



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



**Papel do receptor NOD2 na patogenia das lesões do sistema
digestivo da doença de Chagas**

Nathalie de Sena Pereira

Belo Horizonte/MG
Dezembro/2018

Nathalie de Sena Pereira

Papel do receptor NOD2 na patogenia das lesões do sistema digestivo da doença de Chagas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Imunoparasitologia.

Orientador: Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes

Prof. Adjunto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CB/UFRN.

Coorientadora: Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão

Profa. Adjunto e Voluntária do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG.

Colaboradores

Dra. Antônia Cláudia Jácome da Câmara

Profª Adjunta do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, CCS/UFRN.

Dra. Rosa Maria Esteves Arantes

Profª Titular do Departamento de Patologia, ICB/UFMG.

Dr. Dario Simões Zamboni

Professor Associado da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP/USP.

Belo Horizonte/MG

Dezembro/2018

Nathalie de Sena Pereira

**Papel do receptor NOD2 na patogenia das lesões do sistema
digestivo da doença de Chagas**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Parasitologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial à obtenção do título de
Doutor em Ciências, área de concentração
Imunoparasitologia.*

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes- Orientador (UFRN)

Profa. Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão- Coorientadora (UFMG)

Profa. Dra. Érica dos Santos Martins Duarte (UFMG)

Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia (UFOP)

Profa. Dra. Marta de Lana (UFOP)

Prof. Dr. Ricardo Gonçalves (UFMG)

Instituições envolvidas



Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Departamento de Parasitologia, Av. Antônio Carlos, 6627, Bloco L4, Sala 179, Campus Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Telefone: 31 3409-2847/2968.



Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Biociências. Av. Salgado Filho, 3000, Campus Universitário, Lagoa nova, 59072-970 Natal, RN, Telefone 84 3215-3439.



Laboratório de Biologia de Parasitos e Doença de Chagas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia 2º Andar, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis, 59012-570 Natal, RN, Telefone: 84 3342-9827.



Secretarias Municipais de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Norte.

Apoio financeiro



MCT/CNPq Universal 14/2013 Proc. N° 475572/2013-0



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



Ministério da
Saúde



Chamada N° 40/2012–Pesquisa em Doenças Negligenciadas Proc. N° 404056/2012-1



Programa Nacional de Incentivo à Pesquisa em Parasitologia Básica Edital N° 032/2010 Proc. N° 23038.005288/2011-48



Edital 5/2011 - PPPIV N° 79

Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.

Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e,

Acima de tudo, importa o que fazemos de nós!

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, nossa bússola espiritual diária.

À **minha família**, por todo o apoio.

Ao meu Orientador, Professor Paulo Marcos da Matta Guedes, sempre entusiasmado e prestativo, grande influência como orientador e como pessoa.

À **minha Coorientadora, Professora Lúcia Maria da Cunha Galvão**, pelo profissionalismo, pela pessoa humana e sincera, presente mesmo com as adversidades da vida.

Ao Professor Egler Chiari, sempre muito sincero, pelas palavras de apoio e incentivo.

À **Professora Antônia Cláudia Jácome da Câmara**, pelo incansável auxílio durante as viagens ao campo e experimentos em laboratório.

À **Daniela Ferreira Nunes**, colaboradora deste trabalho, pelo auxílio durante as coletas e entraves burocráticos da Pós-Graduação e pelo companheirismo.

Ao Professor Cléber de Mesquita Andrade, colaborador deste trabalho, que como médico do grupo de pesquisa foi responsável pelas avaliações clínicas dos pacientes.

À **Professora Rosa Maria Esteves Arantes**, colaboradora deste trabalho, pelo incansável auxílio durante as avaliações histopatológicas.

À **doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mayra Ricci, e Pós-doutoranda Samantha Ribeiro**, pela colaboração, apoio na recepção e processamento das amostras e pelas ricas discussões.

Aos colegas do laboratório de Imunoparasitologia pelo incansável auxílio, pela descontração nos momentos árdios de trabalho, especialmente aqueles que participaram diretamente desse trabalho: Denis Dantas, Thamyres Queiroga, Thaís Perez, Luiz Nepomuceno e Raquel Medeiros.

Aos colegas do laboratório de Biologia dos Parasitos, Andressa Noronha, Raphael Montoril, Juliana Viana, Pedro Ramon, Vicente Neto, Raniery Santana, Natan Honorato, Pedro Igor, Letícia Sales e Miguel Ferreira pela amizade, respeito e profissionalismo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pelos ensinamentos e total dedicação.

À **Professora Daniela Castanheira Bartholomeu**, pelas contribuições realizadas a esse trabalho durante o exame de qualificação e apoio nos experimentos.

Ao Professor Remo de Castro, pelas contribuições realizadas durante o exame de qualificação.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Sumara e Sibebe pelo incansável trabalho e auxílio mesmo à distância.

À minha turma de mestrado, a turma do Naldo! Cercada de pessoas maravilhosas, profissionais e divertidas.

Aos amigos da graduação que continuam presentes compartilhando das mesmas experiências e frustrações e que deixam nossa vida mais leve durante as horas de lazer.

Às amigas de longa data da Escola Doméstica, pela amizade verdadeira, como nos velhos tempos, especialmente Daniela Rossi, pelo acolhimento e apoio durante o tempo em que morei em Belo Horizonte.

Ao querido amigo Christophe Trevisani, pela amizade e apoio durante minhas idas às terras mineiras.

As amigas da República Woodstock, pela amizade e recepção, especialmente durante a reta final.

Aos amigos Ana Karla e Jaerdyson Medeiros, grandes profissionais, pelo auxílio durante minha trajetória profissional, meus braços direito e esquerdo!

À Bioterista Ana Auxiliadora e Washigton Rocha, pelo incansável auxílio com os animais de experimentação.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, pela contribuição à ciência.

Aos pacientes, que aceitaram fazer parte desse trabalho de pesquisa, pelo carisma, e por contribuir com a ciência.

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG pela recepção e apoio!

Às Agências de Fomento, CAPES e FAPERN pelo apoio essencial, especialmente ao CNPq, do qual minha bolsa foi vinculada.

Àqueles que contribuíram de forma direta ou indireta neste trabalho.

RESUMO

As formas digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas são observados em 2% a 15% dos pacientes na fase crônica da infecção, mas os mecanismos imunopatológicos permanecem não definidos. Embora estudos demonstrem a importância da inflamação e presença do parasita no esôfago e cólon no processo patofisiológico de geração do megacólon e megaesôfago em pacientes chagásicos crônicos. O mecanismo pelo qual os pacientes desenvolvem estas alterações anatomopatológicas não estão claros. A molécula NOD2 (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2*) é um receptor da imunidade inata expresso principalmente em macrófagos e células dendríticas. NOD2 também é expresso em células de *Paneth* e mantêm a homeostase intestinal, prevenindo a penetração de bactérias no epitélio gastrointestinal. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o papel do receptor NOD2 na patogenia do sistema digestivo na doença de Chagas. Inicialmente a expressão de RNAm de NOD2, RIP2 (*Receptor-interacting protein kinase 2*) e defensinas 5 e 6 foi avaliada em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=15) e cardiodigestiva (n=15) da doença de Chagas, usando a PCR em tempo real, e correlacionada ao grau de dilatação do esôfago, cólon sigmóide e reto. Os pacientes com as formas digestiva e cardiodigestiva da doença apresentaram expressão ausente ou reduzida de NOD2 e elevada expressão de RIP2 e defensina 6, quando comparados aqueles com as formas indeterminada e cardíaca. Também foi observada a correlação negativa entre a expressão de RNAm de NOD2 com o grau de dilatação do esôfago e a dimensão do sigmóide e do reto. Posteriormente camundongos C57BL/6 e NOD2^{-/-} foram infectados com 1×10^3 tripomastigotas sanguíneos do isolado RN25 (obtido de paciente com a forma digestiva) e avaliada a susceptibilidade a infecção (parasitemia e mortalidade) e alterações do trato gastrointestinal (motilidade, inflamação e desnervação). Camundongos NOD2^{-/-} apresentaram maior parasitemia do 17º ao 30º dia após infecção, quando comparado a animais C57BL/6. Ademais, fêmeas deficientes de NOD2 apresentaram redução da motilidade intestinal 15 e 180 dias após infecção, quando comparado a animais C57BL/6. A análise histopatológica do cólon dos animais NOD2^{-/-} e C57BL/6 fêmea demonstraram focos inflamatórios discretos durante a fase aguda da infecção (19 dias após infecção). Durante a fase crônica da infecção (12 meses) ocorreu inflamação e hipertrofia da camada muscular no cólon e jejuno dos animais NOD2^{-/-}, alterações não observadas nos camundongos C57BL/6. Em seguida, elevamos o inóculo de *T. cruzi* para os camundongos foi aumentado com intuito de promover o aumento da gênese de lesões do trato

gastrointestinal. Devido a baixa virulência do isolado RN25, camundongos C57BL/6 e NOD2^{-/-} fêmeas foram infectados com 5×10⁴ tripomastigotas sanguíneos da cepa CL de *T. cruzi* e avaliada a susceptibilidade a infecção (parasitemia e mortalidade), alterações do trato gastrointestinal (motilidade, inflamação e desnervação) e expressão de RNAm de receptores da imunidade inata (TLR2, TLR4), fator de transcrição da resposta Th1 (T-bet), citocinas (IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ) e outros mediadores inflamatórios (iNOS e defensina A) no cólon. Animais NOD2^{-/-} apresentam parasitemia mais elevada entre o 30^o e 60^o dias após a infecção, redução da motilidade intestinal durante a fase aguda da infecção e menor sobrevivência (60%) quando comparado aos animais C57BL/6 (100% de sobrevivência). Camundongos nocautes de NOD2 infectados apresentaram aumento na expressão da maioria dos mediadores inflamatórios analisados na fase aguda (15 dias após a infecção), quando comparado a animais selvagens. Entretanto, durante a fase crônica (60 dias após a infecção) foi observada a expressão dos mediadores inflamatórios no trato gastrointestinal dos animais nocautes de NOD2 e C57BL/6 infectados com a cepa CL, semelhante ao grupo de camundongos não infectados. Desta forma, a expressão deficiente de NOD2 em pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas e o aumento de lesões com diminuição de motilidade do trato gastrointestinal em camundongos NOD2^{-/-} experimentalmente infectados pelo isolado RN25 de *T. cruzi*, indicam que a ausência ou baixa expressão de RNAm de NOD2 pode estar correlacionada ao desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas. Associado ao perfil genético do parasito que gera infecção persistente e discreta em diversos locais do trato gastrointestinal, que quando somadas podem atingir o nível crítico de desnervação do plexo mientérico levando a hiperexcitabilidade, descoordenação dos movimentos peristálticos e a hipertrofia.

Palavras chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Forma clínica digestiva, Receptores da imunidade inata.

ABSTRACT

Digestive and cardiodigestive forms of Chagas' disease are observed in 2% to 15% of the patients, but immunopathological mechanisms remain undefined. Although studies have demonstrated the importance of inflammation and the presence of the parasite in the esophagus and colon in the pathophysiological process of megacolon and megaesophagus generation in chronic chagasic patients. The mechanism by which some patients develop these anatomopathological alterations is unclear. The NOD2 molecule is an innate immune receptor, expressed mainly in macrophages and dendritic cells. The NOD2 receptor is also highly expressed in Paneth cells and maintains intestinal homeostasis, prevents the penetration of bacteria into the epithelium of the gastrointestinal tract. This work aimed to evaluate the role of the NOD2 receptor (Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2) in the pathogenesis of the digestive system in Chagas' disease. The expression of NOD2, RIP2 (Receptor-interacting protein kinase 2) and defensins 5 and 6 was evaluated in peripheral blood mononuclear cells of patients with the indeterminate (n = 18), cardiac (n = 17), digestive (n = 15) and cardiodigestive (n = 15) of Chagas disease, using real-time PCR, correlated with the degree of dilation of the esophagus, sigmoid colon and rectum. Patients with the digestive and cardiodigestive forms of the disease had absent or reduced expression of NOD2 and high expression of RIP2 and defensin 6 when compared with those with indeterminate and cardiac forms. The negative correlation between the expression of NOD2 mRNA with the degree of esophageal dilation and the size of the sigmoid and rectum was also observed. Subsequently C57BL/6 and NOD2^{-/-} mice were infected with 1×10^3 blood trypomastigotes of the isolated RN25 (obtained from patient with the digestive form) and evaluated the susceptibility to infection (parasitemia and mortality) and alterations of the gastrointestinal tract (motility, inflammation and denervation). NOD2^{-/-} mice showed higher parasitemia from the 17th to the 30th day after infection when compared to C57BL/6 animals. In addition, NOD2^{-/-} deficient females had reduced intestinal motility 15 and 180 days after infection when compared to C57BL/6 animals. Histopathological examination of the colon of NOD2^{-/-} and female C57BL/6 animals demonstrated discrete inflammatory foci during the acute phase of infection (19 days post infection). During the chronic phase of the infection (12 months) there was inflammation and hypertrophy of the muscular layer in the colon and jejunum of the NOD2^{-/-} animals, changes not observed in the C57BL/6 mice. Next, we raised the inoculum of *T. cruzi* to the mice was increased in order to promote the increase of the genesis of lesions of the gastrointestinal tract. Due to the low virulence of the RN25 isolate, female C57BL/6 and NOD2^{-/-} mice were infected with 5×10^4 trypomastigotes of *T. cruzi* CL

strain and infection susceptibility (parasitemia and mortality), gastrointestinal tract (TLR2, TLR4), transcription factor Th1 (T-bet), cytokines (IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ) and the expression of innate immunity receptors (TLR2, TLR4)) and other inflammatory mediators (iNOS and defensin A) in the colon.. NOD2^{-/-} animals present higher parasitemia between 30 and 60 days post infection, reduction of intestinal motility during the acute phase of infection and lower survival (60%) when compared to C57BL/6 animals (100% survival). Knockout mice of infected NOD2 showed increased expression of most of the inflammatory mediators analyzed in the acute phase (15 days post infection) when compared to wild animals. However, during the chronic phase (60 days after infection) the expression of inflammatory mediators in the gastrointestinal tract of NOD2 and C57BL/6 knockout animals infected with the CL strain was observed, similar to that of uninfected mice. Thus, deficient expression of NOD2 in patients with the digestive form of Chagas' disease and the increase of lesions with decreased motility of the gastrointestinal tract in experimentally infected NOD2^{-/-} mice by *T. cruzi* isolate RN25 indicate that the absence or low NOD2 mRNA expression may be correlated with the development of the digestive form of Chagas' disease. Associated with the genetic profile of the parasite that generates persistent and discrete infection in several sites of the gastrointestinal tract, which when added can reach the critical level of myenteric plexus denervation leading to hyperexcitability, incoordination of peristaltic movements and hypertrophy.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Clinical digestive form, Receptors of innate immunity.

