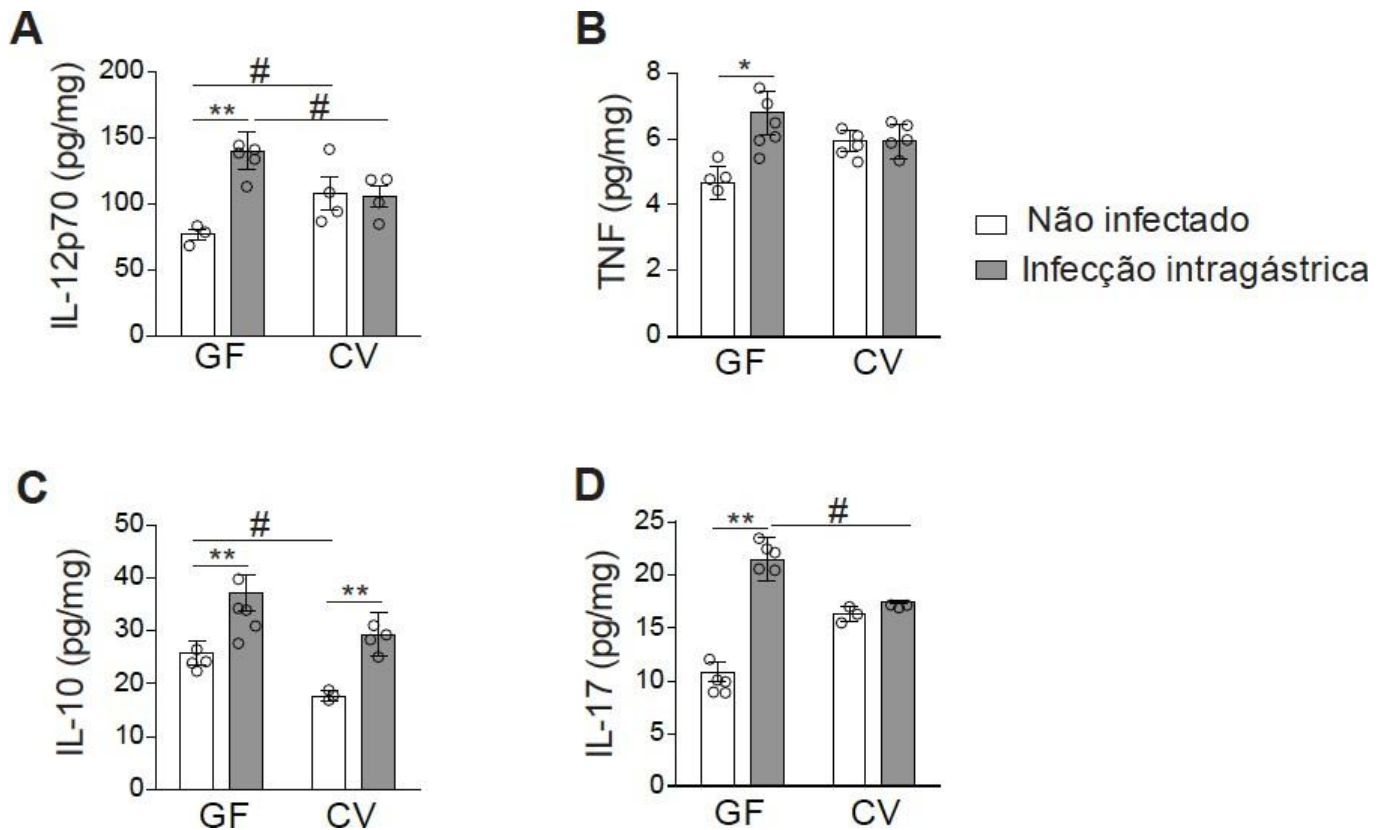
### 5.3. A ausência de microbiota influencia na resposta inflamatória desenvolvida durante a infecção.

Nosso próximo passo foi avaliar os níveis de citocinas nos homogenatos teciduais. Para isso, foram quantificadas as citocinas IL-12, TNF, IL-17 e IL-10 no sobrenadante do homogeneizado do intestino (cólon), baço, linfonodo mesentérico e fígado.

Animais GF infectados com *Lysteria monocytogenis* apresentam aumento na concentração de TNF e IL-10 no sobrenadante de homogeneizado intestinal [93]. Dados semelhantes também são observados quando se analisam essas citocinas em sobrenadante de células esplênicas de camundongos infectados por *T. cruzi* e posteriormente mono-associados com *Escherichia coli*,

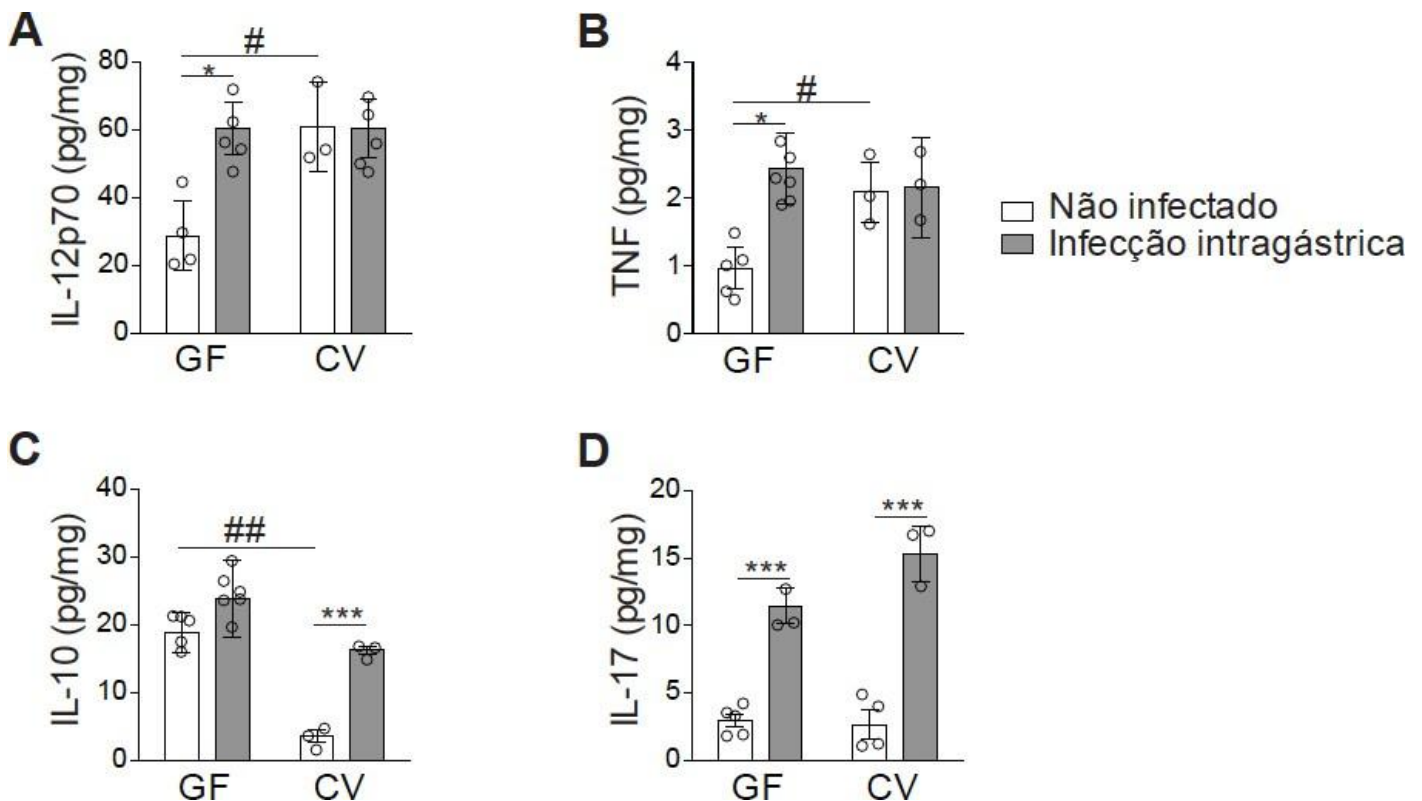
*Enterococcus faecalis*, *Bacteroides vulgatus*, e *Peptostreptococcus sp* [78].

Desse modo, ao quantificarmos as citocinas no extrato intestinal, observamos que os animais GF infectados apresentavam aumento nas concentrações de IL-12p70, IL-10, TNF e IL-17 quando comparados com os animais GF não infectados. Além disso, os níveis de IL-12p70 e IL-17 eram também maiores nos camundongos GF infectados que nos camundongos CV infectados. Já nos animais CV infectados, as citocinas inflamatórias não apresentaram aumento devido à infecção. Foi visualizado aumento apenas na concentração de IL-10. Então, nenhuma das citocinas pró-inflamatórias apresentavam diferença entre os camundongos CV infectados e não infectados (Figuras 5A-D).

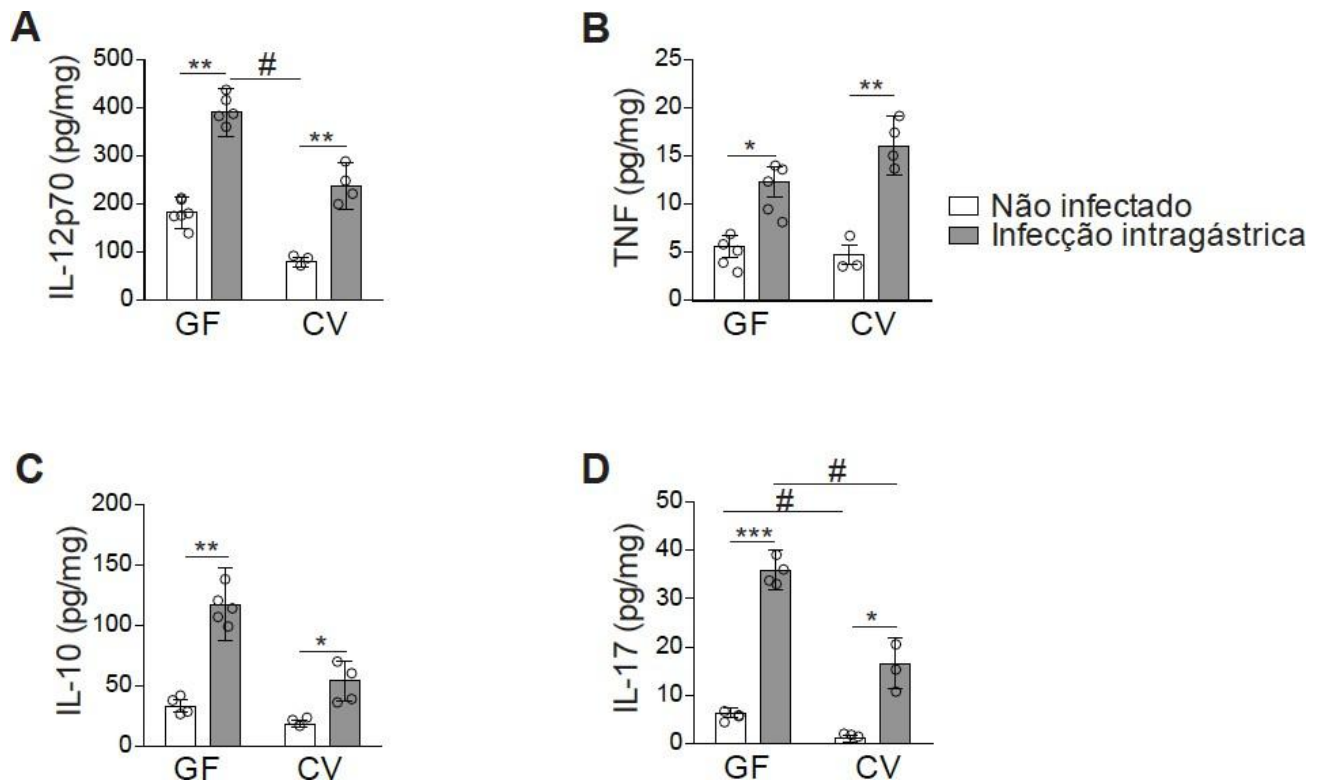


**Figura 5.** Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato do cólon de camundongos infectados por via intragástrica com *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção (21 dias). (A) Concentração de IL-12p70 em animais convencionais e isentos de germes. (B) Concentração de IL-10 em animais convencionais e isentos de germes. (C) Concentração de IL-12p70 em animais convencionais e isentos de germes. (D) Concentração de IL-17 em animais convencionais e isentos de germes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,05$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas, sendo GF animais isentos de germes e CV animais convencionais. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=4$  ou 5 animais por grupo.

Em seguida, avaliamos as concentrações das citocinas no sobrenadante de homogeneizado do baço. Observamos que os animais GF infectados apresentaram aumento nos níveis das citocinas inflamatórias quando comparados com os GF não infectados. Já em relação aos CV, demonstramos que dentre as citocinas pró-inflamatórias, apenas IL-17 estava aumentada. Ainda, a citocina reguladora IL-10 apresentava-se maior nos CV infectados quando comparada com os CV controles não infectados (Figuras 6A-D).

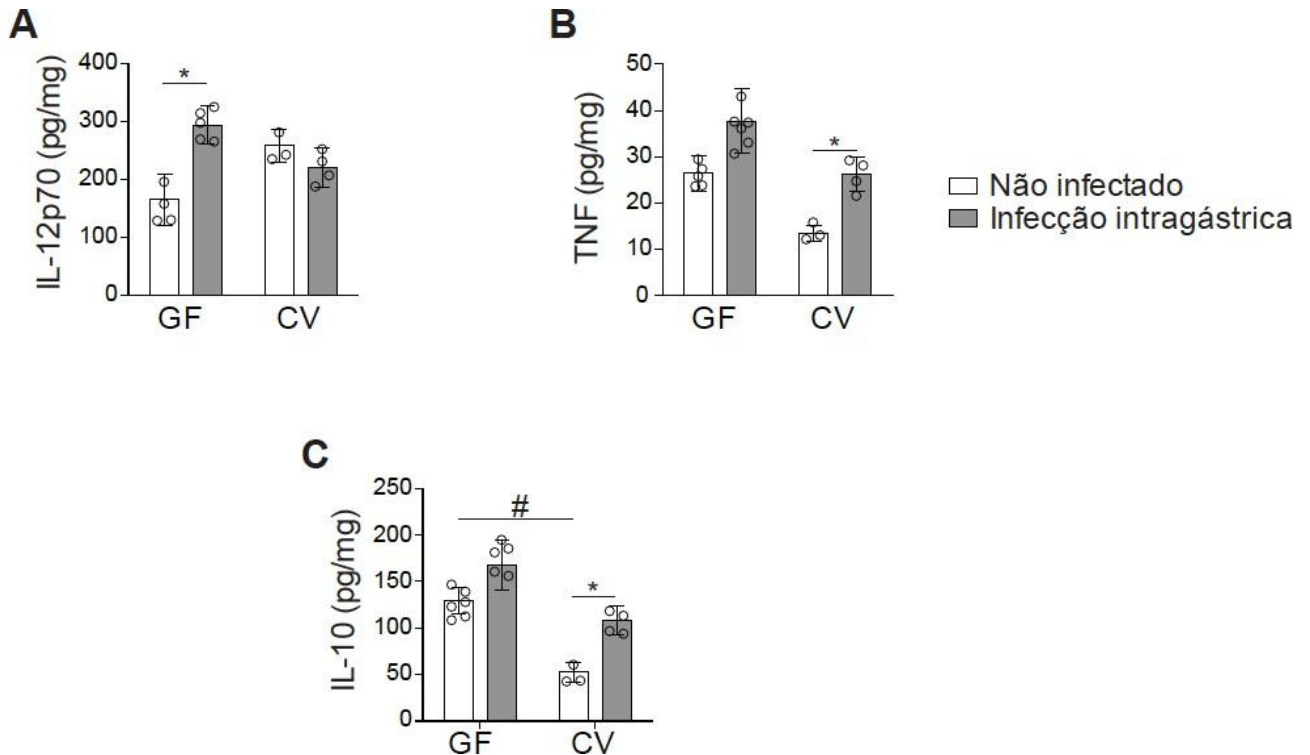


Quantificamos as citocinas no linfonodo mesentérico, por se tratar de um órgão linfoide com íntima associação com o intestino. Os linfonodos dos camundongos GF infectados apresentaram perfis semelhantes aos níveis de citocinas descritos anteriormente, sendo maiores nos infectados quando comparados com os controles. Além disso, assim como apresentado no intestino, os níveis de IL-12p70 e IL-17 eram maiores nos animais infectados GF quando comparados com os infectados CV. Já em relação aos animais CV, ao contrário do demonstrado no intestino, o grupo infectado apresentou aumento nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias e também da IL-10 quando comparado com os animais não infectados (Figuras 7A-D).



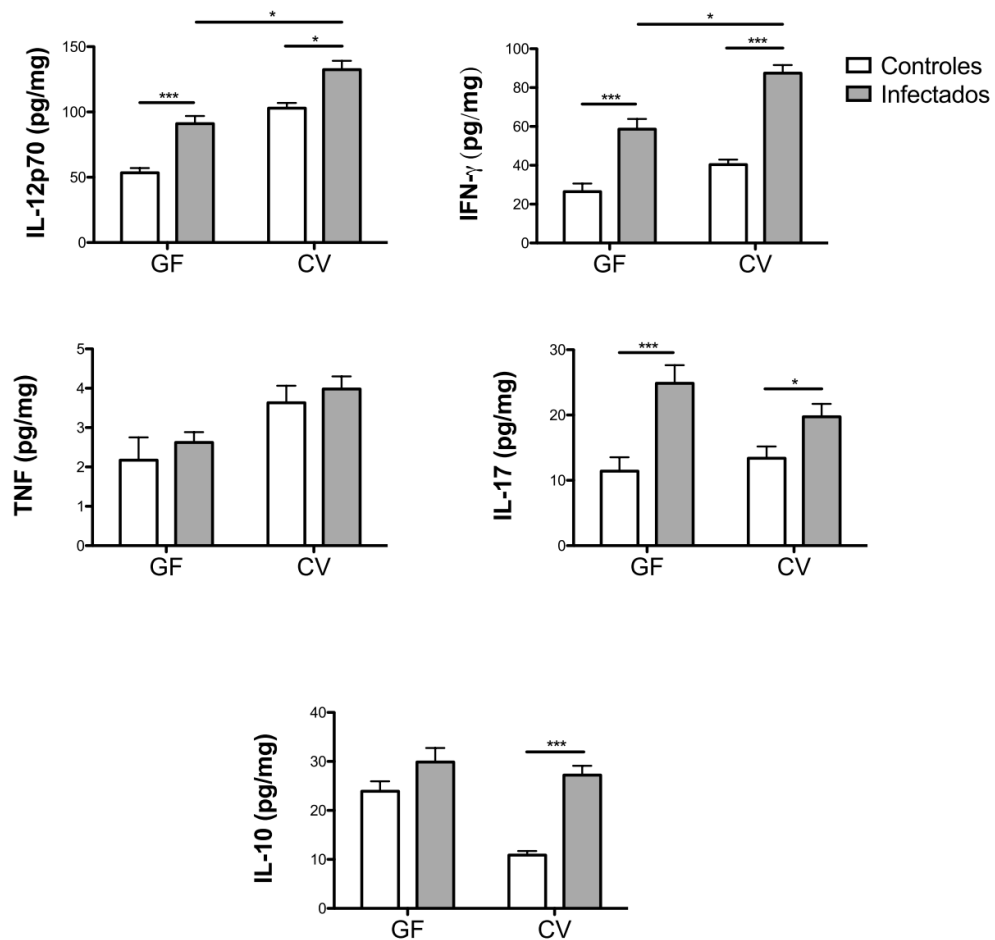
**Figura 7.** Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato do linfonodo mesentérico de camundongos convencionais e isentos de germes infectados por via intragástrica com *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção (21 dias). (A) IL-12p70. (B) TNF (C) IL-10 (D) IL-17. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,05$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas. Sendo (GF) animais isentos de germes e (CV) animais convencionais. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=4$  ou  $5$  animais por grupo.

Como demonstramos a ocorrência de lesão hepática, decidimos avaliar a concentração de citocinas no sobrenadante de homogeneizado do fígado. Nesse sentido, observamos que os animais GF infectados possuem aumento apenas nos níveis de IL-12p70 em relação aos seus controles. Já os animais CV infectados tiveram aumento nos níveis de TNF e IL-10 em comparação com os animais CV não infectados. Tal dado sugere que a maior lesão hepática estabelecida nos animais CV pode estar relacionada a uma deficiência no controle da carga parasitária nesse órgão (Figuras 8A-C). Assim a lesão celular poderia ser proveniente de uma multiplicação parasitária descontrolada já que, como demonstrado por Barreto, 2015 observa-se a presença de ninhos de amastigota no tecido hepático.



**Figura 8.** Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato de fígado de camundongos infectados por via intragástrica com *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção (21 dias). (A) Concentração de IL-12p70 em animais convencionais e isentos de germes. (B) Concentração de em animais convencionais e isentos de germes. (C) Concentração de IL-10 em animais convencionais e isentos de germes. \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas. Sendo (GF) animais isentos de germes e (CV) animais convencionais. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=4$  ou 5 animais por grupo.

Uma vez que a infecção crônica causada por *T. cruzi*, promove sintomatologia clínica em humanos com o desenvolvimento de formas cardíaca, digestiva e mista, decidimos avaliar o perfil inflamatório intestinal após 90 dias de infecção. Observamos que, diferentemente do encontrado no sobrenadante de intestino durante a fase aguda, os animais convencionais infectados passaram a apresentar maior concentração de citocinas inflamatórias quando comparados com os animais isentos de germes infectados (Figuras 9A-B). Ressalta-se que ambos grupos infectados continuaram apresentando mais citocinas inflamatórias (IL-12p70, IFN- $\gamma$  e IL-17) que os animais não infectados (Figuras 9A, B e D). Além disso, apenas os animais CV infectados apresentaram aumento de IL-10 (Figura 9E).



**Figura 9.** Quantificação de citocinas no sobrenadante de homogenato do intestino (côlon) de camundongos infectados por via intragástrica com *Trypanosoma cruzi* durante a fase crônica da infecção (90 dias). (A) Concentração de IL-12p70 em animais convencionais e isentos de germes. (B) Concentração de IFN- $\gamma$  em animais convencionais e isentos de germes. (C) Concentração de TNF em animais convencionais e isentos de germes. (D) Concentração de IL-17 em animais convencionais e isentos de germes. (E) Concentração de IL-10 em animais convencionais e isentos de germes.

\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas. Sendo (GF) animais isentos de germes e (CV) animais convencionais. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=4$  ou 5 animais por grupo.