LISTA DE ABREVIATURAS

BIRs: *Baculovirus inhibitors*

Bz: Benznidazol

CARD: Cardíaca

CARDIG: Cardiodigestiva

CARDs: *Caspase recruitment domain*

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CN: Controle negativo

CNS/MS: Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde

DAI: Dias após a infecção

DAMPS: *Damage-associated molecular patterns*

DIG: Digestiva

DII: Doenças inflamatórias intestinais

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Bases nitrogenadas

DP: Desvio Padrão

DSS; Dextran sulfato de sódio

ECG: Eletrocardiograma

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GIPL: Glicosilinositolfosfolípídeo

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

HAI: Hemaglutinação indireta

HE: Hematoxilina-Eosina

IFN: Interferon

IgA: Imunoglobulina do isótipo A

IKK: Inibidor de NF-KB kinase

IKKB: Inibidor fosforilado de NF-KB kinase

IL: Interleucina (exemplo IL-10)

IND: Indeterminada

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

MAPKs: *Mitogen-activated protein kinases*

MDP: Muramildipeptídeo

mRNA/ RNAm: RNA mensageiro

MyD88: *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*

NF- κ B: Fator nuclear kappa-B

NK: *Natural killer*

NO: óxido nítrico

NOD: *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain* (exemplo NOD2)

PAMPS: *Pathogen-associated molecular pattern*

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: *Polimerase chain reaction*

PRR: *Pattern Recognition Receptors*

PYD: *Pyrin domain*

qPCR: *Quantitative Polimerase chain reaction*

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

RIG/RLRs: *RIG Like receptor family*

RIP2: *Receptor-interacting protein kinase 2*

RLRs: Receptores do tipo RIG

RNA: Ácido ribonucléico

SNA: Sistema nervoso autônomo

TA: Temperatura ambiente

T-bet: *T cell-associated transcription factor*

TCD: Linfócitos T Cluster of Differentiation (exemplo: TCD8⁺)

Th: Linfócitos T *help*

TLR: *Toll Like Receptors* (exemplo TLR2)

TNF α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*

Toll: Receptores do tipo Toll

TRIF: *Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor protein inducing IFN beta*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais receptores da imunidade inata (TLRs e NLRs) e padrões moleculares associados a patógenos que atuam como agonistas.....	22
Tabela 2 - Caracterização das formas clínicas dos pacientes com doença de Chagas procedentes de dez municípios do estado do Rio Grande do Norte.....	30
Tabela 3 - Características dos isolados de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizados no estudo.....	32
Tabela 4 - Sequências dos iniciadores específicos utilizados na reação de qPCR.....	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Dinâmica da infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. O desenvolvimento da patogenia cardíaca e digestiva da doença de Chagas tem início com a infecção pelas formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* que são eliminadas nas fezes de Triatomíneos infectados..... 14
- Figura 2 - Morfologia e alterações anatomopatológicas do cólon e esôfago na doença de Chagas..... 17
- Figura 3 - Hipótese para gênese de lesões do trato gastrointestinal na forma digestiva da doença de Chagas..... 26
- Figura 4 - Delineamento experimental para avaliação de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas 28
- Figura 5 - Delineamento experimental utilizando animais C57BL6 e NOD2^(-/-) infectados experimentalmente por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*. 31
- Figura 6 - Delineamento experimental utilizando animais C57BL6 e NOD2^(-/-) infectados experimentalmente por via intraperitoneal com 5 × 10⁴ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi*. Os animais avaliados 60 dias após a infecção foram tratados com dose única de 100mg/kg de benznidazol. 31
- Figura 7 - Pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas apresentam ausência ou expressão reduzida de NOD2. Expressão de RNAm de NOD1 (A), NOD2 (B) e RIP2 (C) determinadas por qPCR a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas: indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=15) e cardiodigestiva (n=15).. 38
- Figura 8 - A dilatação do esôfago, sigmóide e reto é inversamente correlacionada a expressão de RNAm de NOD2. Correlação entre a expressão de RNAm de NOD2, determinada por qPCR, com o grau de dilatação do megaesôfago (A), a dimensão do sigmóide (B) e com a dimensão do reto (C) em pacientes com as formas digestiva (n=15) e cardiodigestiva (n=15) da doença de Chagas crônica. *p<0,05..... 39
- Figura 9 - Pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas apresentam elevada expressão de α-defensina 6. Expressão de RNAm de α-defensina 5 (A) e α-defensina 6 (B) determinadas por qPCR a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas: indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=15) e cardiodigestiva (n=15) da doença. 39
- Figura 10 - Camundongos NOD2^(-/-) apresentam parasitemia mais elevada e sobrevivência semelhante a camundongos C57BL/6. Curvas de parasitemia (A e B) e sobrevivência (C e D) de camundongos C57BL/6 e NOD2^(-/-) fêmeas e machos infectados por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (Tc-II) de *Trypanosoma cruzi*..... 40
- Figura 11 - Camundongos NOD2^(-/-) infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentam redução da motilidade intestinal. Avaliação da motilidade gastrointestinal pelo tempo médio de eliminação de carvão ativado em camundongos C57BL/6 e NOD2^(-/-) fêmeas (A) e machos (B) infectados por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*. 41
- Figura 12 - Camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentam inflamação no cólon discretamente maior que animais C57BL/6 durante a fase aguda da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos fêmea C57BL/6 WT (A e C-Não infectado), (B, D-Infectado) e NOD2^(-/-) (E e G Não infectado), (F e H-Infectado), infectados por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*. 43
- Figura 13 - Animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentam inflamação intensa no cólon durante a fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (A e C- Não infectado), (B, D- Infectado) e NOD2^(-/-) (E e G- Não infectado), (F e H- Infectado), infectados por

via intraperitoneal com 10^3 formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Eutanásia realizada após 12 meses. (Aumento de 4x: A, B, E, F e G; 10x: C, D e H).	44
Figura 14 - Animais infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> deficientes de NOD2 apresentam intensa inflamação no jejuno quando comparado com animais C57BL/6 durante a <u>fase crônica</u> da infecção. Aspectos histológicos do jejuno de camundongos fêmeas C57BL/6 (A e B) e NOD2 ^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 10^3 formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
Figura 15 - Animais infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> deficientes de NOD2 apresentam intensa inflamação no íleo quando comparado com animais C57BL/6 durante a <u>fase crônica</u> da infecção. Aspectos histológicos do íleo de camundongos fêmeas C57BL/6 (A e B) e NOD2 ^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 10^3 formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
Figura 16 - Animais infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> deficientes de NOD2 apresentam aumento na dimensão da parede do cólon e jejuno durante a <u>fase crônica</u> da infecção. Aspectos dimensionais do cólon (A) e jejuno (B) de camundongos fêmeas C57BL/6 e NOD2 ^(-/-) não infectados ou infectados por via intraperitoneal com 10^3 formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
Figura 17 - Camundongos NOD2 ^(-/-) infectados com a cepa CL do <i>Trypanosoma cruzi</i> apresentaram elevada parasitemia e mortalidade. Curvas de parasitemia (A) e sobrevivência (B) de camundongos C57BL/6 e NOD2 ^(-/-) fêmeas infectadas por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Bz: indica o tratamento com dose única de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção.	47
Figura 18 - Camundongos NOD2 ^(-/-) e C57BL/6 fêmeas infectadas com a cepa CL do <i>Trypanosoma cruzi</i> apresentaram redução da motilidade intestinal durante a <u>fase aguda</u> da infecção. Avaliação da motilidade gastrointestinal pelo tempo médio de eliminação de carvão ativado em camundongos C57BL/6 e NOD2 ^(-/-) fêmeas infectadas por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com uma dose de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção.	48
Figura 19 - A infecção experimental pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> induz ao aumento da expressão de marcadores inflamatórios no cólon de camundongos NOD2 ^(-/-) durante a <u>fase aguda</u> . A expressão de RNAm de TLR2 (A), IL-10 (B), TLR4 (C), T-bet (D), IL-17 (E), IFN- γ (F), TNF- α (G), iNOS (H) e defensina-A (I) foi determinada por qPCR no cólon de camundongos C57BL/6 e NOD2 ^(-/-) infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) e eutanasiados 12 dias após a infecção.	49
Figura 20 - Camundongos NOD2 ^(-/-) apresentaram baixa expressão de moléculas inflamatórias no cólon durante a <u>fase crônica</u> da infecção experimental pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> . A expressão de RNAm de TLR2 (A), IL-17 (B), defensina-A (C), T-Bet (D), TLR-4 (E), IFN- γ (F), IL-10 (G), iNOS (H) e TNF- α (I) foi determinada por qPCR no cólon de camundongos fêmea C57BL/6 e NOD2 ^(-/-) infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) e eutanasiados 60 dias após a infecção.	50
Figura 21 - Camundongos C57BL/6 e deficientes de NOD2 infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> apresentam inflamação discreta e similar no cólon durante a <u>fase aguda</u> da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos fêmeas C57BL/6 (A e B) e NOD2 ^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de <i>Trypanosoma cruzi</i> e eutanasiados durante a fase aguda da infecção (19 dias após infecção).	51
Figura 22 - Animais infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> deficientes de NOD2 apresentam maior inflamação no jejuno durante a <u>fase aguda</u> da infecção. Aspectos histológicos do jejuno de camundongos fêmeas C57BL/6 (A e B) e NOD2 ^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de <i>Trypanosoma cruzi</i> e eutanasiados durante a fase aguda da infecção (19 dias após infecção).	52

Figura 23 - Animais deficientes de NOD2 infectados apresentaram maior número de focos inflamatórios e acometimento do cólon na fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* e tratados com dose única de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção. 53

Figura 24 - Animais infectados pela cepa CL do *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentaram maior inflamação no jejuno durante a fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos fêmea C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com dose única de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção. 54

Figura 25 - Animais infectados com a cepa CL do *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentaram maior inflamação no íleo durante a fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do íleo de camundongos fêmea C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com dose única de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção. 55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 DOENÇA DE CHAGAS	12
1.2 PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS	13
1.3 PATOGENIA DO SISTEMA DIGESTIVO NA DOENÇA DE CHAGAS.....	15
1.4 RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	19
1.5 RECEPTORES DA IMUNIDADE INATA E <i>NUCLEOTIDE-BINDING OLIGOMERIZATION DOMAIN 2 (NOD2)</i>	21
1.6 JUSTIFICATIVA	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 PACIENTES CHAGÁSICOS	28
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	28
3.3. COLETA DE SANGUE E OBTENÇÃO DE PBMC (PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL)	29
3.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	31
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.5 ISOLADOS DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	32
3.6 ANIMAIS E INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	32
3.7 PARASITEMIA E SOBREVIVÊNCIA.....	32
3.8 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL DOS ANIMAIS	33
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA E EOSINA (HE)	33
3.10 MORFOMETRIA DO CÓLON E JEJUNO.....	34
3.11 EXTRAÇÃO DE RNAM E SÍNTESE DO CDNA EM PACIENTES E ANIMAIS	34
3.12 PCR QUANTITATIVA (QPCR) EM PACIENTES E ANIMAIS.....	35
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 RESULTADOS	37
4.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA EM PACIENTES CHAGÁSICOS.....	37
4.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM 10^3 TRIPOMASTIGOTAS DO ISOLADO RN-25 DE <i>T. CRUZI</i>	40
4.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM 5×10^4 TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA CL DE <i>T. CRUZI</i>	46
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÕES	65
8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA	87
8.1 ARTIGOS PUBLICADOS.....	87
8.2 APRESENTAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS.....	88
8.3 PRÉ-SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	90
9 ANEXOS	90
9.1 ANEXO 1	91
9.2 ANEXO 2	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descrita há 109 anos pelo médico sanitarista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas em Lassance-MG (CHAGAS 1909). A doença é endêmica da América Latina com estimativa de oito milhões de indivíduos infectados, ocorre atualmente em vários países onde não há transmissão vetorial para o homem, principalmente devido ao fluxo migracional da população da América Latina associada à transfusão sanguínea (WHO 2018). No Brasil, acredita-se que há dois a três milhões de indivíduos infectados e seis mil mortes/ano (MARTINS-MELO et al., 2014). O último inquérito nacional de soroprevalência realizado entre 2001-2008 no Brasil com 104.954 crianças até cinco anos de idade revelou que a maioria dos casos era proveniente do Sul do país, devido à transmissão congênita e, casos na região Nordeste indicativos de transmissão vetorial (OSTERMAYER et al., 2011). A doença de Chagas tem apresentado crescente mortalidade dos indivíduos infectados nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, em relação às outras regiões, com a descrição de casos agudos por infecção oral e transmissão vetorial especialmente pelo *Triatoma brasiliensis*, respectivamente (MARTINS-MELO et al., 2014).

O *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (CHAGAS 1909), agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, caracterizado pela presença do cinetoplasto, estrutura correspondente ao DNA extra nuclear condensado localizado em uma mitocôndria única e ramificada (KLEISEN, BORST, WEIJERS, 1975). Em revisão mais recente sobre a classificação de organismos eucariotes com ênfase em protistas eucariotes foi proposta a reunião de diferentes táxons em grupos genéticos similares, baseada em análises moleculares e filogenéticas. O *T. cruzi*, integrante do grupo de organismos que ocupam os níveis mais altos dos protistas eucariotes dentro de uma topologia hierárquica, está classificado como a seguir: (ADL et al., 2012): Excavata (CAVALIER-SMITH, 2002; corrigido por SIMPSON, 2003); Discoba, ribogruppo montado a partir de estudos filogenéticos (HAMPL et al., 2009); Discicristata (CAVALIER-SMITH, 1998); Euglenozoa (CAVALIER-SMITH, 1981, corrigido por SIMPSON, 1997); Kinetoplastea (HONIGBERG, 1963); Metakinetoplastina, ribogruppo (MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA e VICKERMAN, 2004); Trypanosomatida (KENT, 1880; corrigido por MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA e VICKERMAN, 2004) que contém a espécie *T. cruzi* (Revisado por ADL et al., 2012).

O *T. cruzi* foi recentemente classificado em seis diferentes subgrupos genéticos (TcI-VI) denominados DTUs (*Discrete typing units*) (ZINGALES et al. 2009; ZINGALES et al., 2018). Atualmente os estudos que avaliaram a correlação entre DTUs e as formas clínicas da doença de Chagas não têm demonstrado associações (DEL PUERTO et al., 2010), embora algumas evidências indicam caráter mais patogênico das DTUs I, II, V e VI, quando comparado as DTUs III e IV (CURA et al., 2012; MEZA et al., 2014; MARTINS et al., 2015). Em estudo experimental comparativo de TcIV proveniente do Norte do Brasil e TcII do Sul, foi verificada elevada patogenicidade de TcII (MEZA et al., 2014). No estado do Rio Grande do Norte, nosso grupo identificou a presença de TcIII em seres humanos com a forma indeterminada da doença, enquanto o TcI estava associado em 50% dos casos com a forma indeterminada, 25% cardíaca e 25% digestiva, e TcII em 16,7% dos pacientes com a forma indeterminada, 50% com forma cardíaca e 33,3% com a forma digestiva da doença de Chagas (MARTINS et al., 2015). Nesses estudos foram caracterizados e mantidos em cultura diversos isolados provenientes de pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas. Os isolados RN26 e 3188 (TcI) (CÂMARA et al., 2010; MARTINS et al., 2015; SANTANA, 2017) obtidos de pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas foram inoculados em camundongos e observada parasitemia subpatente nos animais infectados (SANTANA, 2017) e, no presente estudo foi utilizado o isolado RN25 para a infecção experimental.