#### 5.4. *Trypanosoma cruzi* e outros patógenos intestinais comprometem funcionalmente o intestino.

O *Trypanosoma cruzi* bem como outros patógenos, como *Salmonella* e *Toxoplasma gondii*, acarretam inflamação intestinal, colite, dano e perda neuronal e processo de desnervação do plexo miontérico [94-97]. Então avaliamos aspectos funcionais intestinais durante infecções com esses patógenos, dentre eles: marcadores do processo inflamatório, perda neuronal, motilidade

gastrointestinal e contratilidade intestinal.

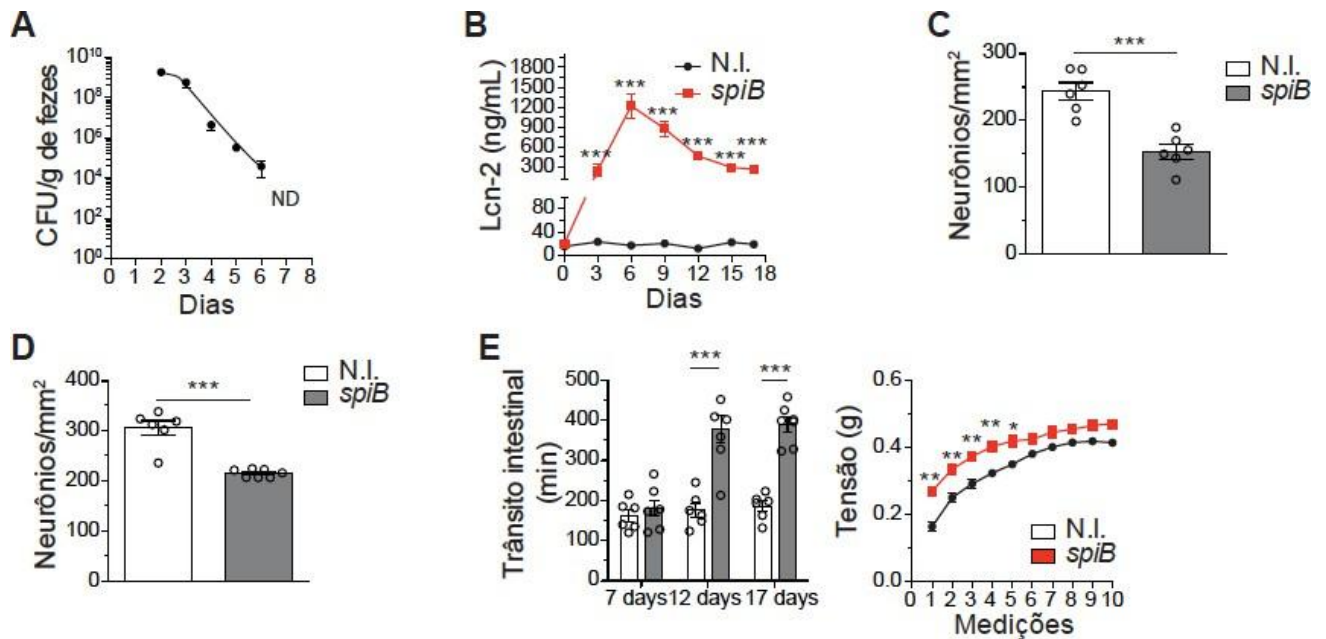
Infectamos animais C57BL/6 com o mutante spiB de *Salmonella enterica* var. Typhimurium. que invade as células da mucosa intestinal mas não tem a capacidade de se multiplicar [98]. Com isso, é gerado um processo inflamatório sem que a infecção seja letal para o camundongo. Inicialmente, infectamos os animais por via oral com um inóculo de  $10^9$  bactérias e quantificamos as unidades formadoras de colônias nas fezes diariamente até ser observado o desaparecimento das bactérias das fezes, que foi evidenciado a partir do 7º dia pós infecção (Figura 10A).

Em seguida avaliamos o perfil inflamatório intestinal com a quantificação dos níveis de lipocalina-2 fecal (Lcn-2). Nossos dados indicam que a infecção por *Salmonella* promove um processo inflamatório com pico no 6º dia pós infecção, em seguida declinando e atingindo um platô no 15º dia pós infecção (Figura 10B).

Posteriormente avaliamos a perda neuronal analisada no intestino delgado, mais precisamente no íleo. Para isso, a camada muscular foi separada da lâmina própria e a quantificação neuronal foi realizada no plexo mioentérico. A quantificação foi realizada em dois períodos distintos: no 5º dia pós infecção, período do pico de inflamação e no 18º dia, quando se observava que a inflamação persistia, mas se encontrava em um platô. Após análise, observamos que a infecção promoveu perda neuronal, sendo essa restrita ao 5º dia pós infecção. No 18º dia já se observava discreta recuperação neuronal que não se traduziu em melhoria nos aspectos funcionais do intestino. Os animais infectados apresentavam comprometimento do trânsito total gastrointestinal, avaliado com o auxílio de um marcador administrado por via oral aos animais, em todos os pontos da infecção analisados (Figuras 10C-E esquerda).

Então, avaliamos a capacidade contrátil e de acomodação do intestino. Para isso, coletamos

um fragmento do íleo e avaliamos em um transdutor de sinal a contração do órgão. O fragmento foi imerso em solução nutritiva e a cada 10 minutos foi exposto a uma tensão de 0,5 gramas e os dados de miografia foram coletados. Nosso dado demonstrou que os órgãos dos animais infectados apresentavam menor capacidade de acomodação e relaxamento, resultado do processo inflamatório existente no tecido. Com o passar do tempo e a aplicação dos estímulos de tensão, o músculo tende a se tornar menos responsivo, dificultando o processo de acomodação que seria natural, então observamos um platô na curva de tensão do órgão, tanto no infectado quanto no controle não infectado (Figura 10E direita).



**Figura 10.** Alterações intestinais decorrentes da infecção aguda com *Salmonella Typhimurium* mutante *spiB* (*spiB*).

(A) Número e bactérias nas fezes, sendo ND definido como não determinado. (B) Quantificação da lipocalina fecal (Lcn-2) por ELISA em camundongos C57BL/6 infectados por *spiB*. (C) Quantificação neuronal no plexo mioentérico de camundongos não infectados (N.I) e infectados por *spiB* corado, com azul cuprolínico 7 dias pós infecção. (D) Quantificação neuronal no plexo mioentérico de camundongos não infectados (N.I) e infectados por *spiB* corado, com azul cuprolínico 17 dias pós infecção. (E) Atividade peristáltica gastrointestinal realizada por tempo total de trânsito gastrointestinal. (E) Miografia de um anel da região do íleo de camundongos infectados por *spiB*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ;

\*\*\* $p < 0,0001$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=6$  animais por grupo.

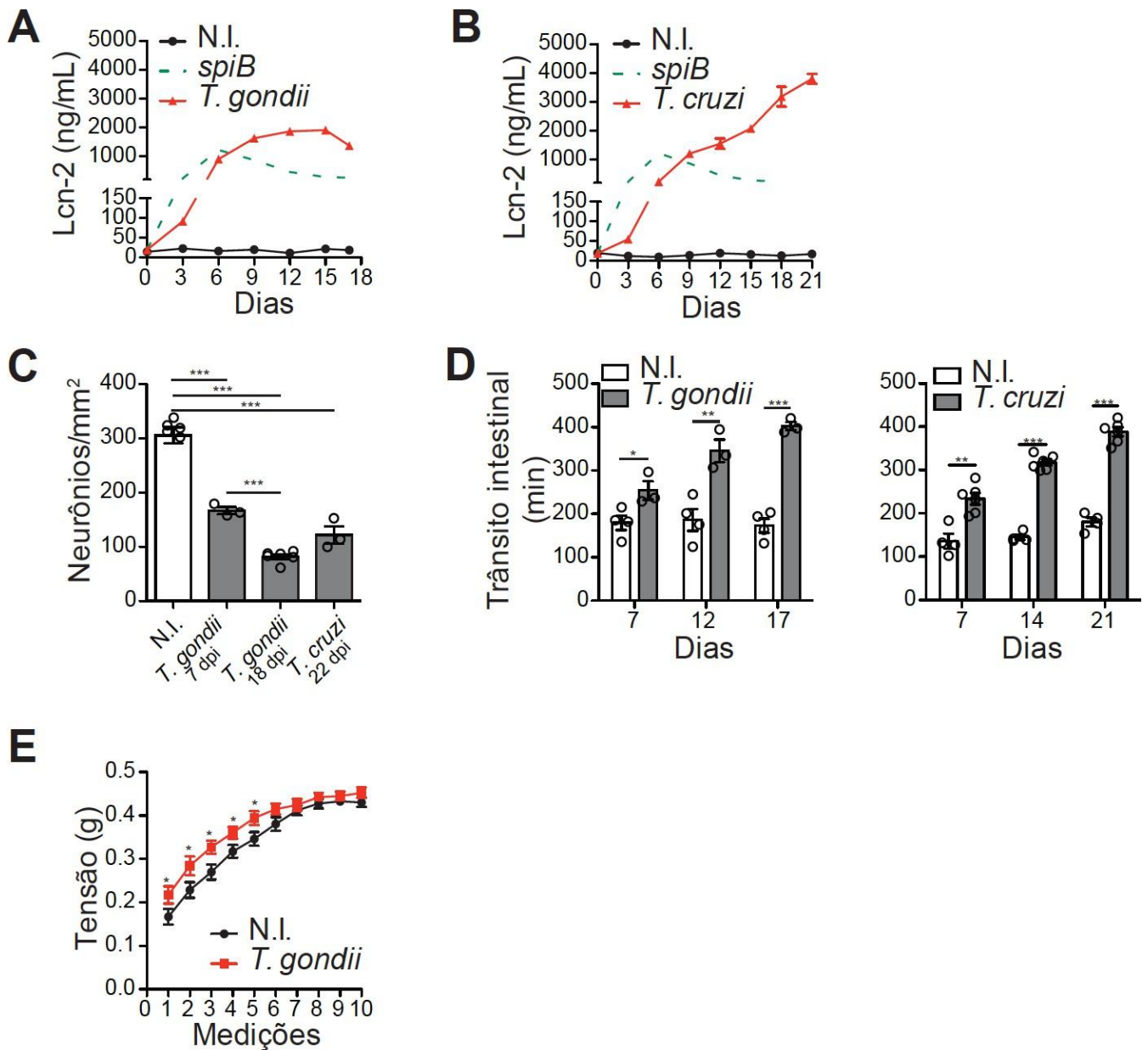
**5.5. *T. cruzi* e *T. gondii* comprometem funcionalmente o intestino de forma permanente.**

A infecção por *Salmonella* mostra uma tendência de que, com o passar do tempo, ocorre redução no processo inflamatório e recuperação neuronal. Tal fato não pode ser observado em infecções com *T. gondii* e *T. cruzi*.

Primeiramente, avaliamos a inflamação intestinal a partir da quantificação dos níveis fecais de Lcn-2. Observamos que a infecção por *T. gondii* promove inflamação intestinal com o pico de concentração no 15º dia pós infecção, havendo depleção nos níveis após esse dia, mas ainda sendo maiores que aqueles observados com *Salmonella*. Já a infecção por *T. cruzi* gera níveis crescentes de inflamação nos tempos observados (Figuras 11A e B).

Ao analisarmos a perda neuronal ocorrida no plexo mioentérico do intestino grosso, observamos que na infecção com *T. gondii*, ocorre uma perda neuronal progressiva, sendo avaliados os dias 7 e 18 pós infecção. Já na infecção por *T. cruzi*, avaliada no dia 22 pós infecção, observamos perda neuronal que se assemelha àquela apresentada pela infecção com *T. gondii*, não havendo diferença quando analisamos a infecção por *T. cruzi* com ambos os tempos de infecções por *T. gondii* (Figura 11C). Em seguida, demonstramos que tanto na infecção por *T. gondii* quanto na infecção por *T. cruzi*, ocorre atraso no tempo total de trânsito gastrointestinal em todos os períodos analisados, sendo que na infecção por *T. gondii* foram avaliados os dias 7, 12 e 17 pós infecção e na infecção por *T. cruzi* foram analisados os dias 7, 14 e 21 pós infecção (Figura 11D).

Por fim, mostramos a capacidade contrátil e de acomodação de um fragmento do cólon de camundongos infectados por *T. gondii*. Assim como observado na infecção por *Salmonella*, ocorre uma redução na capacidade de acomodação do órgão, resultado do processo inflamatório instaurado no tecido.



**Figura 11.** Alterações intestinais decorrentes da infecção aguda com *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*. (A) Quantificação da lipocalina fecal (Lcn-2) por ELISA em camundongos C57BL/6 infectados por *Toxoplasma gondii*.

(B) Quantificação da Lcn-2 em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*. (C) Quantificação neuronal do plexo mioentérico corado com azul cuprolínico. (D) Atividade peristáltica gastrointestinal realizada por tempo total de trânsito gastrointestinal. (E) Miografia de um anel da região do íleo de camundongos infectados com *T. gondii*.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste t de Student não pareado. Sendo, N.I.= animais não infectados e spiB= animais infectados com *Salmonella Typhimurium* mutante spiB. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=3$  a 5 animais por grupo.

**5.6 Animais GF apresentam maior inflamação intestinal, mas**

**proporcionalmente, mesmo atraso no trânsito intestinal e perda neuronal após infecção intragástrica com *T. cruzi* quando comparados com camundongos CV**

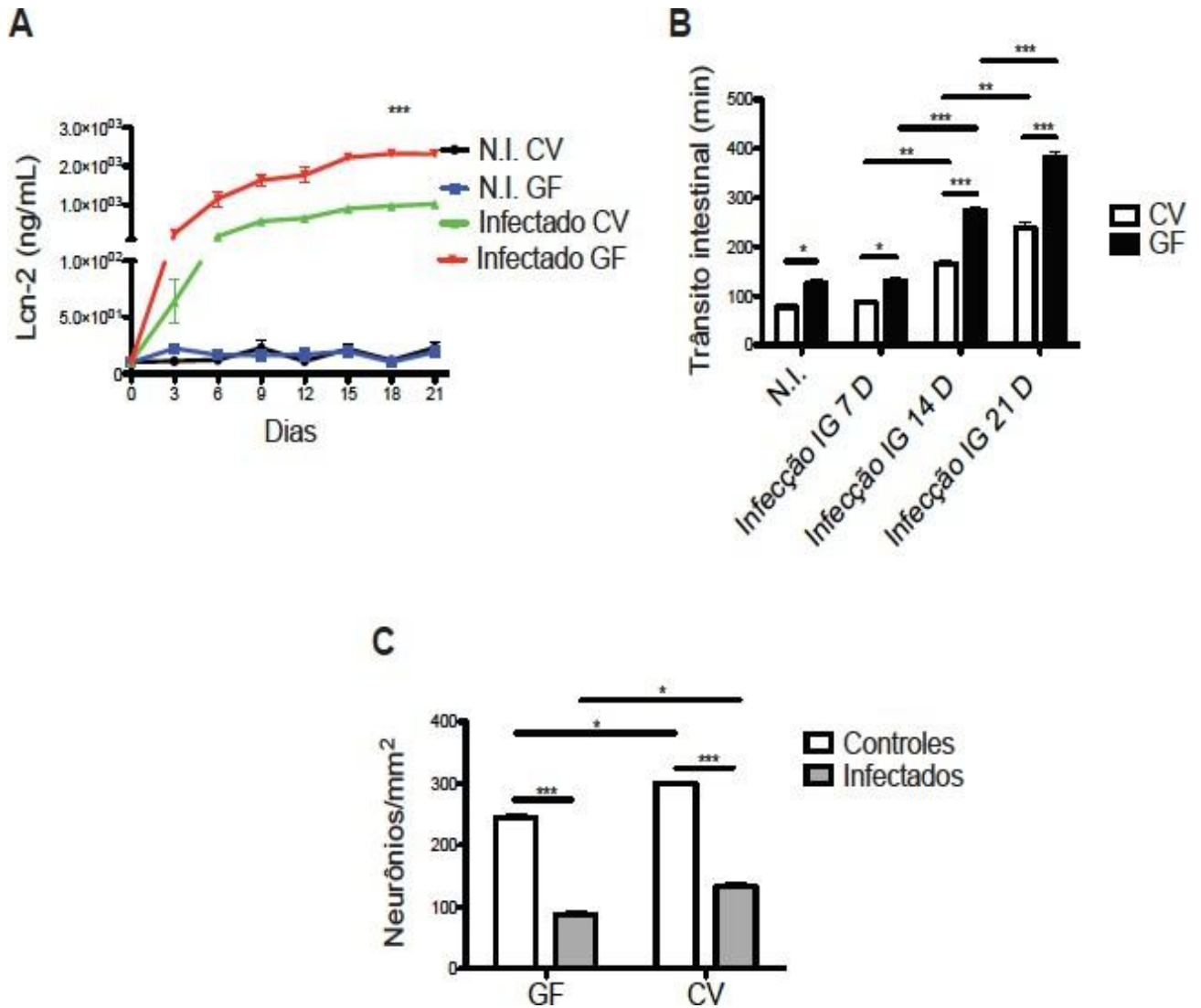
Visto que existe diferença na resposta imune quando comparamos animais CV infectados com animais GF infectados, decidimos avaliar parâmetros funcionais do intestino grosso dos camundongos após a infecção oral durante a fase aguda.

Desse modo, inicialmente, quantificamos os níveis da proteína lipocalina-2 no conteúdo fecal. Essa molécula é liberada por neutrófilos, portanto indica o processo de recrutamento dessas células para o intestino. Então, observamos que os animais não infectados tanto CV quanto GF não apresentam este marcador do processo inflamatório. Já ao analisarmos os animais infectados, observamos a ocorrência do marcador do processo inflamatório em ambos grupos, sendo que em todos os tempos analisados os animais GF apresentaram maior concentração de lipocalina-2 (Figura 12A).

Em seguida, avaliamos o parâmetro funcional de motilidade intestinal. Observamos que os animais GF apresentam atraso no trânsito intestinal quando comparados com os CV, tanto quando não infectados quanto infectados após 7, 14 e 21 dias pós-infecção. Observa-se que a infecção por

*T. cruzi* promove atraso na motilidade intestinal em ambos os grupos infectados, sendo esse atraso progressivo no decorrer dos pontos analisados, ou seja, 7, 14 e 21 dias pós-infecção (Figuras 12B).

Já em relação à densidade neuronal, observamos que os camundongos GF apresentam naturalmente menor densidade neuronal no plexo mioentérico quando comparados com os camundongos CV. Após a infecção de 21 dias com *T. cruzi*, ocorre a redução neuronal em ambos grupos, CV e GF, sendo a porcentagem de redução igual entre os grupos infectados.



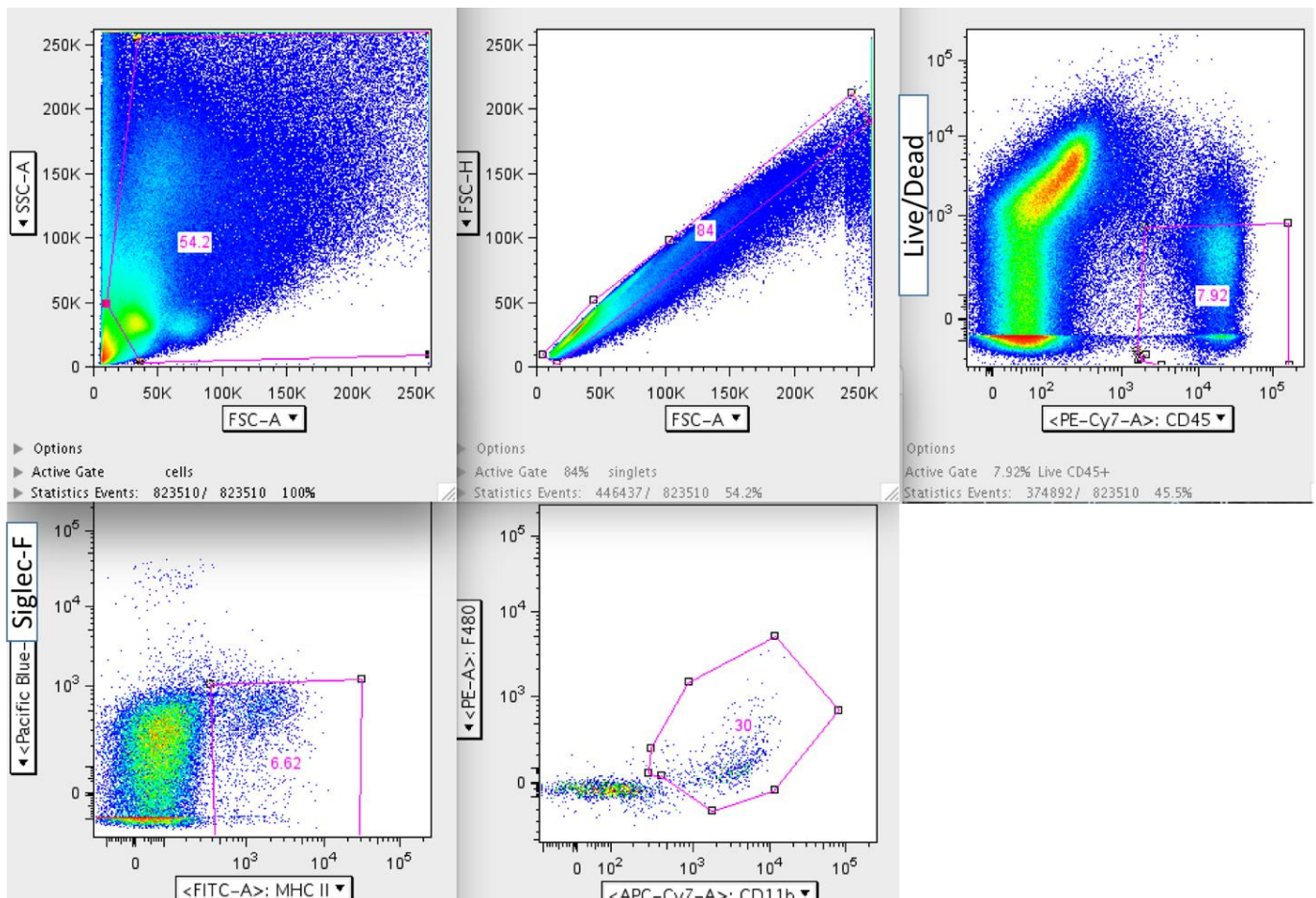
**Figura 12.** Avaliação dos aspectos funcionais do intestino de camundongos CV e GF após infecção intragástrica (IG). (A) Quantificação de lipocalina-2 a cada três dias nas fezes dos camundongos. (B) Avaliação do trânsito gastrointestinal em animais não infectados e em infectados após 7, 14 e 21 dias. (C) Quantificação neuronal realizada no plexo mioentérico localizado na camada muscular do intestino grosso dos camundongos CV e GF após 21 dias de infecção. (A) \*\*\* $p < 0,0001$  entre infectado CV e GF nos dias 6 ao 21 após a infecção. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas. Sendo (GF) animais isentos de germes e (CV) animais convencionais. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=4$  ou 5 animais por grupo.