1.2 Patogenia da doença de Chagas

A infecção pelo *T. cruzi* apresenta duas fases distintas, a aguda e a crônica. A fase aguda dura aproximadamente dois a quatro meses e normalmente o parasito é abundante nos tecidos e sangue periférico. A fase aguda é assintomática ou oligossintomática na maioria dos casos (90%), na minoria dos pacientes (10%) a fase aguda é sintomática com presença de febre, hepatoesplenomegalia, adenomegalia, edema bupalpebral unilateral (sinal de Romana), chagoma de inoculação, miocardite e meningoencefalite (CHAGAS 1916; RASSI JR et al., 1995). A miocardite e meningoencefalite ocorrem ocasionalmente, principalmente em crianças menores de quatro anos e pacientes com o vírus da imunodeficiência humana e, são as principais causas de morte nessa fase da doença (DIAS et al., 1956; DIAS, 1995; PRATA, 2001).

Após a fase aguda segue a fase crônica em que o indivíduo pode desenvolver as formas clínicas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva ou mesmo permanecer sem sintomas, caracterizando a forma indeterminada da doença (**Figura 1**). Os determinantes da evolução da infecção estão relacionados ao número de formas tripomastigotas de *T. cruzi* inoculadas

durante a infecção; ao perfil genético do parasito; às reinfecções; ao estado nutricional do paciente, sexo, idade e a resposta imunológica (COURA 1988; MACEDO & PENA 1998; ANDRADE et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; ZINGALES et al., 2009).

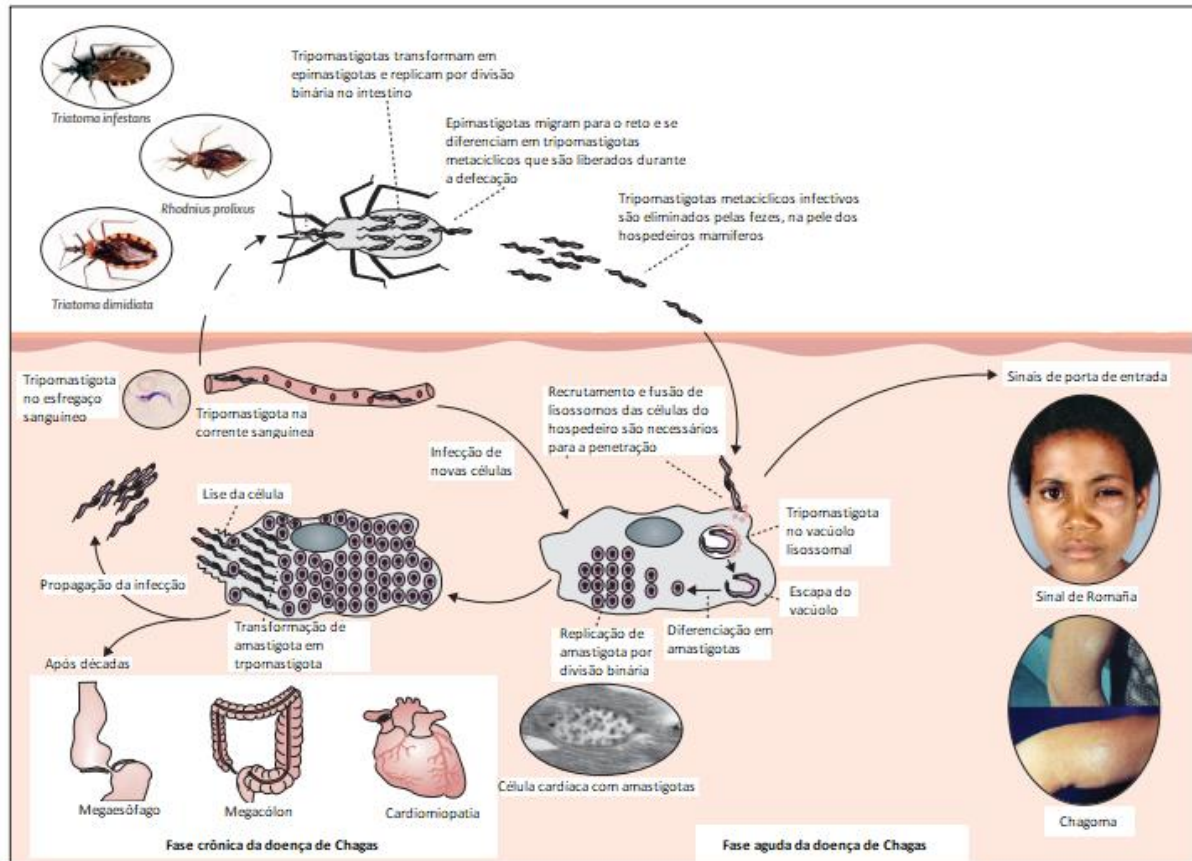


Figura 1 – Dinâmica da infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. O desenvolvimento da patogenia cardíaca e digestiva da doença de Chagas tem início com a infecção pelas formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* que são eliminadas nas fezes de Triatomíneos infectados. Após o inóculo, o indivíduo pode apresentar sinais de porta de entrada, como o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação. Passado o período da fase aguda tem início a fase crônica com o desenvolvimento do parasito nos tecidos do hospedeiro vertebrado, podendo atingir o trato gastrointestinal e coração, ocasionando as megavisceras (RASSI JR et al., 2010).

Aproximadamente 60 a 70% dos pacientes na fase crônica permanecem assintomáticos por um longo período, apresentando eletrocardiograma de repouso, radiografia do tórax, esôfago e cólon normais, com sorologia convencional reativa, caracterizando a forma indeterminada da doença. Cerca de 30-50% dos indivíduos podem desenvolver a forma cardíaca da doença, que pode causar desde a presença de anormalidades silenciosas até formas graves, como insuficiência cardíaca refratária ou morte súbita. A cardiopatia chagásica crônica é a maior causa de morbidade da doença de Chagas com prognóstico e evolução variáveis, podendo ocasionar o aumento global do coração relacionado à destruição direta do tecido muscular cardíaco, devido ao parasitismo pelo *T. cruzi*, fibrose e autoimunidade. Durante a fase crônica 5-15% dos pacientes podem evoluir para a forma digestiva da doença,

que pode acometer os órgãos do trato gastrointestinal, principalmente esôfago e cólon, devido lesões no sistema nervoso autônomo intramural, parasitismo tecidual e ação do sistema imune, levando ao aparecimento de megaesôfago e megacólon, respectivamente. As lesões digestivas predominam no esôfago e no cólon terminal, justamente nesses segmentos que trabalham conteúdos mais sólidos, envolvendo alterações motoras, anatômicas e de absorção (ANDRADE 2000; REZENDE & MOREIRA 2000). A forma cardiodigestiva ocorre em aproximadamente 2-15% dos pacientes na fase crônica e é caracterizada por ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as formas cardíaca e digestiva (CHAGAS & VILELA 1922; REZENDE et al., 1960; COSSIO et al., 1974; DIAS 1995; RASSI JR et al., 2010; DIAS et al., 2016). Enquanto as lesões digestivas no Rio Grande do Norte são prevalentes em 16% dos chagásicos crônicos (ANDRADE et al., 2015).

1.3 Patogenia do sistema digestivo na doença de Chagas

A forma digestiva é observada principalmente ao sul da bacia amazônica (Argentina, Brasil, Chile e Bolívia) e é menos frequente em outros países da América do Sul, América Central e México. As manifestações clínicas são descritas nas glândulas salivares, esôfago, cardíaca, estômago, intestino delgado, vesícula biliar, árvore biliar e cólon (MATSUDA et al., 2009; RASSI JR et al., 2010). Em exames post-mortem realizados em 1708 chagásicos crônicos indicaram 273 contendo “megas”, sendo o megacólon o mais frequente, seguido por megaesôfago, sendo megacólon e megaesôfago o terceiro achado mais comum (LOPES et al., 1989).

As alterações que ocorrem no trato digestivo durante a infecção pelo *T. cruzi* são principalmente devido à destruição de células nervosas do plexo entérico. Com base na técnica empregada por Köberle para contagem de neurônios e verificação das alterações patológicas no trato gastrointestinal de pacientes com a doença de Chagas, a redução neuronal foi observada e postulada como o principal mecanismo patológico da doença a redução de 50-90% de gânglios no plexo entérico (KÖBERLE 1963). Segundo Köberle (1968) para que haja formação de megacólon e megaesôfago é necessário que a denervação ultrapasse um nível crítico, específico para cada órgão, sendo necessário que ocorra no mínimo 85% e 50% de redução do número de neurônios do plexo mioentérico no esôfago e cólon, respectivamente. Os plexos intramurais, localizados na parede das vísceras, são os mais atingidos devido ao parasitismo em camadas musculares vizinhas (KÖBERLE 1963). Os músculos lisos são muito sensíveis a diferentes estímulos, a ausência de ação moderadora do plexo mioentérico torna a musculatura lisa hiperativa, contraindo-se desordenadamente, hipertrofiando e alterando a

motilidade de diversos segmentos do trato digestivo, principalmente esôfago e cólon (AMORIM & CORREA-NETO, 1934; KÖBERLE 1955; TAFFURI et al., 1971).

O trato gastrointestinal é um tubo oco, histologicamente constituído por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (**Figura 2**). A regulação das funções gastrointestinais, como secreção, motilidade, fluxo sanguíneo e controle imunológico é influenciada por uma rede complexa de neurônios, que compreende o sistema nervoso entérico (BARBARA et al., 1998). O trato gastrointestinal é controlado pelo sistema nervoso entérico e também por fibras extrínsecas simpáticas e parassimpáticas que influenciam indiretamente os músculos lisos, agindo sobre o plexo mioentérico. As fibras simpáticas têm por função contrair os esfíncteres e inibir a motilidade e a secreção, enquanto as fibras parassimpáticas têm função de relaxar os esfíncteres e estimular a motilidade e secreção (BARBARA et al., 1998; FURNESS, CLERC et al., 2000). A atividade funcional do trato gastrointestinal é regulada pela interação hormonal e neural (sistema nervoso autônomo simpático, parassimpático e peptidérgico). Os neurônios encontrados no plexo mioentérico normalmente são responsáveis por controlar a atividade peristáltica, enquanto os do plexo submucoso regulam a secreção e absorção (FURNESS & COSTA, 1987). As lesões por denervação do plexo nervoso acarretam hipersensibilidade dos órgãos exibindo resposta motora atípica (LOPES, CHAPADEIRO et al., 1987). As alterações anatomopatológicas do megacólon e megaesôfago incluem hipertrofia da camada muscular circular, intensa fibrose dos plexos mioentéricos, com intensas alterações morfológicas dos neurônios, desaparecimento ou acentuada diminuição podendo chegar até a sua morte, além de reações inflamatórias focais observadas na vizinhança do plexo mioentérico e na camada muscular do esôfago e do cólon (**Figura 2**) (KÖBERLE, 1960). Funcionalmente os processos patogênicos resultam em estase e discinesia que, por sua vez, agravam as lesões do sistema nervoso autônomo (SNA) (TAFURI & RASO, 1983). Como resultado da denervação intrínseca verifica-se, nesses segmentos, incoordenação motora, acalasia esfíncteriana, retenção de alimentos no esôfago e de fezes no reto, cólon e sigmóide, hipertrofia muscular e, finalmente dilatação, levando à formação do megaesôfago e do megacólon, que caracterizam a forma digestiva da doença de Chagas (REZENDE, 1959).

Estudos clínicos recentes confirmaram a redução neuronal em mais de 95% de pacientes com megacólon e megaesôfago e em animais infectados pelo *T. cruzi*, demonstrando que o alvo primário de injúria pela infecção no trato gastrointestinal são gânglios neuronais em ambos os sistemas nervoso, extrínseco (parassimpático) e intrínseco (plexo submucoso e mioentérico), reduzindo a atividade motora do órgão.

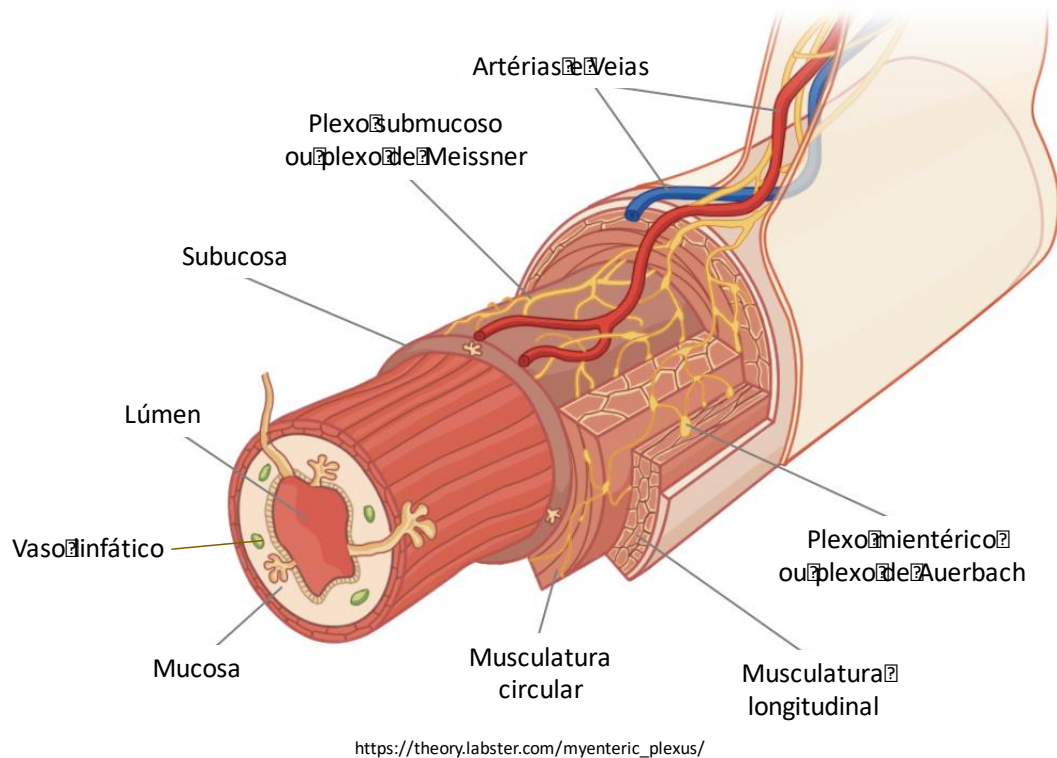


Figura 2 - Morfologia e alterações anatomopatológicas do c6lon e es6fago na doençã de Chagas. Dois plexos nervosos encontram-se no trato gastrointestinal, o plexo submucoso ou de Meissner, presente na camada submucosa, que regula o fluxo sanguíneo e a atividade das células epiteliais como a secreçã de muco. E o plexo mientérico ou de Auerbach, localizado entre a musculatura circular e a longitudinal, que é responsável pela motilidade intestinal. Na doençã de Chagas os dois sã afetados. A atividade do músculo liso do trato gastrointestinal é convertida em peristaltismo coordenado pelas células ganglionares do plexo de Auerbach. A perturbaçã no peristaltismo, que leva à falta de coordenaçã do movimento para frente em forma de onda, causa estagnaçã, retençã e dilataçã das vísceras ocas. A inflamaçã focal distribuída em diversos segmentos do es6fago e c6lon é o substrato para denervaçã. O megac6lon e megaes6fago chagásico incluem hipertrofia da camada muscular circular, intensa fibrose dos plexos mientéricos, com desaparecimento ou intensa diminuiçã dos neur6nios, reaç6es inflamat6rias focais sã observadas na vizinhança do plexo mientérico e na camada muscular do es6fago e do c6lon. É necessãrio que ocorra no m6nimo 85% e 50% de reduçã do n6mero de neur6nios do plexo mientérico no es6fago e c6lon, respectivamente (KOBELERLE, 1960, 1968).