### 5.7 A infecção intragástrica promove aumento no recrutamento de macrófagos para a camada muscular e lâmina própria do intestino em animais CV e GF.

Visto que a infecção promove perda de função no intestino, avaliamos a frequência de

macrófagos tanto na camada muscular, quanto na lâmina própria do intestino grosso.

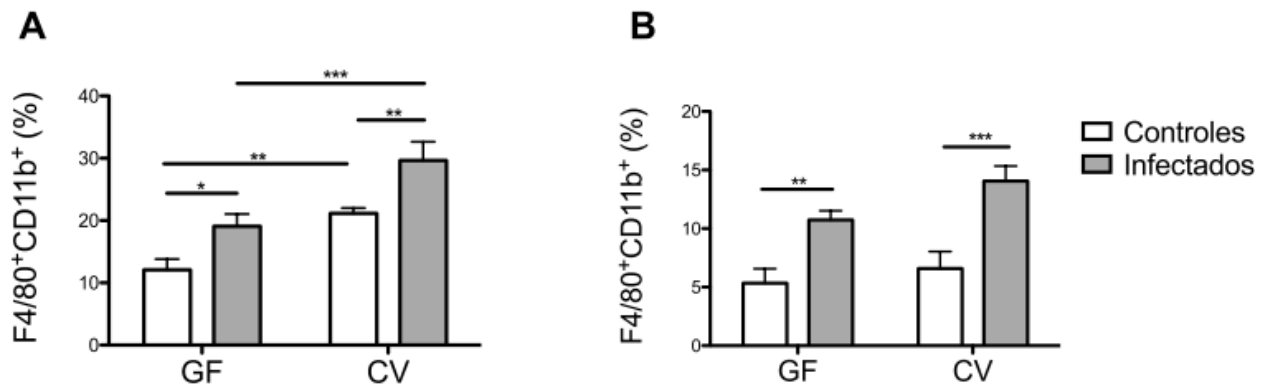
Como estratégia de *gating* para ambas regiões, inicialmente selecionamos os *singlets*. Em seguida selecionamos a população de células vivas, retiramos aquelas células siglecF<sup>+</sup> (neutrófilos) e posteriormente selecionamos a população duplo positiva F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (Figura 13).



**Figura 13.** Estratégia de gate utilizada para a identificação e quantificação de macrófagos contidos na lâmina própria e camada muscular do intestino grosso.

Observamos que na lâmina própria, os animais CV apresentam maior frequência de macrófagos que os GF e que a infecção promove o aumento na porcentagem de células. Na camada muscular, CV e GF não apresentam diferença na frequência de macrófagos dos animais não

infectados. Após 21 dias de infecção, o número de macrófagos aumentou tanto na lâmina própria quanto na camada muscular, nos grupos CV e GF (Figuras 14A-B). Quando comparamos os animais infectados CV e GF entre si, o padrão é o mesmo que nos animais não infectados: há mais macrófagos na lâmina própria de camundongos CV, mas não há diferença no número de macrófagos na camada muscular entre camundongos CV e GF infectados.



**Figura 14.** Frequência de macrófagos na camada muscular e lâmina própria do intestino grosso em camundongos CV e GF após 21 dias de infecção. (A) Frequência de macrófagos na lâmina própria. (B) Frequência de macrófagos na muscular. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas. Sendo (GF) animais isentos de germes e (C) animais convencionais. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n=3$  animais por grupo.

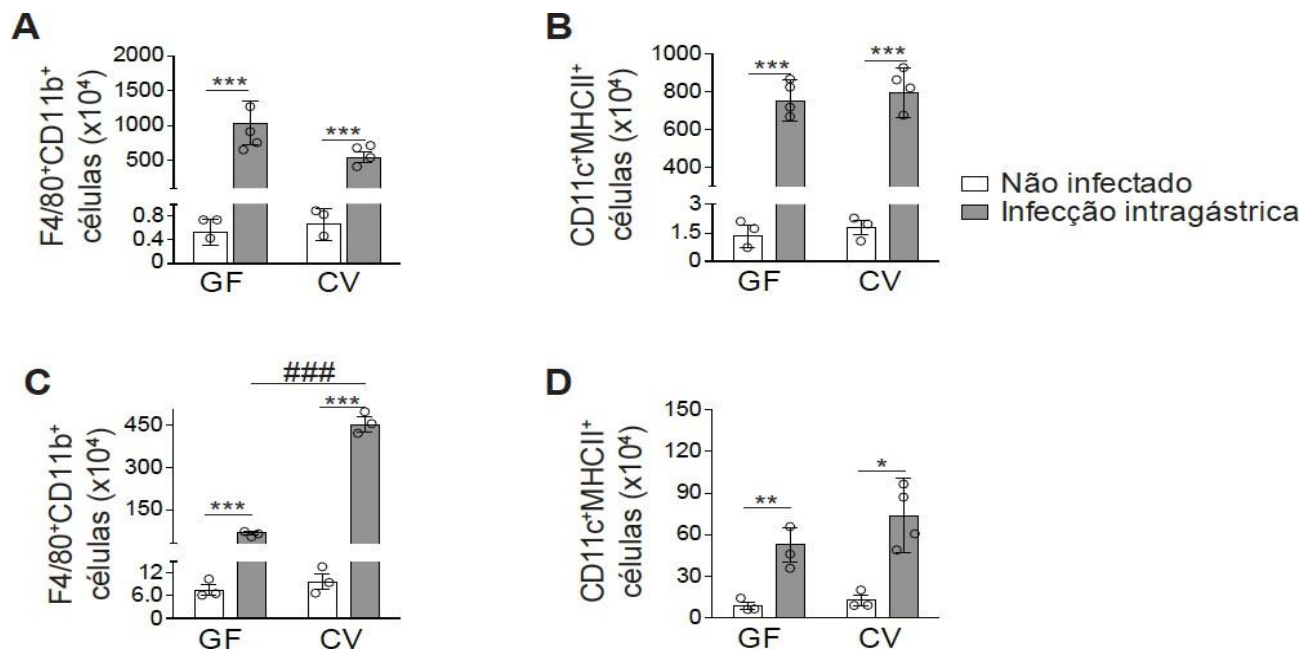
### 5.8. A infecção por *T. cruzi* promove aumento no número de fagócitos

#### mononucleares em animais convencionais e isentos de germes.

Já que as células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas estão envolvidas na primeira linha de defesa contra parasitos protozoários, via reconhecimento de receptores padrão (PRRs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) [99], avaliamos o número de macrófagos e células dendríticas presentes no baço e fígado durante a infecção.

Definimos como macrófagos aquelas células F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> e como células dendríticas as células CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>. Nossos resultados demonstraram que no baço os animais infectados, tanto

GF quanto CV, apresentaram maior número de macrófagos e células dendríticas que seus respectivos controles. No entanto, não existe diferença entre os grupos infectados (Figuras 15A e B). No fígado, também houve aumentos das células dendríticas e macrófagos devidos à infecção (Figuras 15C e D). Os camundongos GF infectados apresentaram menor número de macrófagos quando comparados com os animais CV infectados. Quanto às células dendríticas, observamos o mesmo perfil daquele encontrado no baço, não havendo diferença entre os grupos infectados GF e CV infectados (Figuras 15C e D).



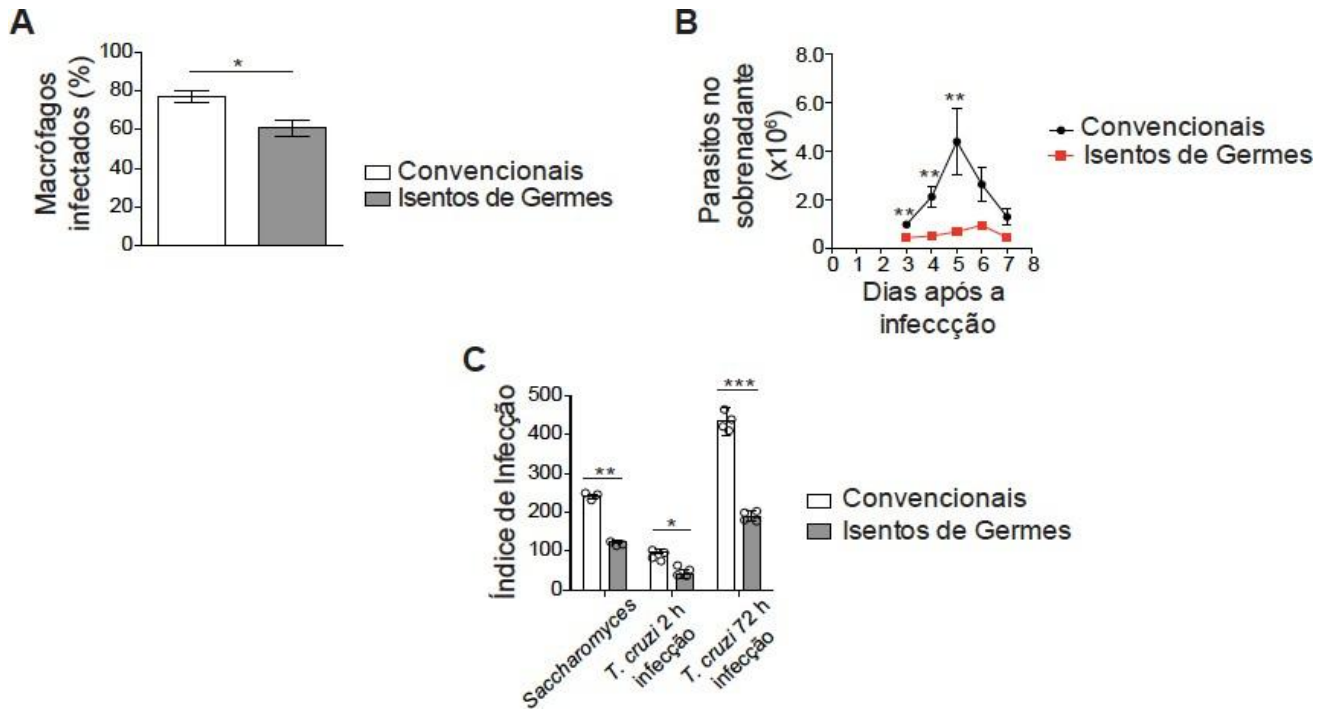
**Figura 15.** Imunofenotipagem de dois tipos celulares da linhagem celular monocítica no fígado e no baço de camundongos infectados por via oral com *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção. (A) Número absoluto de macrófagos no baço de animais convencionais e isentos de germes. (B) Número absoluto de células dendríticas no baço de animais convencionais e isentos de germes. (C) Número absoluto de macrófagos no fígado de animais convencionais e isentos de germes. (D) Número absoluto de células dendríticas no fígado de animais convencionais e isentos de germes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas. Sendo (GF) animais isentos de germes e (CV) animais convencionais. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes com  $n = 3$  ou  $4$  animais por grupo.

### **5.9. Macrófagos de camundongos isentos de germes possuem menor taxa de fagocitose.**

Como os macrófagos são importantes células alvo do parasito para multiplicação e, além disso, são responsáveis pela resposta oxidativa para combater o patógeno, avaliamos a capacidade fagocítica dos macrófagos de animais GF e CV. Para isso, derivamos macrófagos medulares e infectamos com tripomastigotas.

Nossos resultados demonstraram que a porcentagem de macrófagos infectados nos animais GF foi maior que nos camundongos CV acarretando em maior número de parasitos quantificados no sobrenadante. A partir do dia 3 pós infecção foi possível identificar os parasitos no sobrenadante de ambos grupos, sendo o pico de parasitos no 5º dia no grupo CV e 6º dia no GF. Nos 3º, 4º e 5º dias o número de parasitos foi maior no sobrenadante de macrófagos dos camundongos CV (Figuras 16A e B).

Em seguida, avaliamos o índice de infecção dos macrófagos de ambos grupos. Para isso, avaliamos após 2 e 72 horas de infecção. Realizamos em paralelo o ensaio utilizando levedura, para eliminar o viés da penetração ativa do parasito no macrófago. Nossos resultados demonstraram que em todos os ensaios, incluindo o controle com levedura, o índice de infecção dos macrófagos é menor nos animais GF (Figura 16C), o que pode explicar a maior parasitemia e mortalidade nos animais CV.



**Figura 16.** Avaliação do parasitismo de macrófagos derivados de medula infectados in vitro pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. (A) Porcentagem de macrófagos de animais convencionais e isentos de germes infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após 72 horas de infecção. (B) Quantificação dos parasitos no sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos convencionais e isentos de germes (C) Índice de infecção de macrófagos de animais convencionais e isentos de germes infectados por *Saccharomyces cerevisiae boulardii* por 2 horas ou por *T. cruzi* por 2 e 72 horas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste *t* de Student para amostras não pareadas. Os gráficos são representativos de três experimentos independentes.

## **6. DISCUSSÃO**

Nos últimos anos, o número de surtos de infecção oral por *Trypanosoma cruzi* no Brasil e outros países latino-americanos está aumentando. Atualmente, a via mais comum da infecção por *T. cruzi* na Amazônia brasileira é a via oral e, de 2000 a 2013, esta via de infecção foi responsável por 70% dos casos agudos no Brasil [100,101]. Esses surtos estavam associados à ingestão de alimentos e bebidas contaminados [102,103]. Os pacientes infectados oralmente são geralmente altamente sintomáticos, apresentando febre duradoura, dor de cabeça, edema facial e bipalpebral, edema de membros inferiores, mialgia, dor abdominal, meningoencefalite e envolvimento cardíaco clássico [34,101,104-106]. A análise de surtos distintos demonstrou que a taxa de mortalidade dos pacientes afetados nas duas primeiras semanas de infecção é estimada em 8-35%, consideravelmente maior que a taxa de mortalidade da transmissão vetorial clássica (5-10%). A taxa de mortalidade mais alta pode ser associada à prevalência elevada de patologia cardíaca e à ausência de um diagnóstico anterior [34,107].

Apesar de ser uma importante via de infecção, existem poucos estudos sobre a transmissão oral de *T. cruzi* na literatura. Os primeiros dados, obtidos em cães, utilizando estudos de histopatologia, apresentaram sinais de uma possível penetração de *T. cruzi* na mucosa oral, esofágica, gástrica e intestinal com reação local com eosinofilia, linfócitos infiltrados e monócitos após infecção oral em cães [81]. Em contraste, foi demonstrado que camundongos BALB/c infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* por via oral apresentam invasão da mucosa gástrica e disseminação sistêmica. Além disso, foi demonstrado, por análise histológica, que a infecção por

*T. cruzi* é observada no epitélio da mucosa gástrica. No entanto, parasitas não foram detectados em outras áreas ao longo do trato gastrointestinal, como o esôfago e a orofaringe. Ainda foi demonstrado que o *T. cruzi* apresenta disseminação sistêmica como consequência de uma infecção oral por invasão da mucosa gástrica [91].

Nossos dados demonstram que a infecção intragástrica promove infecção nos animais convencionais e isentos de germes, sendo que os animais convencionais apresentam maior parasitemia e menor sobrevivência tanto na fase aguda, quanto na crônica. As glicoproteínas gp82 e gp30 expressas pela forma tripomastigota metacíclica do parasito estão envolvidas no processo de penetração do parasito no epitélio gástrico em cepas como CL, Tulahuen e Y de *T. cruzi* [108-112].

Macrófagos e células dendríticas formam um grupo heterogêneo de células mielóides encontradas na maioria dos tecidos, sendo responsáveis por manter a homeostase tecidual [113]. Além disso, quando ativados são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e por estimular o desenvolvimento de resposta imune adaptativa importantes para o controle da infecção pelo *T. cruzi* [99]. Durante a infecção, ocorre processo inflamatório intestinal com a ocorrência de dano neuronal [94] e esse processo inflamatório pode induzir a migração e acúmulo de macrófagos e células dendríticas no fígado [114], fato que pode explicar a ocorrência da lesão hepática nos grupos infectados. Ainda, camundongos BALB/c quando infectados por via oral ou intragástrica com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, apresentam grande infiltrado de células F4/80<sup>+</sup> após 21 dias de infecção [90], corroborando nossos dados.

O sítio primário de entrada do parasito, quando os animais são infectados na cavidade oral com a cepa Dm28c de *T. cruzi*, é a própria cavidade oral e orofaringe, sendo que o parasito pode ser encontrado na cavidade nasal e região da boca de 15 minutos após a infecção a 21 dias [115]. Outra região onde o parasito é intensamente observado é na região do escroto e testículos, podendo ser observado, só que em menores concentrações, também no intestino delgado, grosso, coração e fígado. Ainda, a quantificação da parasitemia mostrou um único pico no décimo primeiro dia de infecção [115]. Esses dados diferem do que aqui observamos na infecção intragástrica mostramos

dois picos de parasitemia, nos dias nove e dezoito para os camundongos CV e nove e doze para os camundongos GF.

Na infecção oral ou intragástrica, o parasito invade a mucosa e é drenado para o fígado pelo sistema porta [90]. Observamos no nosso trabalho que a infecção promove aumento nas concentrações das enzimas hepáticas AST e ALT tanto nos animais CV quanto nos GF, sendo que nos CV o aumento foi maior, podendo estar relacionado à maior carga parasitária nos animais CV. Corroborando nossos dados, em camundongos BALB/c infectados com  $5 \times 10^4$  parasitos da cepa Tulahuen de *T. cruzi* por via oral e intragástrica, observa-se que as duas formas de infecção promovem apoptose de células do fígado após 16 dias de infecção. No entanto, a infecção pela cavidade oral é mais grave quando analisados os cortes histológicos e dosadas as enzimas hepáticas. Naquele trabalho, a infecção intragástrica não promoveu alteração nos níveis séricos das enzimas hepáticas, já a infecção oral promoveu aumento de cerca de duas vezes entre infecção oral e intrástrica para ALT e de cerca de três vezes para AST [90]. Em contrapartida, no nosso trabalho observamos um aumento de duas vezes para ALT e AST entre GF infectado e controle, três vezes para ALT entre CV infectado e controle, quatro vezes para AST entre CV infectado e controle e, finalmente, três vezes entre CV infectado e GF infectado para AST e duas vezes entre CV infectado e GF infectado. Tal diferença pode ser explicada pela diferença no inóculo, na cepa e na linhagem de camundongo utilizados.

A resposta Th1 promove proteção contra a infecção por *T. cruzi* [116,117] e a resposta Th2 promove susceptibilidade [118]. A proteção durante a fase aguda é dependente de IFN- $\gamma$  e essa citocina possui importante papel na ativação de macrófagos para a produção de NO [119]. Além disso, TNF promove um segundo sinal para a produção de NO pelos macrófagos [120]. Por outro lado, as citocinas reguladoras IL-10 e TGF- $\beta$  estão relacionadas à susceptibilidade [42]. Tanto a

infecção oral quanto a intragástrica de camundongos BALB/c infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi* promovem um pico nas concentrações séricas e na expressão de mRNA de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 após dezessete dias de infecção. Infelizmente, perdemos nossos dados de IFN- $\gamma$ , o que nos impede de fazer comparações com os resultados obtidos por outros autores. No baço, Duarte *et al*, 2005 não encontraram produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos de camundongos Swiss GF infectados re-estimulados *in vitro* com antígeno. Os esplenócitos de camundongos CV, por outro lado, produziram IFN- $\gamma$  em resposta ao estímulo *ex vivo*. Também esplenócitos de camundongos mono-associados com *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* *Bacteroides vulgatus* ou *Peptostreptococcus sp.* e infectados com *T. cruzi* produziram IFN- $\gamma$  em resposta ao estímulo antigênico *ex vivo*. Nos nossos experimentos, utilizamos a mesma cepa de *T. cruzi* que Duarte e colaboradores, mas nossas infecções foram realizadas por via oral. Duarte e colaboradores encontraram mais TNF nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos CV e monoassociados infectados, estivessem estes esplenócitos em repouso ou fossem eles estimulados com antígeno *ex vivo*. Nós não realizamos este tipo de cultura, mas obtivemos mais TNF dos homogenatos de baços de camundongos GF infectados que de baços de camundongos GF não infectados. Estas comparações não são feitas por Duarte em seu sistema [78], mas o exame dos dados sugere que a infecção não teria aumentado a produção de TNF por esplenócitos *in vitro*. Outros autores já mostraram uma produção basal de IL-10 maior em camundongos sem germes, como foi visto aqui [78,121]. A IL-17 foi aumentada nos dois grupos de camundongos igualmente, após a infecção por *T. cruzi*, nos baços. Entretanto, no cólon e nos linfonodos mesentéricos, havia mais IL-17 nos camundongos GF infectados que nos CV infectados. A IL-17 está geralmente relacionada com a inflamação, em vez de regulação, mas na infecção por *T. cruzi* existe uma produção de IL-17 que controla a produção de IFN- $\gamma$  no homogenato de baço e

coração, bem como o desenvolvimento de lesões no coração durante o curso da infecção de camundongos BALB/c infectados com 100 parasitos da cepa Y de *T. cruzi* [122]. Assim como tem sido demonstrado em modelos murinos de doença inflamatória intestinal, onde camundongos IL-17<sup>-/-</sup> apresentam maior infiltrado inflamatório no cólon, maior perda de peso e maior expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  [123,124].

Alguns agentes patogênicos podem induzir processo de denervação do plexo mioentérico, como por exemplo *Salmonella*, que pode causar doença inflamatória intestinal, um quadro de inflamação intestinal crônica, disbiose e ausência de regulação da resposta imune inflamatória [125-127]. Além desse, o *T. gondii* também pode causar danos similares como observado por Gerloff e colaboradores 1993, que infectaram ratos com diferentes inóculos de *T. gondii* e demonstraram que a infecção promoveu a redução da densidade neuronal do plexo mioentérico. Nossos dados demonstram que a infecção por *T. cruzi*, similar ao que é observado nas infecções por *Salmonella* e *T. gondii*, promove aumento da secreção de lipocalina-2 pelos neutrófilos, sendo maior no grupo de animais GF. Foi demonstrado que a microbiota modula as interações entre macrófagos e neurônios entéricos [80,128]. No entanto, isso não ocorre em infecções intragástricas com *T. cruzi*, sendo que observamos que a infecção causa alteração da contratilidade e do peristaltismo tecidual nos camundongos GF e CV, observado a partir do aumento do tempo de trânsito intestinal, sendo esse aumento igual entre os grupos infectados. Em relação a perda neuronal, foi identificado que o *T. cruzi* promove dano neuronal, sendo a porcentagem de perda igual entre os grupos infectados. A infecção por *T. cruzi* promoveu aumento da inflamação intestinal, sendo maior nos camundongos GF. Tem sido descrito que a microbiota tem importante papel na regulação inflamatória, sendo que camundongos idosos (18 a 22 meses) apresentam alteração da microbiota, mais precisamente, uma diminuição da composição da microbiota, o que

resulta em aumento da permeabilidade e fluxo de produtos bacterianos que contribui para um descontrole da ação macrofágica e aumento da produção de TNF que culmina em um aumento da resposta inflamatória. Quando esses mesmos animais idosos são recolonizados com a microbiota de animais jovens, todos processos descritos anteriormente são revertidos [129].