No entanto, o mecanismo de perda neuronal nã estã completamente esclarecido e pode estã ocorrendo como resultado do parasitismo direto nos neur6nios e células de suporte, inflamaçã aguda periganglionar e reaç6es autoimunes (MENEGHELLI, 2004; CAETANO et al., 2006; IATORNO et al., 2007; MATSUDA et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2010). A anãlise de tecidos do es6fago de pacientes chagásicos que nã apresentam megaes6fago e dos pacientes com diferentes estãgios da forma digestiva demonstrou que o parasito pode estar presente em ambos os casos, assim outros fatores podem interferir no processo de g6nese das les6es do trato gastrointestinal (VAGO et al., 1996; VAGO et al., 2000; LAGES-SILVA et al., 2001; VAGO et al., 2003; LAGES-SILVA et al., 2006).

Os neurônios periféricos são predominantemente lesionados durante a fase aguda da doença de Chagas quando a parasitemia e o parasitismo tecidual são mais elevados, sendo o parasito encontrado com frequência no plexo mioentérico e submucoso, no interstício de gânglios simpáticos e parassimpáticos (LENZI et al., 1996; SILVEIRA et al., 2009). A avaliação de pacientes chagásicos com e sem megaesôfago demonstrou que a lesão neuronal está correlacionada com a presença de DNA do parasito no tecido. Nos pacientes sem megaesôfago e com redução neuronal foi identificado DNA do parasito no tecido associado ao processo inflamatório, sugerindo fortemente o papel da resposta imune e persistência parasitária no tecido durante o processo patogênico (SILVEIRA et al., 2005). A degeneração do sistema nervoso é dependente da resposta imune do hospedeiro e persistência de células inflamatórias como, macrófagos, células NK e linfócitos, que se correlacionam inversamente com o número de neurônios. O processo inflamatório persiste na fase crônica da doença (CAMPOS & TAFURI, 1973; ALIBERTI et al., 1996; ADAD et al., 2001).

Citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ e TNF- α , responsáveis pela ativação de macrófagos e produção de óxido nítrico (NO), radical com função efetora no controle intracelular da multiplicação pelo *T. cruzi*, contribuem para o dano neuronal. A produção excessiva desse agente oxidante compromete o tecido nervoso, podendo causar danos irreversíveis como necrose e degeneração axonal (GAZZINELLI et al., 1992; ALIBERTI et al., 1996). A produção desse radical é significativamente aumentada em pacientes com doença de Chagas e animais infectados, e vários estudos têm correlacionado a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e elevada produção de NO com os efeitos neurotóxicos da doença (GARCIA et al., 1999; PINTO et al., 2002; ARANTES et al., 2004).

Outro mecanismo que pode gerar danos no sistema nervoso entérico são autoanticorpos no soro de pacientes chagásicos contra várias estruturas do hospedeiro, como o próprio tecido nervoso (GOIN et al., 1997). Na década de 70, Ribeiro et al. (1979) já haviam demonstrado que 83% e 7% dos pacientes chagásicos apresentaram IgG e IgM contra neurônios do sistema nervoso central e periférico, respectivamente. As lesões anatomopatológicas de base consistem em denervação parassimpática intramural, sendo resultante de lesões inflamatórias crônicas, em particular no plexo mioentérico do SNA. Funcionalmente, os processos patogênicos resultam em estase e discinesia que, por sua vez, agravam as lesões do SNA (TAFURI & RASO, 1983). Desta forma, acredita-se que os mecanismos imunopatogênicos envolvidos na gênese das lesões de megacólon e megaesôfago chagásico, podem estar ocorrendo pela persistência parasitária, em conjunto com ação da

resposta imune do hospedeiro (DUTRA et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2002; GOMES et al., 2003).

A denervação ocorre de maneira irregular e em intensidade variável, em função de fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro, ainda não completamente esclarecidos (TEIXEIRA et al., 1980; SANTOS & HUDSON, 1981). Nosso grupo demonstrou aumento da expressão de TLR8 e IFN- β em células mononucleares do sangue periférico de pacientes que apresentam a forma digestiva e cardiodigestiva da doença, sugerindo que RNA bacteriano presente na microbiota do trato gastrointestinal poderia contribuir para o processo inflamatório e conseqüentemente o mecanismo de redução neuronal que conduz a formação do megacólon e megaesôfago (PEREIRA et al., 2018). Este resultado nos levou a perscrutar o papel do NOD2 (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2*) no desenvolvimento de alterações anatomopatológicas do sistema digestivo na doença de Chagas, devido o envolvimento dessa molécula na patologia de outras doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, como colite e doença de *Crohn*.

1.4 Resposta imune na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

O curso da infecção pelo *T. cruzi* no homem envolve uma interação dinâmica na relação do parasito com o hospedeiro englobando múltiplos fatores atuantes na patogenia da doença, dentre esses diversos fatores, podemos destacar os mecanismos imunológicos que controlam a infecção. Durante a evolução da infecção pelo *T. cruzi* as respostas imune inata e adaptativa coexistem, observando-se a produção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e quimiocinas, as quais são fatores importantes tanto para a patogenia quanto para a resistência a infecção pelo *T. cruzi* (DUTRA et al., 1994; TEIXEIRA, GAZZINELLI & SILVA, 2002; GOMES et al., 2003; GUEDES et al., 2012).

A ativação da resposta imune frente ao *T. cruzi* ocorre por meio do reconhecimento de padrões moleculares presentes no parasito por receptores da imunidade inata, os quais induzem a produção de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico, modulando a ativação da resposta imune adaptativa (KAYAMA & TAKEDA, 2010). Após o parasito ser reconhecido por diferentes receptores é fagocitado por macrófagos, levando a produção de citocinas inflamatórias como interleucina-12 (IL-12), que atua sobre células *natural killer* (NK), ativando a produção de mais IL-12 e IFN- γ . O IFN- γ produzido, juntamente com fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ativa a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando a síntese de óxido nítrico, o qual atua limitando a multiplicação intracelular do parasito (REIS et al., 1997). Por outro lado, citocinas como IL-10 e TGF- β inibem a iNOS, induzindo indiretamente, um aumento da replicação (SILVA, TWARDZIK & REED, 1991;

HOLSCHER et al., 1998). Estudos demonstraram o papel da enzima iNOS na resistência a infecção (GAZZINELLI et al., 1992), a partir da sua ativação por IFN- γ (SILVA et al., 1992; ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996), TNF- α (SILVA et al., 1995), IL-12 (ALIBERTI et al., 1996) e quimiocinas (MACHADO et al., 2000; ALIBERTI et al., 2001). Em contrapartida, a susceptibilidade está associada à produção de IL-10, TGF- β e IL-4, por meio da inibição da geração de nitritos pelos macrófagos (WIRTH & KIERSZENBAUM, 1985; ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HOLSCHER et al., 1998).

As citocinas produzidas durante a resposta imune inata conduzem a resposta imune adaptativa, estimulando a diferenciação de linfócitos T *naive* para o perfil T *helper* 1 (Th1) que possui o fator de transcrição T-bet, Th2 (GATA-3) (MARINHO et al., 2004), Th17 (ROR γ t) e T reguladores (Foxp3) (MARIANO et al., 2008; GUEDES et al., 2010). Os linfócitos Th1 CD4⁺ apresentam múltiplas funções na resistência ao *T. cruzi* e contribuem como fonte de IFN- γ para a ativação de macrófagos, e parecem atuar, também, na diferenciação e ativação de linfócitos T CD8⁺ (BRENER & GAZZINELLI, 1997). Os linfócitos T CD8⁺ possuem papel protetor durante a infecção pelo *T. cruzi*, visto que destroem células infectadas pelo parasito, entretanto são responsáveis pela citotoxicidade contra células do hospedeiro, ocasionando citólise e fibrose, com destruição da miofibrila cardíaca (TARLETON, 1991; TARLETON et al., 1994; CUNA & CUNA, 1995; BRENER & GAZZINELLI, 1997). Ambos são extremamente importantes na infecção chagásica e a ausência de um dos tipos celulares acarreta a instabilidade da infecção aguda, ocasionando morte em modelo experimental (MARIANO et al., 2008; PADILLA, BUSTAMANTE & TARLETON, 2008). Durante o curso da infecção pelo *T. cruzi*, a ativação de linfócitos B e produção de imunoglobulinas também é observada em humanos. Quatro isotipos de imunoglobulina G (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) são produzidos no homem sendo o controle na produção destas subclasses mediado por diferentes citocinas (KAWANO, NOMA & YATA, 1994). As imunoglobulinas exercem o papel de opsonização do parasito com consequente destruição pelo complemento, além de fagocitose por macrófagos (MOSMANN & COFFMAN, 1989), e são mecanismos relevantes no controle do parasitismo durante a fase crônica da infecção, sendo observada queda da parasitemia concomitante com o início da produção de anticorpos (KRETTLI, WEISZ-CARRINGTON & NUSSENZWEIG, 1979).

1.5 Receptores da imunidade inata e *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2* (NOD2)

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são responsáveis por reconhecer estruturas conservadas entre as espécies de microrganismos, denominados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), além de reconhecer moléculas endógenas liberadas após danos celulares, denominadas padrões moleculares associados a dano (DAMPs). Atualmente foram identificadas quatro famílias de PRRs que incluem proteínas transmembrana (receptores do tipo Toll - TLRs e lectinas do tipo C) e proteínas citoplasmáticas (receptores do tipo RIG - RLRs e receptores do tipo NOD - NLRs). Os PRRs são expressos em diversos tipos celulares como, macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Esses receptores variam quanto a sua localização celular, podendo estar presentes na membrana plasmática, endossomos, lisossomos e mesmo livre no citosol (**Tabela 1**). Com exceção de alguns NLRs, o reconhecimento de PAMPs e DAMPs por PRRs induz o aumento da transcrição de genes envolvidos nas respostas inflamatórias (TAKEUCHI & AKIRA 2010; RODRIGUES et al., 2012). A ativação de diferentes PRRs conduz a expressão de diferentes genes, e esses genes codificam citocinas pró-inflamatórias, interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β), quimiocinas e proteínas antimicrobianas. A resposta inflamatória é orquestrada por citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, as quais regulam morte celular de tecidos inflamados, modificação da permeabilidade endotelial vascular, recrutamento de células sanguíneas para tecidos inflamados e a produção de proteínas de fase aguda (TAKEUCHI & AKIRA, 2010; RODRIGUES, OLIVEIRA & BELLIO, 2012).

A família dos TLRs é a mais bem caracterizada, sendo responsáveis por detectar agentes patogênicos invasores fora da célula ou em endossomos e lisossomos intracelulares (AKIRA, UEMATSU & TAKEUCHI, 2006). Nove membros funcionais conservados da família foram identificados no homem e em camundongos (TLRs 1-9), entretanto um TLR é seletivamente expresso em humanos (TLR10), enquanto TLR11, TLR12 e TLR13 estão presentes apenas em camundongos (KAWAI & AKIRA, 2010). A **Tabela 1** sumariza os principais receptores da imunidade inata (TLRs e NLRs) e seus respectivos agonistas. Após o reconhecimento de PAMPs, os receptores do tipo *Toll* sofrem mudanças conformacionais, permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras essenciais em uma resposta efetiva. Essas vias de sinalização podem ser dependentes da molécula adaptadora MyD88 (*Myeloid differentiation primary-response-gene-88*) ou TRIF (*Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor protein inducing IFN beta*). A cascata dependente de TRIF está relacionada à indução de IFNs do tipo I, por meio da ativação de TLR3 e TLR4, com Myd88 envolvido, também, na

via de sinalização de TLR4, enquanto a sinalização dos outros TLRs ocorre, exclusivamente, via Myd88 (AOKI et al., 2012).

Tabela 1 - Principais receptores da imunidade inata (TLRs e NLRs) e padrões moleculares associados a patógenos que atuam como agonistas.

Receptores	Ligantes
TLR1	Triacyl lipopeptídeos (bactéria)
TLR2	GPI (protozoários); Peptidoglicanos, lipoproteína, lipopeptídeos, LPS atípico (bactéria); Envelope protéico (vírus); Zimosan, Fosfolipomanana (Fungos)
TLR3	dsRNA (vírus)
TLR4	GIPL (protozoários); LPS (bactéria); Manana, Glicoronoxymanana (fungos)
TLR5	Flagelina (bactéria)
TLR6	Diacyl lipopeptídeo (bactérias)
TLR7/TLR8	ssRNA, Moléculas sintéticas semelhante a imidazolina (vírus)
TLR9	CpG DNA (Protozoários, bactérias, vírus)
NOD1	Ácido <i>meso</i> -diaminopimélico (iE-DAP) (bactérias)
NOD2	Muramil-dipeptídeo -MDP (bactérias)

(CAMPOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; KOGA et al., 2006; UEMATSU & AKIRA 2006 (modificado); TAKEUCHI & AKIRA 2010; KAWAI & AKIRA 2010; CAETANO et al., 2011)

Muitas moléculas de *T. cruzi* têm sido identificadas como agonistas de TLRs, induzindo a secreção de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico em células da linhagem monocítica. Alguns dos PAMPs de *T. cruzi* que são descritos como agonistas de TLRs são: âncoras de glicosilfosfatidinositol (GPI), os quais são distribuídos na membrana da superfície celular do parasito e foram identificados como potentes ativadores de TLR2 (CAMPOS et al., 2001); outro membro da família do GPI, denominado de glicoinositolfosfolipídeo (GIPL), está presente na superfície da membrana de todas as formas do parasito e induz a ativação de NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*) via TLR4 (OLIVEIRA et al., 2004); e ainda, ácidos nucleicos do parasito (RNA e DNA) podem induzir a ativação de TLR7 e TLR9 (KOGA et al., 2006; CAETANO et al., 2011). A análise de animais deficientes de receptores do tipo *Toll* demonstrou que TLR2 (BAFICA et al., 2006), TLR4 (OLIVEIRA et al., 2010), TLR7 (CAETANO et al., 2011) e TLR9 (BARTHOLOMEU et al., 2008) desempenham papel na resistência à infecção pelo *T. cruzi* e, que pode haver sinergismo entre eles (BAFICA et al., 2006; CAETANO et al., 2011; RODRIGUES, OLIVEIRA & BELLIO, 2012). Dados recentes demonstraram que pacientes com a forma digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas apresentaram elevada expressão de TLR8 e de IFN- β , citocinas produzidas após sua ativação. Ademais, pacientes com as formas cardíaca e cardiodigestiva apresentam elevada expressão de RNAm de TLR2, IL-12 e TNF- α comparado aos pacientes com a forma indeterminada da doença (PEREIRA et al., 2018).