Na fase crônica da infecção por *T. cruzi*, é comum observar processo de fibrose da camada muscular do intestino, processo de denervação do plexo e aumento da espessura da camada muscular [130,131]. Assim, quando camundongos Swiss foram infectados com  $5 \times 10^4$  formas tripomastigotas via intraperitoneal da cepa Y de *T. cruzi* e após onze dias de infecção tratados com benznidazole na concentração de 500 mg/kg e deixados cronificar por 15 meses, observou-se denervação do plexo mioentérico, fibrose e espessamento da camada muscular do cólon e presença de antígeno parasitário [94]. Estes dados condizem com os nossos: mesmo durante a fase aguda camundongos infectados com *T. cruzi* por via intragástrica demonstram perda neuronal no plexo mioentérico. Ainda coincidente com nossos dados, quando camundongos C57BL/6 WT, iNOS<sup>-/-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, foram infectados com 100 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, via intraperitoneal, observou-se perda neuronal no plexo mioentérico após cinco e dez dias de infecção, sendo a perda maior nos animais WT [132]. Durante a fase crônica não se observa a presença de parasitos nas camadas do intestino, no entanto é possível observar a presença de antígenos que podem continuamente estimular o sistema imune e manter a resposta inflamatória [133]. Nossos dados revelam resposta inflamatória do tipo Th1 e Th17 nos animais convencionais e isentos de germes após 90 dias de infecção intragástrica, que acreditamos poder ser resultante de antígenos parasitários localizados nas camadas do intestino, como tem sido descrito na literatura [133]. Para confirmar a hipótese futuros experimentos serão conduzidos.

A presença da microbiota parece controlar a patogenia causada pelo *T. cruzi* no início da

infecção, fazendo com que os camundongos CV apresentem parasitemia, mortalidade e lesão hepática menores que os camundongos GF. Como este controle é exercido? Uma vez que a resposta do tipo Th1 é importante para a resistência ao parasita, e esta resposta é fortemente modulada pela IL-10, postulamos que uma maior resposta do tipo 1 pode estar acontecendo nos camundongos convencionais, que produzem níveis semelhantes de IL-12 e TNF que os camundongos GF na fase aguda, mas menos IL-10. Ainda, a microbiota garante certa proteção do trato gastrointestinal, havendo menor atraso do trânsito gastrointestinal e menor inflamação nos camundongos CV. Assim, nossos próximos passos serão: avaliar a carga parasitária tecidual hepática e intestinal, e caracterizar o perfil de ativação dos macrófagos nos camundongos CV e GF.

## **7. CONCLUSÃO**

A presença da microbiota parece determinar o controle da resposta inflamatória no início da infecção, mais propriamente, durante a fase aguda. Esse controle parece possibilitar que haja maior multiplicação do parasito, podendo ser evidenciado pela maior parasitemia nos camundongos convencionais e, além disso, maior mortalidade nesses mesmos animais.

Ainda, a maior parasitemia pode indicar maior taxa de multiplicação do parasito no tecido hepático, evidenciando maiores concentrações séricas de transaminase da alanina (ALT) e transaminase do aspartato (AST), ou seja, maior dano hepático nos animais convencionais.

Já durante a fase crônica da infecção, apesar do ainda alto nível de IL-10 no cólon, os camundongos convencionais passam a apresentar um aumento no perfil inflamatório nesse mesmo órgão, podendo indicar uma possível tentativa de controle das cargas parasitárias teciduais presente nesses camundongos convencionais.

Em adição, modelos de infecção intestinal como *Salmonella enterica ser. Typhimurium* mutante spiB (spiB) e *Toxoplasma gondii*, juntamente com o *Trypanosoma cruzi*, comprometem funcionalmente e geram inflamação do trato gastrointestinal dos camundongos. No entanto, a presença de microbiota durante a infecção por *T. cruzi* atenua esses danos, havendo menor inflamação e menor perda neuronal quando a microbiota está presente. Isso pode estar relacionado com o maior número de macrófagos presentes na lâmina própria dos camundongos com microbiota e, ainda, com a característica reguladora que esses macrófagos podem apresentar.

Por fim, a infecção de macrófagos *in vitro* com *T. cruzi*, indicou que macrófagos de camundongos convencionais apresentam maior índice de infecção e multiplicação do parasito.

## **8. REFERÊNCIAS**

1. Chagas, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1:159-218, 1909.
2. Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. and et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 104:1051-1054, 2009.
3. Coura, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 110:277-282, 2015.
4. Lattes, R. and Lasala, M. B. Chagas disease in the immunosuppressed patient. **Clin Microbiol. Infect.** 20:300-309, 2014.
5. World Health Organization (WHO). Control of Chagas disease. **World Health Organization; (Technical Report Series).** 2007.
6. de Souza W., de Carvalho, T. M. and Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int. J Cell Biol.** 2010:2010.
7. Andrade, L. O. and Andrews, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat. Rev. Microbiol.** 3:819-823, 2005.
8. Filigheddu, M. T., Gorgolas, M. and Ramos, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. **Med. Clin. (Barc. ).** 148:125-131, 2017.
9. Margioto Teston, A. P., de Abreu, A. P., Abegg, C. P. and et al. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. **Acta Trop.** 166:212-217, 2017.
10. Coura, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 102 Suppl 1:113-122, 2007.
11. Schmunis, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 102 Suppl 1:75-85, 2007.
12. Bonney, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite.** 21:11-2014.
13. Bello, Corassa R., Aceijas, C., Alves, P. A. and et al. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. **Perspect. Public Health.** 2016.
14. Requena-Mendez, A., Bussion, S., Aldasoro, E. and et al. Cost-effectiveness of Chagas disease screening in Latin American migrants at primary health-care centres in Europe: a Markov model analysis. **Lancet Glob. Health.** 2017.
15. Rezende, J. M. and Moreira, H. Manifestações digestivas na doença de Chagas. **Gastroenterologia clínica.** 2:1160-1168, 1981.
16. Prata, A. Classificação da infecção chagásica no homem. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 3:109-113, 1990.
17. de Lourdes, Higuchi M. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94 Suppl 1:263-267, 1999.
18. Coura, J. R. and Borges-Pereira, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop.** 115:5-13, 2010.
19. Bonney, K. M. and Engman, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Curr. Mol. Med.** 8:510-518, 2008.

20. Palomino, S. A., Aiello, V. D. and Higuchi, M. L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and Trypanosoma cruzi antigens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 94:571-579, 2000.
21. Adesse, D., Garzoni, L. R., Huang, H. and et al. Trypanosoma cruzi induces changes in cardiac connexin43 expression. **Microbes. Infect.** 10:21-28, 2008.
22. Spray, D. C. and Burt, J. M. Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. **Am. J Physiol.** 258:C195-C205, 1990.
23. Waghbi, M. C., Coutinho-Silva, R., Feige, J. J. and et al. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor-beta treatment and Trypanosoma cruzi infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 104:1083-1090, 2009.
24. Araújo-Jorge, T. C. and Castro, S. L. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal. **Fiocruz: Instituto Oswaldo Cruz.** 366-2000.
25. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C. and et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation.** 115:1109-1123, 2007.
26. Tarleton, R. L., Koller, B. H., Latour, A. and et al. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection. **Nature.** 356:338-340, 1992.
27. Andrade, S. G. and Magalhaes, J. B. Biodemes and zymodemes of Trypanosoma cruzi strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 30:27-35, 1997.
28. Vago, A. R., Macedo, A. M., Adad, S. J. and et al. PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet.** 348:891-892, 1996.
29. Vago, A. R., Macedo, A. M., Oliveira, R. P. and et al. Kinetoplast DNA signatures of Trypanosoma cruzi strains obtained directly from infected tissues. **Am. J Pathol.** 149:2153-2159, 1996.
30. Noya, B. A., Diaz-Bello, Z., Colmenares, C. and et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 110:377-386, 2015.
31. Medeiros, M. B., Guerra, J. A. and Lacerda, M. V. Meningoencephalitis in a patient with acute Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 41:520-521, 2008.
32. Barbosa-Ferreira, J. M., Guerra, J. A., Santana Filho, F. S. and et al. [Cardiac involvement in Acute Chagas' Disease cases in the Amazon region]. **Arq Bras. Cardiol.** 94:147-149, 2010.
33. Souza-Lima, Rde C., Barbosa, Md, Coura, J. R. and et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 46:510-514, 2013.
34. Alarcon de, Noya B., Diaz-Bello, Z., Colmenares, C. and et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **J Infect. Dis.** 201:1308-1315, 2010.
35. Benitez, J. A., Araujo, B., Contreras, K. and et al. Urban outbreak of acute orally acquired Chagas disease in Tachira, Venezuela. **J Infect. Dev. Ctries.** 7:638-641, 2013.
36. Ruiz, R. C., Favoreto S Jr, Dorta, M. L. and et al. Infectivity of Trypanosoma cruzi strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. **Biochem. J.** 330 ( Pt 1):505-511, 1998.
37. Martins, R. M., Alves, R. M., Macedo, S. and et al. Starvation and rapamycin

- differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cell Microbiol.** 13:943-954, 2011.
38. Rodriguez, A., Martinez, I., Chung, A. and et al. cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. **J Biol Chem.** 274:16754- 16759, 1999.
  39. Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J. and et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell.** 71:1117-1130, 1992.
  40. Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T. and Silva, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol.** 18:262-265, 2002.
  41. Costa, V. M., Torres, K. C., Mendonca, R. Z. and et al. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.** 177:3193-3200, 2006.
  42. Cardillo, F., Voltarelli, J. C., Reed, S. G. and et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.** 64:128-134, 1996.
  43. Guerreiro, M. L., Morais, I. R. and Andrade, S. G. Immunological response to re-infections with clones of the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* with different degrees of virulence: influence on pathological features during chronic infection in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 110:500-506, 2015.
  44. Costa, V. M., Torres, K. C., Mendonca, R. Z. and et al. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.** 177:3193-3200, 2006.
  45. Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S. and et al. Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL- 12 produced by Listeria-induced macrophages  
1. **Science.** 260:547-549, 1993.
  46. Silva, J. S., Machado, F. S. and Martins, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci.** 8:s314-s325, 2003.
  47. Tostes S Jr, Bertulucci Rocha-Rodrigues, D., de Araujo, Pereira G. and et al. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. **Int. J Cardiol.** 99:233-237, 2005.
  48. Martins, G. A., Cardoso, M. A., Aliberti, J. C. and et al. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunol. Lett.** 63:113-120, 1998.
  49. Freire-de-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B. and et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature.** 403:199-203, 2000.
  50. Gomes, J. A., Bahia-Oliveira, L. M., Rocha, M. O. and et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect. Immun.** 71:1185-1193, 2003.
  51. Hunter, C. A., Ellis-Neyes, L. A., Slifer, T. and et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** 158:3311-3316, 1997.
  52. Mariano, F. S., Gutierrez, F. R., Pavanelli, W. R. and et al. The involvement of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes. Infect.** 10:825-833, 2008.
  53. Belkaid, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat. Rev.**

**Immunol.** 7:875- 888, 2007.

54. Park, H., Li, Z., Yang, X. O. and et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat. Immunol.** 6:1133-1141, 2005.
55. Nikoopour, E., Schwartz, J. A. and Singh, B. Therapeutic benefits of regulating inflammation in autoimmunity. **Inflamm. Allergy Drug Targets.** 7:203-210, 2008.
56. Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nat. Rev. Immunol.** 8:337-348, 2008.
57. da Matta Guedes, P. M., Gutierrez, F. R., Maia, F. L. and et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** 4:e604-2010.
58. Vanden Eijnden, S., Goriely, S., De, Wit D. and et al. Preferential production of the IL-12(p40)/IL- 23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns. **Eur. J Immunol.** 36:21-26, 2006.
59. Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS. Biol.** 14:e1002533-2016.
60. Tremaroli, V. and Backhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature.** 489:242-249, 2012.
61. Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J. and et al. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. **Diabetes.** 62:3341-3349, 2013.
62. Wichmann, A., Allahyar, A., Greiner, T. U. and et al. Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. **Cell Host. Microbe.** 14:582-590, 2013.
63. Talham, G. L., Jiang, H. Q., Bos, N. A. and et al. Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. **Infect. Immun.** 67:1992-2000, 1999.
64. Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T. and et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. **Nature.** 455:808-812, 2008.
65. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N. and et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell.** 139:485-498, 2009.
66. Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. and et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature.** 489:231-241, 2012.
67. Srikanth, C. V. and McCormick, B. A. Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. **Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.** 2008:626827-2008.
68. Jarchum, I. and Pamer, E. G. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. **Curr. Opin. Immunol.** 23:353-360, 2011.
69. Weaver, C. T. and Hatton, R. D. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. **Nat. Rev. Immunol.** 9:883-889, 2009.
70. Pacheco, C. R. and Olvera, R. [Control of tuberculosis in Mexico]. **Bol. Oficina Sanit. Panam.** 105:34-44, 1988.
71. Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G. and et al. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature.** 467:426-429, 2010.
72. Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A. and et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. **Cell.** 149:1578-1593, 2012.
73. Littman, D. R. and Pamer, E. G. Role of the commensal microbiota in normal and

- pathogenic host immune responses. **Cell Host. Microbe.** 10:311-323, 2011.
74. Raetz, M., Hwang, S. H., Wilhelm, C. L. and et al. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells. **Nat. Immunol.** 14:136-142, 2013.
75. Hall, J. A., Bouladoux, N., Sun, C. M. and et al. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. **Immunity.** 29:637-649, 2008.
76. Benson, A., Pifer, R., Behrendt, C. L. and et al. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. **Cell Host. Microbe.** 6:187-196, 2009.
77. Kinnebrew, M. A., Buffie, C. G., Diehl, G. E. and et al. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. **Immunity.** 36:276-287, 2012.
78. Duarte, R., Silva, A. M., Vieira, L. Q. and et al. *Trypanosoma cruzi*: influence of predominant bacteria from indigenous digestive microbiota on experimental infection in mice. **Exp. Parasitol.** 111:87-96, 2005.
79. Hamidzadeh, K., Christensen, S. M., Dalby, E. and et al. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. **Annu. Rev. Physiol.** 79:567-592, 2017.
80. Muller, P. A., Kosco, B., Rajani, G. M. and et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. **Cell.** 158:300-313, 2014.
81. Noya, B. A., Diaz-Bello, Z., Colmenares, C. and et al. The performance of laboratory tests in the management of a large outbreak of orally transmitted Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 107:893-898, 2012.
82. BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** 2:389-396, 1962.
83. Zhang, X., Goncalves, R. and Mosser, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Curr. Protoc. Immunol.** Chapter 14:Unit-2008.
84. Yoshida, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitol. Int.** 57:105-109, 2008.
85. Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y. and et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. **J Physiol.** 558:263-275, 2004.
86. Hooper, L. V., Littman, D. R. and Macpherson, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science.** 336:1268-1273, 2012.
87. Olszak, T., An, D., Zeissig, S. and et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. **Science.** 336:489-493, 2012.
88. Goes, G. R., Rocha, P. S., Diniz, A. R. and et al. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages  
1. **PLoS. Negl. Trop Dis.** 10:e0004555-2016.
89. Lemos, J. R., Rodrigues, W. F., Miguel, C. B. and et al. Influence of parasite load on renal function in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS. One.** 8:e71772-2013.
90. Barreto-de-Albuquerque, J., Silva-dos-Santos, D., Perez, A. R. and et al. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? **PLoS. Negl. Trop Dis.** 9:e0003849-2015.
91. Hoft, D. F., Farrar, P. L., Kratz-Owens, K. and et al. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. **Infect. Immun.**

64:3800-3810, 1996.

92. Nauli, A. M. and Nauli, S. M. Intestinal transport as a potential determinant of drug bioavailability. **Curr. Clin. Pharmacol.** 8:247-255, 2013.
93. dos Santos, L. M., Santos, M. M., de Souza Silva, H. P. and et al. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. **Med. Microbiol. Immunol.** 200:29-38, 2011.
94. Campos, C. F., Cangussu, S. D., Duz, A. L. and et al. 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.** 11:e0153038-2016.
95. Gois, M. B., Hermes-Uliana, C., Barreto Zago, M. C. and et al. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* induces death of submucosal enteric neurons and damage in the colonic mucosa of rats. **Exp. Parasitol.** 164:56-63, 2016.
96. Vicentino-Vieira, S. L., Nogueira de Melo, Gde A., Biondaro, Gois M. and et al. Oral dependent- dose toxoplasmic infection model induced by oocysts in rats: Myenteric plexus and jejunal wall changes. **Exp. Parasitol.** 156:12-18, 2015.
97. Awoniyi, M., Miller, S. I., Wilson, C. B. and et al. Homeostatic regulation of Salmonella-induced mucosal inflammation and injury by IL-23. **PLoS. One.** 7:e37311-2012.
98. Tsolis, R. M., Townsend, S. M., Miao, E. A. and et al. Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. **Infect. Immun.** 67:6385-6393, 1999.
99. Dos-Santos, A. L., Carvalho-Kelly, L. F., Dick, C. F. and et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. **Exp. Parasitol.** 167:67-75, 2016.
100. Toso, M. A., Vial, U. F. and Galanti, N. [Oral transmission of Chagas' disease]. **Rev. Med. Chil.** 139:258-266, 2011.
101. Shikanai-Yasuda, M. A. and Carvalho, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect. Dis.**54:845-852, 2012.
102. Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Guaraldo, A. M. and et al. Chagas' disease as a foodborne illness. **J Food Prot.** 72:441-446, 2009.
103. Bastos, C. J., Aras, R., Mota, G. and et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. **PLoS. Negl. Trop Dis.** 4:e711-2010.
104. Dias, J. P., Bastos, C., Araujo, E. and et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 41:296-300, 2008.
105. Shikanai-Yasuda, M. A., Marcondes, C. B., Guedes, L. A. and et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo.** 33:351-357, 1991.
106. da Silva, N. N., Clausell, D. T., Nolibos, H. and et al. [Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination]. **Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo.** 10:265-276, 1968.
107. Rassi, A., Jr., Rassi, A. and Marin-Neto, J. A. Chagas disease. **Lancet.** 375:1388-1402, 2010.
108. Cortez, M., Neira, I., Ferreira, D. and et al. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infect. Immun.** 71:6184-6191, 2003.
109. Covarrubias, C., Cortez, M., Ferreira, D. and et al. Interaction with host factors

- exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **Int. J Parasitol.** 37:1609-1616, 2007.
110. Cortez, M., Silva, M. R., Neira, I. and et al. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. **Microbes. Infect.** 8:36-44, 2006.
111. Teixeira, M. M. and Yoshida, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Mol. Biochem. Parasitol.** 18:271-282, 1986.
112. Cortez, C., Yoshida, N., Bahia, D. and et al. Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. **PLoS. One.** 7:e42153-2012.
113. Hashimoto, D., Miller, J. and Merad, M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. **Immunity.** 35:323-335, 2011.
114. Mikami, Y., Mizuno, S., Nakamoto, N. and et al. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. **PLoS. One.** 9:e84619-2014.
115. Silva-dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque, J., Guerra, B. and et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. **PLoS. Negl. Trop Dis.** 11:e0005507-2017.
116. Hoft, D. F., Schnapp, A. R., Eickhoff, C. S. and et al. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 68:197-204, 2000.
117. Michailowsky, V., Silva, N. M., Rocha, C. D. and et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J Pathol.** 159:1723-1733, 2001.
118. Barbosa de Oliveira, L. C., Curotto de Lafaille, M. A., Collet de Araujo Lima GM and et al. Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunol.** 170:41-53, 1996.
119. Vespa, G. N., Cunha, F. Q. and Silva, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*- induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.** 62:5177-5182, 1994.
120. Silva, J. S., Vespa, G. N., Cardoso, M. A. and et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.** 63:4862-4867, 1995.
121. Souza, D. G., Vieira, A. T., Soares, A. C. and et al. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **J Immunol.** 173:4137-4146, 2004.
122. da Matta Guedes, P. M., Gutierrez, F. R., Maia, F. L. and et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS. Negl. Trop Dis.** 4:e604-2010.
123. O'Connor, W., Jr., Kamanaka, M., Booth, C. J. and et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. **Nat. Immunol.** 10:603-609, 2009.
124. Wang, R., Hasnain, S. Z., Tong, H. and et al. Neutralizing IL-23 is superior to blocking IL-17 in suppressing intestinal inflammation in a spontaneous murine colitis model.

**Inflamm. Bowel. Dis.** 21:973-984, 2015.

125. Schultz, B. M., Paduro, C. A., Salazar, G. A. and et al. A Potential Role of Salmonella Infection in the Onset of Inflammatory Bowel Diseases. **Front Immunol.** 8:191-2017.

126. Wagnerova, A., Babickova, J., Liptak, R. and et al. Beneficial effects of live and dead Salmonella- based vector strain on the course of colitis in mice. **Lett. Appl. Microbiol.** 63:340-346, 2016.

127. Gabanyi, I., Muller, P. A., Feighery, L. and et al. Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. **Cell.** 164:378-391, 2016.

128. Verheijden, S., De, Schepper S. and Boeckxstaens, G. E. Neuron-macrophage crosstalk in the intestine: a "microglia" perspective. **Front Cell Neurosci.** 9:403-2015.

129. Thevaranjan, N., Puchta, A., Schulz, C. and et al. Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. **Cell Host. Microbe.** 21:455-466, 2017.

130. Moreira, N. M., Sant'ana, D. M., Araujo, E. J. and et al. Neuronal changes caused by Trypanosoma cruzi: an experimental model. **An. Acad. Bras. Cienc.** 83:545-555, 2011.

131. Andrade, S. G., Magalhaes, J. B. and Pontes, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with Trypanosoma cruzi strains of different types. **Bull. World Health Organ.** 63:721-726, 1985.

132. Arantes, R. M., Marche, H. H., Bahia, M. T. and et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in Trypanosoma cruzi-infected mice. **Am. J Pathol.** 164:1361-1368, 2004.

133. Ben Younes-Chennoufi, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Tricottet, V. and et al. Persistence of Trypanosoma cruzi antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Trans. R. Soc. Trop Med. Hyg.** 82:77-83, 1988.