A família dos NLRs consiste em sensores citoplasmáticos compostos de um domínio central de oligomerização de nucleotídeos (NOD) e uma região C-terminal com repetições ricas em leucina, além de um domínio efetor N-terminal, constituído por um domínio pirina (PYD), um domínio recrutador de caspase (CARDs) ou por repetições de inibidores de baculovírus (BIRs). Após a detecção de PAMPs, os receptores NOD1 e NOD2, os quais apresentam CARDs, induzem a regulação positiva da transcrição de genes de citocinas próinflamatórias, a partir da ativação de NF- κ B e MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) pela ligação da proteína de interação com receptor 2 (RIP2) (INOHARA et al., 2005; PROELL et al., 2008). O receptor NOD1 (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1*) é expresso em muitos tipos de células e organismos, enquanto NOD2 parece ser mais restrito e tem sido descrito em células hematopoiéticas, células de *Paneth*, células intestinais, células do epitélio oral, do pulmão, e em baixos níveis nos linfócitos (FRANCHI et al., 2009; BISWAS et al., 2012). NOD1 reconhece peptídeoglicanos contendo ácido meso-diaminopimélico, encontrado em todas as bactérias gram-negativas e também em algumas gram-positivas, enquanto o NOD2 reconhece muramildipeptídeo (MDP) conservados em peptídeoglicano de todos os tipos de bactérias (OGURA et al., 2001a; McDONALD et al., 2005). Com reconhecimento do estímulo, NOD1 e NOD2 recrutam a quinase serina-treonina RICK, também denominada de proteína de interação com receptor 2 (RIP2), que se liga diretamente ao modulador essencial de NF- κ B e IKKB. Uma vez ativada, IKK fosforila o inibidor IKB, induzindo sua degradação no proteossoma, ativando NF- κ B e provocando a translocação até o núcleo celular levando a um aumento na expressão do gene alvo (FRANCHI et al., 2009).

Camundongos deficientes em NOD1 são mais susceptíveis à infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi*. Os macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos nocautes em NOD1 apresentaram redução de produtos dependentes da indução de NF- κ B e falharam em controlar a infecção na presença de IFN- γ . Além disso, camundongos deficientes em NOD1 foram altamente susceptíveis a infecção similar aos camundongos deficientes de Myd88 e iNOS. Entretanto, não foi observada diferença entre os níveis de citocinas produzidas no soro de camundongos deficientes em NOD1 e NOD2 e seus controles, indicando que NOD1 atua na resistência do hospedeiro de uma maneira independente da produção de citocinas. Por outro lado, os camundongos deficientes do receptor NOD2, não apresentaram alteração na susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, indicando que este receptor não é crucial para o controle do parasitismo durante a infecção experimental aguda (SILVA et al., 2010).

O receptor NOD2 tem sido correlacionado com doenças de caráter inflamatório crônico e intestinal, como doença de *Crohn* e colite (HISAMATSU et al., 2003). Localizado no cromossomo 16 o gene NOD2-CARD15 apresenta três principais mutações de base única que geram a produção truncada da proteína NOD2 e estão associadas à doença de *Crohn*. Os pesquisadores identificaram polimorfismos de um só nucleotídeo (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) R702W, G908R e L1007fs (HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001b ; JUDGE AND LICHTENSTEIN, 2002; LAKATOS et al., 2006; HOEFKENS et al 2013). No polimorfismo R702W o códon para Arginina (R) localizado na posição 702 do exon 11 foi mutado para o códon do Triptofano (W), no polimorfismo G908R houve substituição do códon de glicina (G) na posição 908 para arginina (R). A mutação L1007fs foi identificada no exon 11 da sequência gênica que codifica a proteína, com inserção de uma citosina no nucleotídeo 3020 (3020insC). Esta inserção provoca um deslocamento da sequência de leitura (*frameshift*) no segundo nucleotídeo do códon 1007 e uma substituição de Leucina (L) por Prolina (P) da décima Região Rica em Leucina (*Leucine-Rich Region*, LRR) da proteína, o que leva à formação de um códon para Prolina ao invés de Lisina, e imediata formação de um *stop* códon prematuro com consequente geração de uma proteína truncada. A proteína truncada contém 1007 ao invés de 1040 aminoácidos da proteína NOD2 selvagem (OGURA et al., 2001b). É possível que além do polimorfismo que gera a proteína NOD2 truncada poderia haver também alteração nos níveis de expressão da proteína.

O receptor NOD2 mantém a homeostase intestinal impedindo que bactérias da microbiota intestinal penetrem no epitélio intestinal (OGURA et al., 2001b; McDONALD et al., 2005). O NOD2 é altamente expresso nas células de *Paneth*, que se encontram presentes no fundo das criptas intestinais, quando bactérias rompem a barreira protetora formada por muco e IgA, são reconhecidas pelas células de *Paneth* via ligação a NOD2/MDP induzindo a produção de peptídeos antimicrobianos, como as α -defensinas (5 e 6), impedindo a penetração das bactérias. Pacientes com doença de *Crohn* tem expressão reduzida ou ausente de NOD2, uma lesão prévia no trato gastrointestinal como mecânica ou inflamatória, permite que bactérias penetrem no epitélio intestinal gerando lesões ao longo do trato intestinal (GANZ & LEHRER 1994; WEHKAMP et al., 2004). Pacientes com doença de *Crohn* e colite ulcerativa apresentam aumento na expressão de TLR8 e citocinas inflamatórias como, interferon do tipo I, IL-1 β , IL-6, IL12 e TNF- α (SARUTA et al., 2009; STEENHOLDT et al., 2009; SANCHEZ-MUNOZ et al., 2011; ORTIZ-FERNANDEZ et al., 2015), assim como descrito anteriormente para pacientes chagásicos com a forma digestiva da doença apresentam elevada expressão de TLR8 e IFN- β em células mononucleares do sangue periférico (PEREIRA et al.,

2018). Todavia, pacientes com ausência na expressão de NOD2 provavelmente apresentam microbiota intestinal com bactérias mais patogênicas, comparados àqueles com expressão normal deste receptor, sendo um fator a mais que predispõe a inflamação no trato intestinal (REHMAN et al., 2011). Animais deficientes de NOD2 apresentam maior quantidade de bactérias potencialmente patogênicas e maior suscetibilidade à colite experimental que animais selvagens (SOUZA et al., 2018). Tanto camundongos como pacientes deficientes da expressão de NOD2 apresentam microbiota intestinal com bactérias de fenótipo invasor na camada epitelial do trato digestivo gerando lesões mais frequentes que em animais ou pacientes com expressão normal deste receptor (BARNICH et al., 2007; SARTOR, 2008; PETNICKI-OCWIEJA et al., 2009; SOUZA et al., 2018). A análise da composição do microbioma e metaboloma de animais infectados pela cepa CL de *T. cruzi* demonstrou que a infecção modula o microbioma fecal devido a alterações funcionais no intestino e pode afetar a resposta inflamatória do hospedeiro. Estes dados sugerem a conexão entre o *T. cruzi*, a microbiota do hospedeiro, e sua influência no desenvolvimento de lesões do trato gastrointestinal (MCALL et al., 2018).

Portanto, nossa hipótese é que uma cepa de *T. cruzi* com tropismo pelo trato intestinal pode gerar a inflamação inicial e persistente promovendo a quebra da homeostase do sistema digestivo, em que a mucosa intestinal encontra-se protegida pela presença de muco e IgA impedindo a penetração de bactérias na camada epitelial do trato digestivo. Após ocorrer esta inflamação inicial pelo parasito, ocorrerá o acesso de bactérias e ou antígenos na lâmina própria em pacientes com expressão de NOD2 ausente ou reduzida. A ausência de NOD2 favorece o desenvolvimento de microbiota mais patogênica e facilita a colonização do trato intestinal pelas bactérias (SOUZA et al., 2018), amplificando a inflamação local iniciada pelo parasito (**Figura 3**). A inflamação é responsável pela denervação do trato intestinal, com geração de movimentos peristálticos descoordenados e hiperexcitabilidade, gerando hipertrofia e perda gradativa do peristaltismo (TAFURI et al., 1983). No decorrer do processo patológico começará o acúmulo de material no trato intestinal que iniciará a compressão das vísceras gerando também patologias isquêmicas que irão amplificar o processo de formação das “mega” síndromes (megaesôfago e megacolon) (TAFURI et al., 1983; ADAD et al., 2001; SILVEIRA et al., 2007). O estudo sobre o papel da molécula NOD2 no desenvolvimento de lesões do trato digestivo na doença de Chagas pode auxiliar o entendimento da história natural da doença associada ao desenvolvimento da forma crônica digestiva bem como dar subsidio para o desenvolvimento de tratamentos alternativos que visem à redução da morbidade e mortalidade associadas à forma digestiva da doença.

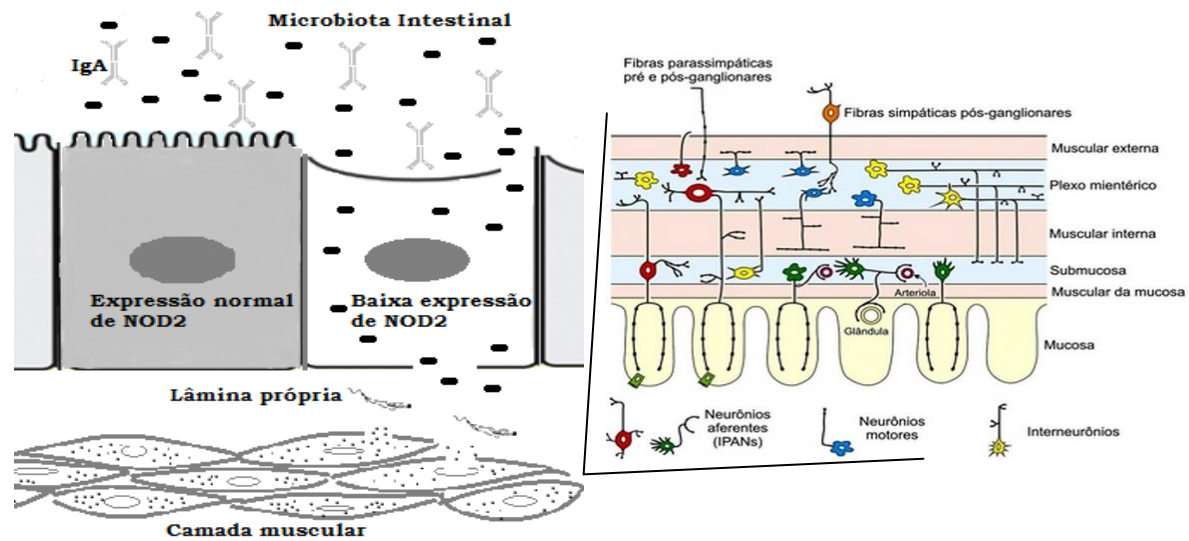


Figura 3 - Hipótese para gênese de lesões do trato gastrointestinal na forma digestiva da doença de Chagas. Pacientes com ausência ou baixa expressão de NOD2 apresentam microbiota intestinal com bactérias potencialmente patogênicas, a lesão inicial pelo *Trypanosoma cruzi* promove a quebra da homeostase intestinal permitindo que bactérias presentes na microbiota transpassem a barreira de muco e IgA, entrando em contato com a camada epitelial do trato digestivo induzindo ou potencializando a inflamação gerada pelo parasito, podendo ocorrer a penetração de bactérias na lâmina própria. A inflamação é responsável pela denervação do trato intestinal e perda gradativa do peristaltismo, com o decorrer do processo patológico começará a ocorrer acúmulo de material no trato intestinal que iniciará a compressão das vísceras gerando também patologias isquêmicas que irão amplificar o processo de formação do megaesôfago e megacólon (PEREIRA, 2013).

1.6 Justificativa

Dados recentes demonstraram que pacientes com as formas digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas expressaram níveis elevados de RNAm do receptor da imunidade inata TLR8 e de IFN do tipo I, citocina produzida após sua ativação. A elevada expressão de TLR8 e IFN do tipo I na doença inflamatória crônica intestinal e na doença de *Crohn* devido à desregulação da microbiota intestinal e acesso de bactérias patogênicas ao epitélio intestinal, onde ocorre reconhecimento de RNA bacteriano por TLR8 conduzindo a produção de IFN do tipo I, tem sido demonstrada contribuindo para o mecanismo de inflamação intestinal. Pacientes com doença de *Crohn* inicialmente apresentam a quebra da homeostase intestinal, permitindo a penetração de bactérias no epitélio intestinal, gerando inflamação ao longo do intestino. Ademais, a ausência de expressão de NOD2 permite o desenvolvimento da microbiota com elevado potencial patogênico no trato gastrointestinal. Em triagem da expressão de receptores da imunidade inata em pacientes chagásicos observamos a baixa expressão do receptor NOD2 em indivíduos que apresentavam a forma digestiva. Para que ocorra a formação dos megas (megacólon e megaesôfago) relacionados à forma digestiva da doença de Chagas, é necessário que ocorra denervação do plexo mioentérico no esôfago e

intestino. O substrato principal para denervação é a inflamação que parece ser influenciada principalmente por dois fatores, a cepa do parasito e a resposta imunológica que é influenciada pela genética do hospedeiro. Acreditamos que a ausência do receptor NOD2 pode contribuir para a geração de inflamação no trato gastrointestinal por ação de bactérias. Neste estudo, pretendemos avaliar a participação do receptor NOD2 na patogenia do sistema digestivo na doença de Chagas em pacientes. Para isso será utilizado o isolado RN25 de *T. cruzi* obtido de paciente com a forma digestiva da doença de Chagas e infecção experimental em camundongos deficientes de NOD2 para avaliação do desenvolvimento de alterações do trato gastrointestinal durante as fases aguda (19 dias) e crônica (12 meses) da infecção. Esta abordagem pode auxiliar no entendimento da patogenia do sistema digestivo na doença de Chagas, bem como dar suporte para futuras terapêuticas, oferecendo subsídio para impedir o desenvolvimento da forma clínica digestiva em pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do receptor NOD2 na patogenia das lesões do sistema digestivo da doença de Chagas humana e experimental.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar a participação da via de sinalização ativada por NOD2 no desenvolvimento das formas clínicas da doença de Chagas;
- ✓ Avaliar se a expressão diferencial da molécula NOD2 está correlacionada a graus distintos de dilatação do trato digestivo de pacientes;
- ✓ Investigar a função da molécula NOD2 no padrão de susceptibilidade ou resistência a à infecção experimental pelo *T. cruzi*;
- ✓ Verificar o papel do NOD2 no desenvolvimento de alterações do trato gastrointestinal (motilidade, inflamação e hipertrofia) dos camundongos infectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes chagásicos

Delineamento experimental

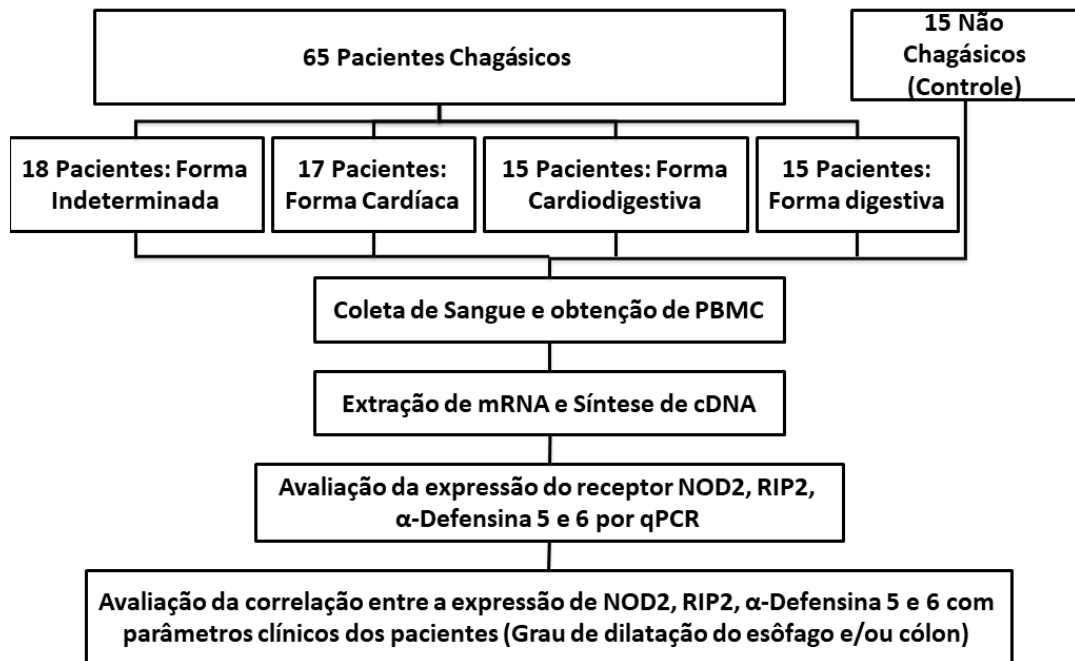


Figura 4 - Delineamento experimental para avaliação de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas

3.2 População de estudo

A população foi procedente de dez municípios da mesorregião oeste do estado do Rio Grande do Norte, sendo eles: Alexandria, Apodi, Caraúbas, Governador Dix-Sept Rosado, Ipanguaçu, Mossoró, Pendências, Rodolfo Fernandes, Serra do Mel e Severiano Melo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) protocolo N° 027.2011. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido estando em conformidade com a Resolução 466/12-CNS/MS (**Anexo 1**). A população selecionada foi constituída de 65 indivíduos na faixa etária de 18 a 79 anos de idade, e quinze indivíduos saudáveis com faixa etária semelhante, residentes da mesma área endêmica, utilizados como controles. Esses indivíduos foram submetidos à triagem sorológica para confirmação da infecção pelo *T. cruzi* por pelo menos dois métodos com princípios ativos distintos, hemaglutinação indireta, Chagatest® HAI *screening* A-V, ELISA recombinante (Wiener Lab®, Rosário, Argentina) e a reação de imunofluorescência indireta utilizando como antígeno as formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Y conforme a metodologia anteriormente descrita (CAMARGO 1966). As amostras com

resultados inconclusivos foram submetidas à sorologia confirmatória por *Western blot* (TESAcruzi®, BioMérieux, Brasil) (UMEZAWA et al., 1996). Os resultados foram considerados positivos quando a amostra foi reativa em pelo menos dois dos métodos selecionados, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde e do Consenso Brasileiro em doença de Chagas de 2015 (DIAS et al., 2016). A seguir, esses pacientes foram avaliados clinicamente por um membro do grupo (médico clínico cardiologista) e as formas clínicas caracterizadas empregando eletrocardiograma (ECG), ecocardiograma transtorácico bidimensional, radiografias do tórax e contrastadas de esôfago e cólon (enema opaco). Aqueles pacientes com alterações eletrocardiográficas e/ou ecocardiográficas sugestivas de cardiopatia chagásica foram avaliados pelo Holter 24h. Desse modo, os pacientes chagásicos que apresentaram eletrocardiograma, radiografias de tórax e contrastadas de esôfago e cólon normais foram categorizados com a forma clínica indeterminada (IND, n=18); aqueles que apresentaram anormalidades eletrocardiográficas sugestivas de comprometimento cardíaco, sintomáticos ou não, foram classificados com a forma cardíaca (CARD, n=17); os pacientes com imagens do esôfago e/ou cólon alteradas, com a forma digestiva (DIG, n=15) e, os pacientes com cardiomiopatia associada com megacólon e/ou megaesôfago com a forma cardiodigestiva (CARDIG, n=15). Os dados caracterizando a população chagásica podem ser visualizados na **Tabela 2**.

3.3. Coleta de sangue e obtenção de PBMC (*Peripheral blood mononuclear cell*)

Um total de 15mL de sangue periférico dos participantes foi coletado em tubos a vácuo contendo o anticoagulante EDTA (*Vacutainer®*, BD *Biosciences*, USA) para a separação das células mononucleares de sangue periférico (PBMC). O sangue foi lentamente aplicado em tubos cônicos de polipropileno com capacidade de 50mL (*Falcon*, BD *Biosciences*, USA) contendo uma solução Ficoll-Hypaque na proporção 2:1 (*Histopaque® 1.077-SigmaAldrich*, USA). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a $800 \times g$ por 30min e o anel de células formado foi transferido para um novo tubo de 15mL e submetido à nova centrifugação a $110 \times g$ durante 20min. Por fim, as células que passaram pelo procedimento de separação foram ressuspensas em 500µL de Trizol (*Invitrogen™*, *Carlsbad*, CA, USA), armazenadas a -20°C até o momento da extração de RNA e posterior síntese de cDNA.

Tabela 2 - Caracterização das formas clínicas dos pacientes com doença de Chagas procedentes de dez municípios do estado do Rio Grande do Norte.

Formas Clínicas*					
	Indeterminada	Cardíaca	Digestiva	Cardiodigestiva	
Sexo	M=10/18	M=11/17	M= 5/15	M= 10/15	Total: M=36/65 (60%)
	F= 8/18	F= 6/17	F=10/15	F= 5/15	F=29/65 (40%)
	18/65	17/65	15/65	15/65	65
	41,4± 10,7	49,7± 11,8	57,6± 8,9	65,9 ± 10,6	53,3± 10,2
Presença de megacólon	-	-	8/15	9/15	17/65
Presença de megaesôfago	-	-	3/15	3/15	6/65
Presença de megacólon e megaesôfago	-	-	3/15	4/15	7/65
Tamanho do sigmoide (cm)	4,41±0,57	4,5±0,71	7,72±4,6	7,96±2,87	6,14±1,95
Tamanho do reto (cm)	4,89±0,81	5,72±0,89	7,5±3,1	6,36±1,89	6,11±1,10

M: Masculino; F: Feminino. *Dados gentilmente cedidos pelo médico colaborador deste trabalho.

3.4 Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Delineamento experimental

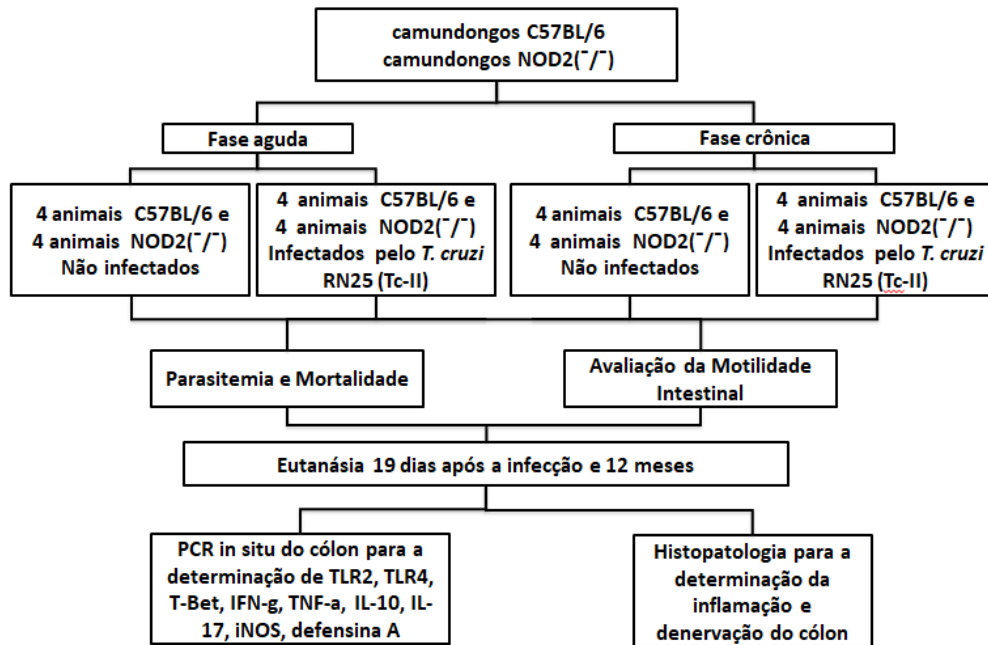


Figura 5 - Delineamento experimental utilizando animais C57BL/6 e NOD2^(-/-) infectados experimentalmente por via intraperitонеal com 10^3 formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*.

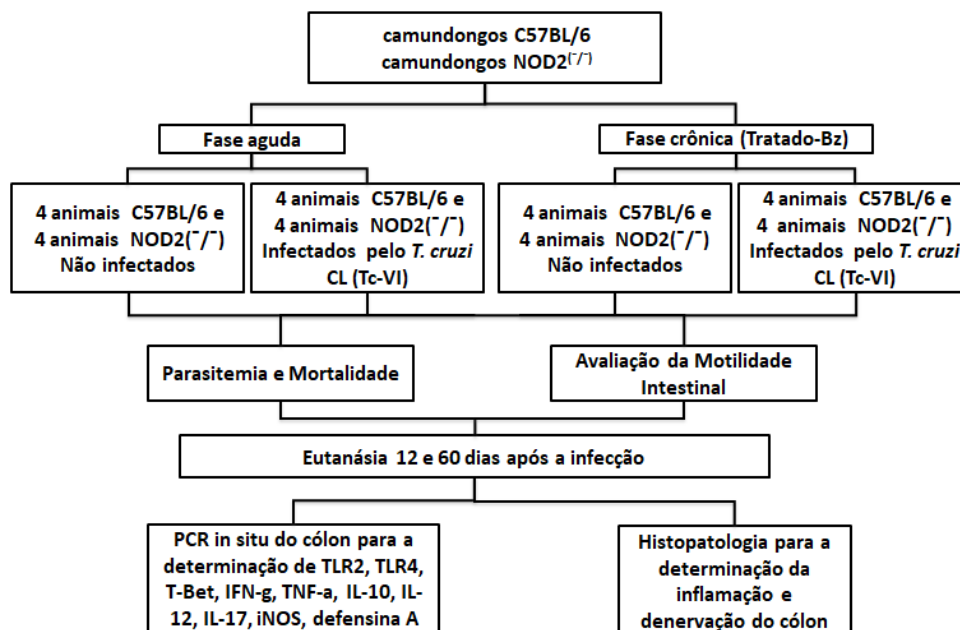


Figura 6 - Delineamento experimental utilizando animais C57BL/6 e NOD2^(-/-) infectados experimentalmente por via intraperitонеal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi*. Os animais avaliados 60 dias após a infecção foram tratados com dose única de 100mg/kg de benznidazol.

3.5 Isolados do *Trypanosoma cruzi*

A cepa CL (TcVI) isolada de *Triatoma infestans* (BRENER & CHIARI, 1963), promove a redução significativa no número de neurônios provocando a denervação do plexo mioentérico do cólon de camundongos experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* (SCHNEIDER et al. 2016), e o isolado RN25 (TcII) obtido por hemocultura de paciente com a forma digestiva da doença de Chagas procedente do Município de Serra Negra do Norte no estado do Rio Grande do Norte (SANTANA, 2017) foram utilizados para infecção experimental dos animais (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Características dos isolados de *Trypanosoma cruzi* utilizados no estudo.

Isolados de <i>T. cruzi</i>	Hospedeiro	Forma clínica	Município/estado	Idade	DTU	Referência
CL	<i>Triatoma infestans</i>	-	Encruzilhada/ RS	-	TcVI	BRENER & CHIARI (1963)
RN25	Humano	Digestiva	Serra Negra do Norte/RN	55	TcII	SANTANA (2017)

3.6 Animais e infecção experimental

Camundongos nocautes de NOD2, cedidos pelo biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP), e camundongos C57BL6 selvagens provenientes do Biotério do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/Recife/PE) foram utilizados para a infecção de fêmeas e machos com seis semanas de idade e peso de 20-25g. Os animais foram mantidos em estante contendo microisoladores (*Scienlabor*®), confeccionados em policarbonato transparente (dimensões 1500 × 1910 × 440mm), tampados com suporte aramado com depressão central para deposição da ração e bebedouro de 350mL com sistema de filtro G3 e Hepa. Água e ração disponíveis “*ad libitum*”, ração e maravalha autoclavadas e trocadas duas vezes por semana. Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) ou 1×10^3 tripomastigotas do isolado RN25. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), protocolo N° 23/2015 (**Anexo 2**).

3.7 Parasitemia e sobrevivência

A parasitemia dos animais foi observada diariamente até 30 e 60 dias após a infecção, ou morte dos animais. O número de tripomastigotas foi determinado pelo método descrito por Pizzi e Prager, modificado por Brener (1962). Foram coletados 5µL de sangue da ponta da

cauda do animal e a contagem realizada ao microscópio óptico (400×), utilizando lâmina-lamínula (22 × 22mm) em 50 campos aleatórios. A mortalidade dos animais foi avaliada diariamente para a determinação da curva de sobrevivência

3.8 Avaliação da motilidade intestinal dos animais

A motilidade intestinal dos animais foi analisada antes, com 15, 30, 90 e 180 dias após a infecção. Três horas após a privação de alimento, 0,3mL de suspensão aquosa a 5% de carvão em água a 10% foi administrado via oral a cada animal por gavagem. Os animais foram observados em intervalos de 5min até as fezes com carvão serem eliminadas (tempo máximo de observação 200min). O carvão é observado nas fezes utilizando luz comum ou ao microscópio para facilitar a identificação de pontos pretos (MARONA & LUCCHESI 2004; OLIVEIRA et al., 2007). Os resultados foram calculados baseados no tempo de evacuação e expressos como média ± desvio padrão.

Os animais infectados com 10^3 formas tripomastigotas do isolado RN25 e 5×10^4 tripomastigotas da cepa CL (TcVI) foram eutanasiados no 19º e 12º dia após a infecção, respectivamente, para avaliação na fase aguda. O grupo de camundongos avaliado durante a fase crônica da infecção infectado com a cepa CL foi eutanasiado com 60 dias após a infecção e os infectados com o isolado RN25 com 12 meses após a infecção. Estes animais receberam dose única de benznidazol (100mg/kg) (Rochagan®, Roche) para evitar a mortalidade e permitir a fase crônica da infecção, segundo modelo descrito na literatura (CAMPOS et al., 2017). Previamente a eutanásia o anestésico 2-2-2 tribromo-etanol a 3% em PBS foi utilizado, seguindo-se a eutanásia por meio de deslocamento cervical. O intestino dos animais foi removido e realizada a limpeza com solução salina tamponada pH 7,2 (PBS) e seccionado para a obtenção de tecido e análise histopatológica e, extração de RNA.

3.9 Análise histológica por Hematoxilina e Eosina (HE)

No íleo, jejuno e cólon dos animais foram realizados cortes e em seguida estendidos com a serosa em contato com o papel filtro para a remoção do conteúdo intestinal sem causar dano à mucosa, logo após, embebido em solução *Bouin* com 2% de ácido acético por 10min para pré-fixação. A peça foi enrolada em hélice formando “rolinhos”, em seguida amarrada com linha, adaptação da técnica exposta por Calvert, Atsuka & Salchithanandam (1989) e fixado em formol PBS por 24h, com troca de formol e desidratação em álcool etílico, sucessivamente em concentrações crescentes, até o álcool absoluto. Após a desidratação foi realizada a diafanização com xilol e impregnação com parafina, inclusão e moldagem do bloco de parafina. Os cortes foram realizados no micrótomo com cerca de 4µm e montados

sobre lâmina de vidro liso com área fosca, devidamente identificada. Após a montagem da lâmina os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise semi-quantitativa para determinação de inflamação e parasitismo tecidual foi realizada em colaboração com a Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, Departamento de Patologia, ICB/UFMG. As lâminas foram fotografadas utilizando o microscópio óptico de luz direta Olympus BX 51 equipado com o *software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MO, USA)* e luz de fluorescência com os filtros FITC, DAPI e TRITC.

3.10 Morfometria do Cólon e Jejunó

As imagens obtidas por microscópio óptico das lâminas coradas por HE foram capturadas com resolução de 1392×1040 pixels e transferidas via câmara de vídeo colorida *Cool SNAP-Proof Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA)* para um sistema de vídeo acoplado a computador por meio do programa *Image-Pro Express* versão 4.0 para *Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA)*. As imagens foram analisadas no programa KS300 (*Zeiss, Jena, Germany*) no laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral, ICB/UFMG. Microscopicamente foi avaliado o parâmetro espessura da camada muscular própria do jejunó e do cólon (μm) (calculada a partir de três medidas em cada foto, totalizando a análise de 15 fotos por animal).

3. 11 Extração de RNAm e síntese do cDNA em pacientes e animais

O RNAm foi extraído de células mononucleares do sangue periférico de cada paciente e do cólon de camundongos por meio do *kit Total RNA Isolation System (Catalog Z3105, Promega, USA)*. As células mononucleares do sangue periférico e amostras trituradas do cólon obtidas anteriormente foram ressuspensas em $500\mu\text{L}$ de Trizol (*Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, USA*) e adicionados $200\mu\text{L}$ de clorofórmio (*Sigma-Aldrich*). As amostras foram homogeneizadas em agitador vortex durante 30s e incubadas por 15min a temperatura ambiente (TA). Em seguida, os tubos foram centrifugados a $12.000 \times g$ por 15min a 4°C . A fase aquosa de cada amostra, contendo o RNA, foi cuidadosamente transferida para novo tubo estéril, seguida da adição de $200\mu\text{L}$ de etanol 95%. Essa mistura foi transferida para uma coluna acoplada a um tubo coletor, ambos fornecidos no *kit* e, em seguida, os tubos foram centrifugados a $12.000 \times g$ por 2min a 4°C (as etapas posteriores de centrifugação seguem os mesmos parâmetros) e, o líquido presente no tubo coletor foi descartado. Posteriormente $400\mu\text{L}$ de solução de lavagem (*RNA Wash Solution*) foram adicionados e, em seguida, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado, seguido da adição de $50\mu\text{L}$ de solução de DNase I (preparada imediatamente antes de ser

utilizada, pela adição de 40µL de Tampão Amarelo, 5µL de MnCl₂ 0,09M e 5µL de DNase I fornecidos no *kit*) com a finalidade de digerir o DNA genômico presente nas amostras. Após essa adição, as colunas foram incubadas por 15min a TA, seguida da adição de 200µL de solução de parada (*DNase Stop Solution*) e posterior centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as etapas de lavagem da coluna foram realizadas, com 400µL e 250µL de solução, respectivamente, seguidas de centrifugação. A coluna foi transferida para outro tubo estéril e 20µL de água livre de RNase foram adicionados, fornecida no *kit*. Por último, uma nova centrifugação foi realizada e a coluna foi descartada. O RNA purificado foi armazenado a -20°C. Uma alíquota de 5µL foi utilizada para determinação da concentração de RNA/µL nas amostras e determinada em espectrofotômetro (*Biomate 3 spectrophotometer Thermospectronic-Rochester, NY, USA*). Para a síntese do cDNA a partir da fita de RNA total foi utilizado o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA)* e o termociclador convencional (*MJ Research PTC-150 MiniCycler*). Os ciclos da reação foram de 10min a 25° C, 120min a 37°C, 5min a 85°C e ∞ a 4°C. A síntese de cDNA a partir da fita de RNA total foi realizada por meio do *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Catalog 4368813, Applied Biosystems, USA)*, utilizando termociclador convencional (*MJ Research PTC-150 MiniCycler*). Os ciclos da reação foram de 10min a 25°C, 120min a 37°C, 5min a 85°C e infinito a 4°C. A preparação da mistura foi realizada adicionando 2µL de solução tampão 10X, 0,8µL de nucleotídeos trifosfatos contendo desoxirribose (dNTPs) 25X, 1µL da enzima (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*), 2µL de oligonucleotídeos (oligo dT) 10X e 4,2µL de água livre de RNase, totalizando 10µL da mistura, os quais foram adicionados a 10µL de cada amostra de RNA extraído.

3.12 PCR quantitativa (qPCR) em pacientes e animais

A análise da expressão quantitativa de genes foi realizada por meio de reações de qPCR utilizando o sistema SYBR Green® em termociclador 7500 *Fast Real time (Applied Biosystems, Warrington, USA)*. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (*MicroAmp®, Applied Biosystems, USA*) e, para cada gene alvo foi preparado um *Master mix* composto pelos iniciadores direto e reverso, *FAST SYBR® Green (Applied Biosystems, USA)* e água Mili-Q estéril para PCR. Os iniciadores específicos para humanos (NOD2, RIP2, α-defensina 5 e α-defensina 6) e camundongos (TLR2, TLR4, IL-10, IL-17, T-bet, TNF-α, IFN-γ, iNOS, defensina-A) foram utilizados e estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Sequências dos iniciadores específicos utilizados na reação de qPCR.

Iniciadores	Direto e Reverso	Temperatura
Hu- β -actina ¹	TGACTCAGGATTTAAAAACTGGAA CACATTGTGAACTTTGGG	56,5°C
NOD2 ¹	GCCACGGTGAAAGCGAAT GGAAGCGAGACTGAGCAGACA	59,6
RIP2 ¹	TGCCACCTGAAAACCT-ATGAACCT ACACTTCCCATGTGATAACTGCAT	58,4
α -Defensina 5 ¹	GCCATCCTTGCTGCCATT GCTTCTGGGTTGTAGCCTCATC	59,6
α -Defensina 6 ¹	CCACTCCAAGCTGAGGAT CTCTGCAAAGGAGACGGC	58,4
GAPDH ²	TGCAGTGGCAAAGTGGAGAT CGTGAGTGGAGTCATACTGGAA	58,8
TLR2 ²	CGAGTGGTGCAAGTACG GGTAGGTCTTGGTGTTCATTATC	57,7
TLR4 ²	CCTCTGCCTTCACTACAGAGACTTT GGATCATTTCCGATAAGGCT	60,9
IL-10 ²	TGGACAACATACTGCTAACC GGATCATTTCCGATAAGGCT	55,7
IL-17 ²	AGTTTGGGACCCCTTTACAC TCTCATCCAGCAAGAGATCC	57,8
T-bet ²	CCCACAAGCCATTACAGGATG TATAAGCGGTTCCCTGGCATG	59,9
TNF- α ²	TGTGCTCAGAGCTTTCAACAA CTTGATGGTGGTGCATGAGA	56,9
IFN- γ ²	GCATCTTGGCTTTGCAGCT CCTTTTTCGCCTTGCTGTTG	57,6
iNOS ²	CGAAACGCTTCACTTCCAA TGAGCCTATATTGCTGTGGCT	56,7
Defensina A ²	GGTGATCAGCATACCCAGCATCAGT AAGAGAAAACCTACTGAGGAGCAGC	57,5

¹Iniciador específico para o humano, ² Iniciador específico para camundongo.

Esses iniciadores foram sintetizados com auxílio de *software* apropriado (*Primer Express, Applied Biosystems, USA*). O cDNA (2,5ng/reação) sintetizados a partir do RNA mensageiro e oligonucleotídeos específicos (1-2 μ g/reação) foram utilizados juntamente com os tampões da reação contendo 5 μ L de SYBR® *Green*, 0,7 μ L de cada iniciador (direto e reverso), 1,6 μ L de água e 2 μ L do cDNA. As condições das reações foram 2min a 50°C, 10min a 95°C, e 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 56°C. Um ciclo final de 20min com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação.

As condições da PCR para cada iniciador utilizado foram padronizadas de acordo com a concentração, temperatura de anelamento, ausência de formação de dímeros (determinada pela curva de dissociação do produto gerado pela qPCR), eficiência de amplificação dos genes alvo e gene constitutivo. A determinação dos níveis de expressão dos genes alvo foi realizada por meio da normalização das amostras quanto à expressão constitutiva de β -actina ou GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase). Após a normalização dos resultados baseados na expressão do gene constitutivo foi verificada a análise da expressão dos receptores, molécula adaptadora, citocinas e defensinas estudadas com o cálculo baseado na fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ utilizando o programa *Microsoft Excel* (2007). O equipamento utilizado para execução das reações e fornecimento dos resultados foi o 7500 *Software V 2.0.5*, 7500 *Fast Real time* (*Applied Biosystems, USA*).

3.13 Análise estatística

As análises foram realizadas empregando o programa estatístico *Instat* e o *software PRISM® 5.0* (*GraphPad, San Diego, CA, USA*). Para a verificação da distribuição normal dos dados foram empregados os testes *Agostino-Pearson*, *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*. Nas amostras com distribuição normal foram realizados os testes ANOVA e *Tukey-Kramer* para verificação da diferença entre os grupos, em amostras com distribuição não paramétrica foi utilizado o teste de *Kruskall-Wallis* e *Dunns*. As correlações de parâmetros analisados nos pacientes foram determinadas pelo teste de *Spearman*. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p for menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da resposta imune inata em pacientes chagásicos

Inicialmente foi avaliada a expressão dos receptores da imunidade inata NOD1, NOD2 e de sua molécula adaptadora RIP2, com intuito de verificar se estas moléculas estariam correlacionadas à manifestação da forma digestiva da doença de Chagas. Pacientes chagásicos com as formas clínicas indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva da doença apresentaram expressão similar de RNAm de NOD1 (**Figura 7A**) em células mononucleares do sangue periférico. Por outro lado, pacientes com as formas digestiva e cardiodigestiva da doença apresentaram expressão ausente ou reduzida de RNAm de NOD2 (**Figura 7B**), quando comparados aqueles com a forma indeterminada. Entretanto, pacientes com as formas digestiva e cardiodigestiva apresentaram elevada expressão de RNAm de RIP2 comparados aos pacientes com formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas (**Figura 7C**). Ainda,

foi observada correlação negativa entre a expressão de RNAm de NOD2 e o grau de dilatação do esôfago ($R = -0,7978$; $p = 0,0044$) (**Figura 8A**), a dimensão do sigmoide ($R = -0,6109$; $p = 0,0177$) (**Figura 8B**) e com a dimensão do reto ($R = -0,6365$; $p = 0,0166$) (**Figura 8C**).

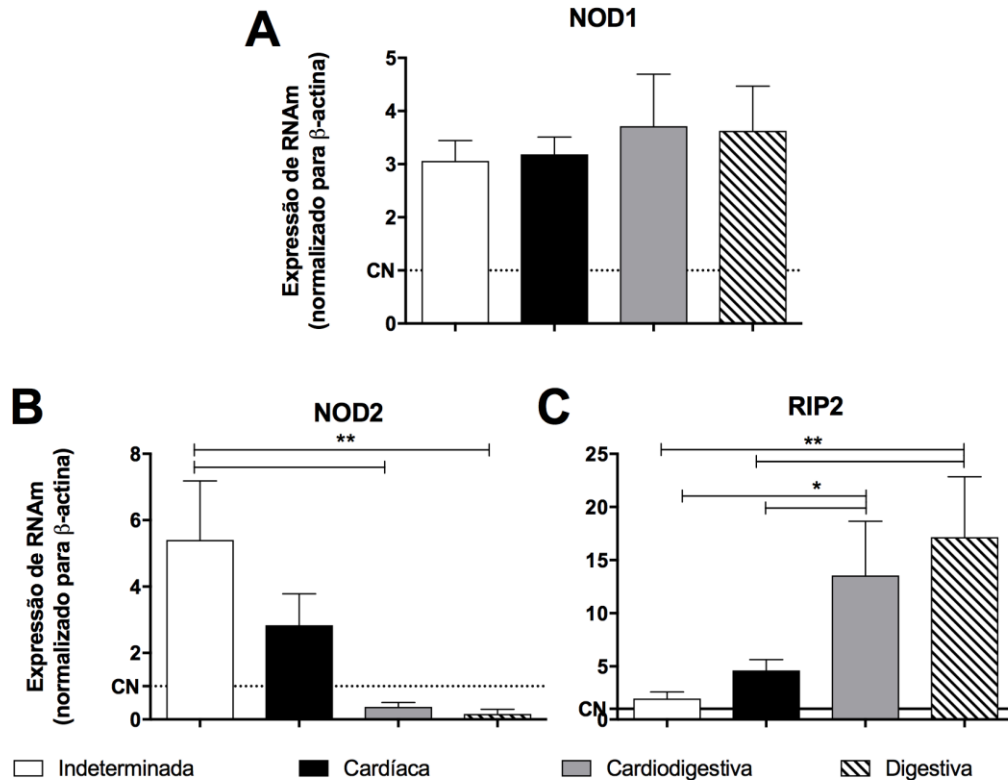


Figura 7 - Pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas apresentam ausência ou expressão reduzida de NOD2. Expressão de RNAm de NOD1 (**A**), NOD2 (**B**) e RIP2 (**C**) determinadas por qPCR a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas: indeterminada ($n=18$), cardíaca ($n=17$), digestiva ($n=15$) e cardiodigestiva ($n=15$). Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm o desvio padrão (DP). CN: Controle negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica) ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Posteriormente foi analisada a expressão de defensinas, moléculas que podem ter sua produção induzida como mecanismo para proteção do trato gastrointestinal contra a ação de bactérias após a quebra da homeostase intestinal. Pacientes com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas apresentaram expressão semelhante de RNAm de α -defensina 5 (**Figura 9A**). Entretanto, pacientes com a forma digestiva apresentaram elevada expressão de RNAm de α -defensina 6 (**Figura 9B**), quando comparados aos pacientes com a forma indeterminada.

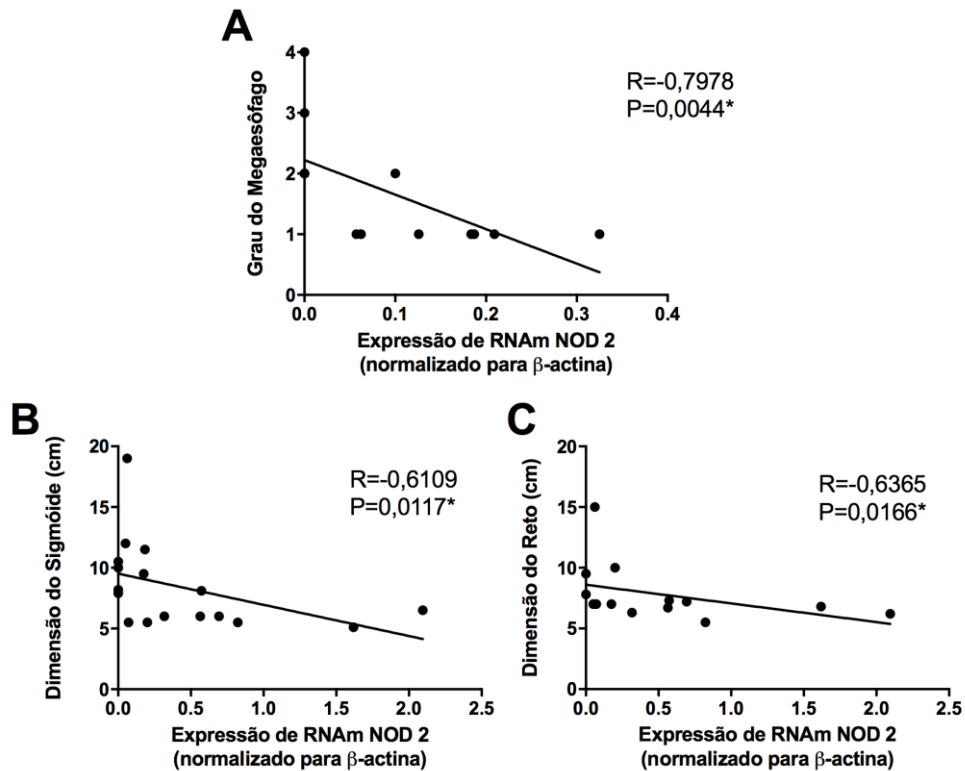


Figura 8 - A dilatação do esôfago, sigmóide e reto é inversamente correlacionada a expressão de RNAm de NOD2. Correlação entre a expressão de RNAm de NOD2, determinada por qPCR, com o grau de dilatação do megaesôfago (A), a dimensão do sigmóide (B) e com a dimensão do reto (C) em pacientes com as formas digestiva (n=15) e cardiodigestiva (n=15) da doença de Chagas crônica. * $p<0,05$.

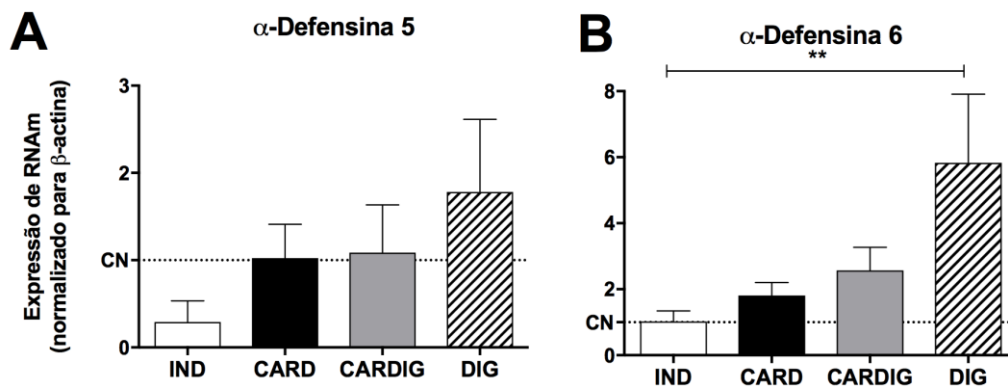


Figura 9 - Pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas apresentam elevada expressão de α -defensina 6. Expressão de RNAm de α -defensina 5 (A) e α -defensina 6 (B) determinadas por qPCR a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas: indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=15) e cardiodigestiva (n=15) da doença. Os dados são representativos de três experimentos independentes e, expressos em média \pm DP. CN: Controle negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica) ** $p<0,01$.

4.2 Infecção experimental com 10^3 tripomastigotas do isolado RN-25 de *T. cruzi*

Com a finalidade de avaliar o papel da molécula NOD2 no desenvolvimento de lesões do trato gastrointestinal durante a infecção pelo *T. cruzi*, camundongos C57BL/6 e NOD2^(-/-) machos e fêmeas foram infectados com 1×10^3 tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (obtido de paciente portador da forma digestiva da doença) e inicialmente determinada a susceptibilidade a infecção. Camundongos NOD2^(-/-) machos e fêmeas apresentaram parasitemia mais elevada que animais C57BL/6 entre o 21º e 30º dias após infecção (**Figura 10A e B**). Entretanto, a sobrevivência foi semelhante entre animais nocautes de NOD2 e C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi*, independente do sexo (**Figura 10C e D**).

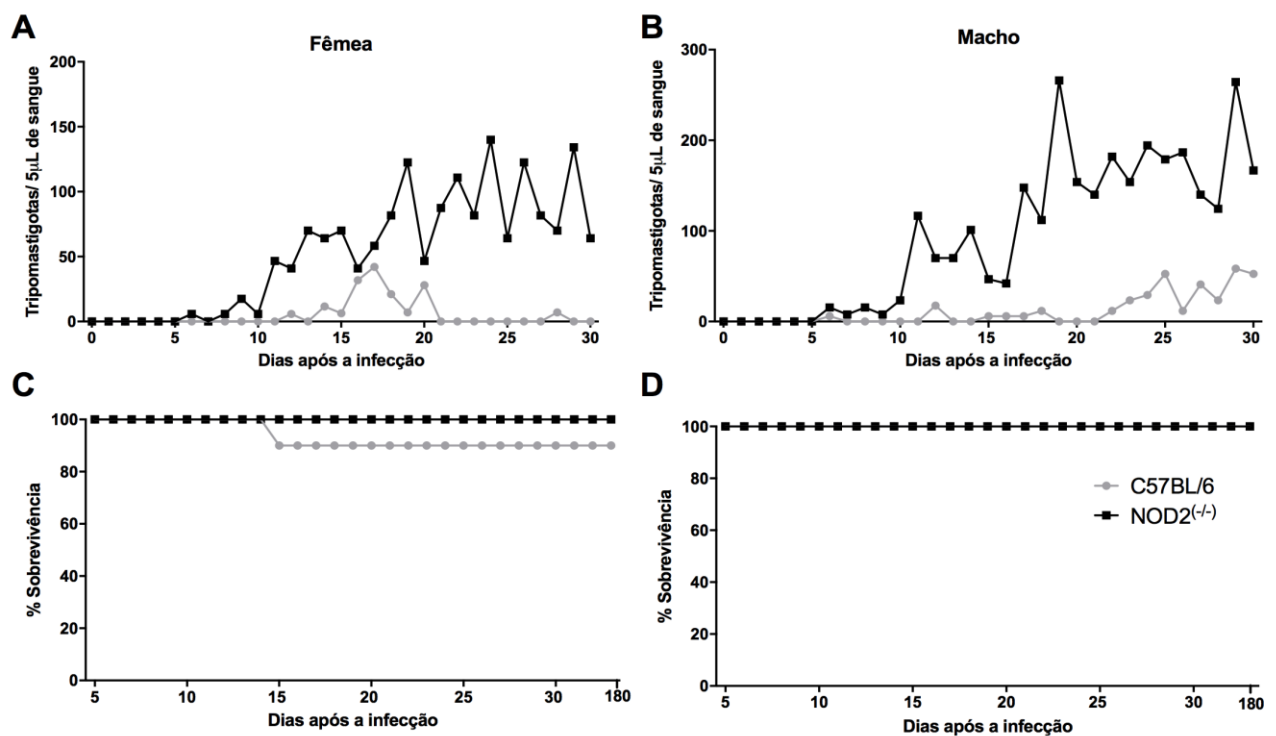


Figura 10 - Camundongos NOD2^(-/-) apresentam parasitemia mais elevada e sobrevivência semelhante a camundongos C57BL/6. Curvas de parasitemia (A e B) e sobrevivência (C e D) de camundongos C57BL/6 e NOD2^(-/-) fêmeas e machos infectados por via intraperitoneal com 10^3 formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (Tc-II) de *Trypanosoma cruzi*.

A influência da infecção pelo *T. cruzi* na motilidade gastrointestinal de camundongos NOD2^(-/-) e C57BL/6 machos e fêmeas foi estudada com o isolado RN25, proveniente de paciente com a forma digestiva da infecção. Camundongos NOD2^(-/-) fêmeas apresentaram diminuição da motilidade intestinal 15 e 180 dias após a infecção, quando comparados aos animais C57BL/6 (**Figura 11A**). Entretanto, não foi observada alteração na motilidade

gastrointestinal de camundongos machos NOD2^(-/-) e C57BL/6 experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* (Figura 11B).

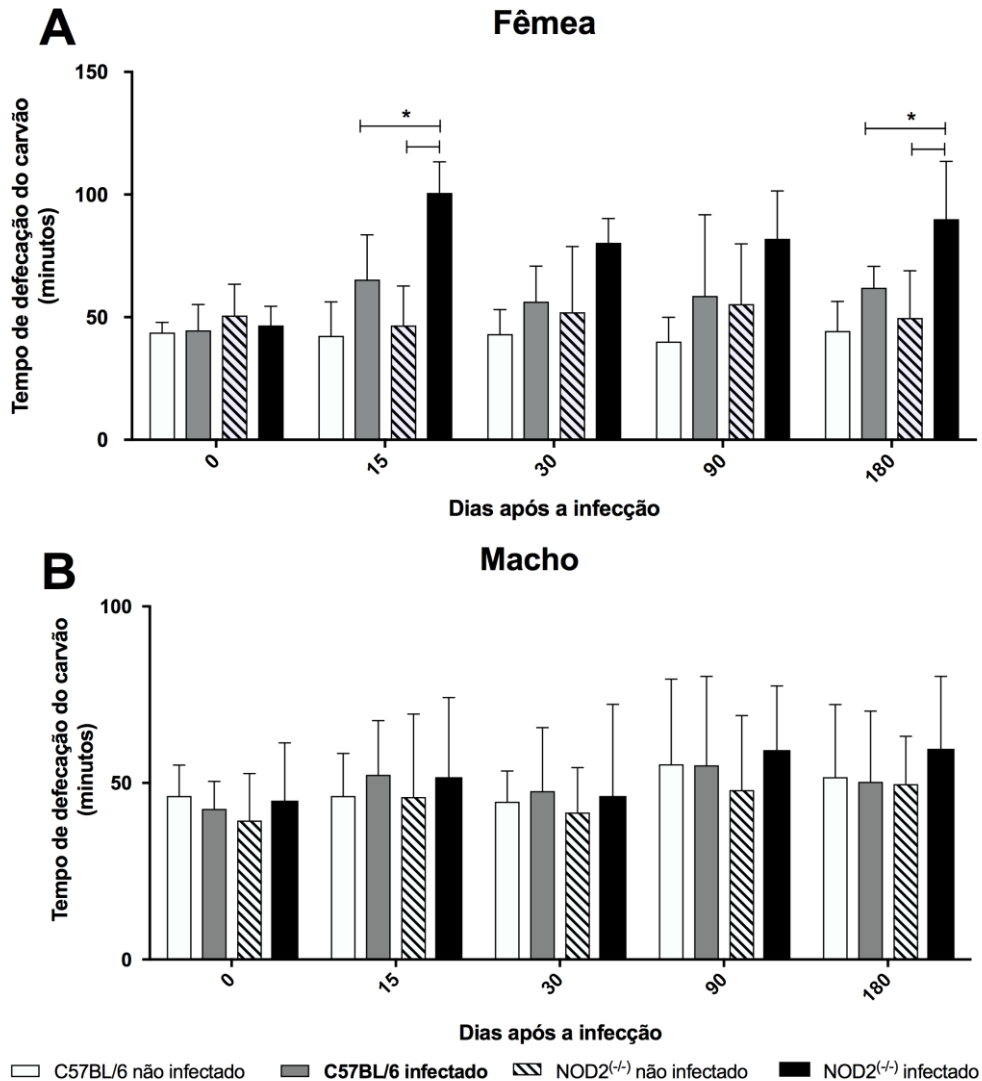


Figura 11 - Camundongos NOD2^(-/-) infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentam redução da motilidade intestinal. Avaliação da motilidade gastrointestinal pelo tempo médio de eliminação de carvão ativado em camundongos C57BL/6 e NOD2^(-/-) fêmeas (A) e machos (B) infectados por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*.

Posteriormente, a análise histopatológica para avaliação de inflamação e hipertrofia do trato gastrointestinal foi realizada pela análise semiquantitativa em camundongos fêmea, já que apresentaram alterações na motilidade intestinal quando infectadas pelo *T. cruzi*. A análise histopatológica dos animais fêmea infectados com 10³ tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 e eutanasiados no 19º dia após infecção mostrou discretas lesões inflamatórias (Figura 12). O intestino delgado apresentou poucos focos visíveis de infiltrado inflamatório na parede ou serosa do órgão. No cólon dos animais NOD2^(-/-) há presença de focos

inflamatórios de localização subserosa ou intramusculares visíveis (**Figura 12F e H**). Os animais C57BL/6 também apresentaram infiltrados inflamatórios, embora um pouco mais discreto (**Figura 12B e D**). Em geral foi observada lesão inflamatória de grau discreto e não acompanhada de grande área de necrose da parede ou infiltrado próximo ou associado aos gânglios mionterícos. Os animais não infectados não apresentaram lesões ou processo inflamatório. (**Figura 12A, C, E e G**).

A avaliação de fase crônica (12 meses) utilizando a infecção com 10^3 tripomastigotas do isolado RN-25 revelou inflamação focal intensa no colón dos animais NOD2^(-/-) (**Figura 13E, F, G, H**) quando comparado a camundongos C57BL/6 (**Figura 13A, B, C, D**). No intestino, o jejuno foi mais afetado com intensa inflamação nos animais NOD2^(-/-) (**Figura 14C e D**), comparado aos camundongos C57BL/6 (**Figura 14A e B**). O infiltrado inflamatório apresenta predomínio de células mononucleares, atingindo toda a espessura das camadas musculares, por vezes formando cordões celulares entre as camadas musculares e ofuscando os elementos ganglionares do sistema nervoso entérico. O íleo dos animais NOD2^(-/-) também apresentou inflamação focal mais intensa que camundongos C57BL/6 (**Figura 15 C e D**), quando comparado a camundongos C57BL/6 (**Figura 15A e B**).

Posteriormente foi realizada medição da parede do cólon e jejuno dos camundongos NOD2^(-/-) e C57BL/6 infectados pelo isolado RN25 do *T. cruzi* para verificar a hipertrofia dos órgãos. O cólon dos animais NOD2^(-/-) infectados apresentou hipertrofia da camada muscular, esta alteração não foi observada em animais C57BL/6 infectados (**Figura 16A**). Camundongos C57BL/6 infectados e não infectados apresentaram tamanho similar da musculatura do cólon (**Figura 16A**). Entretanto, camundongos NOD2^(-/-) não infectados, apresentaram aumento discreto do colón quando comparado a animais C57BL/6 infectados e não infectados (**Figura 16A**). A infecção de camundongos fêmeas com o isolado RN25 revelou aumento da parede do jejuno de camundongos NOD2^(-/-) e C57BL/6 infectados, quando comparados aos animais não infectados (**Figura 16B**). Entretanto, a análise do jejuno demonstrou aumento intenso da parede do órgão de animais NOD2^(-/-) infectados, quando comparado aos camundongos C57BL/6 infectados (**Figura 16B**).

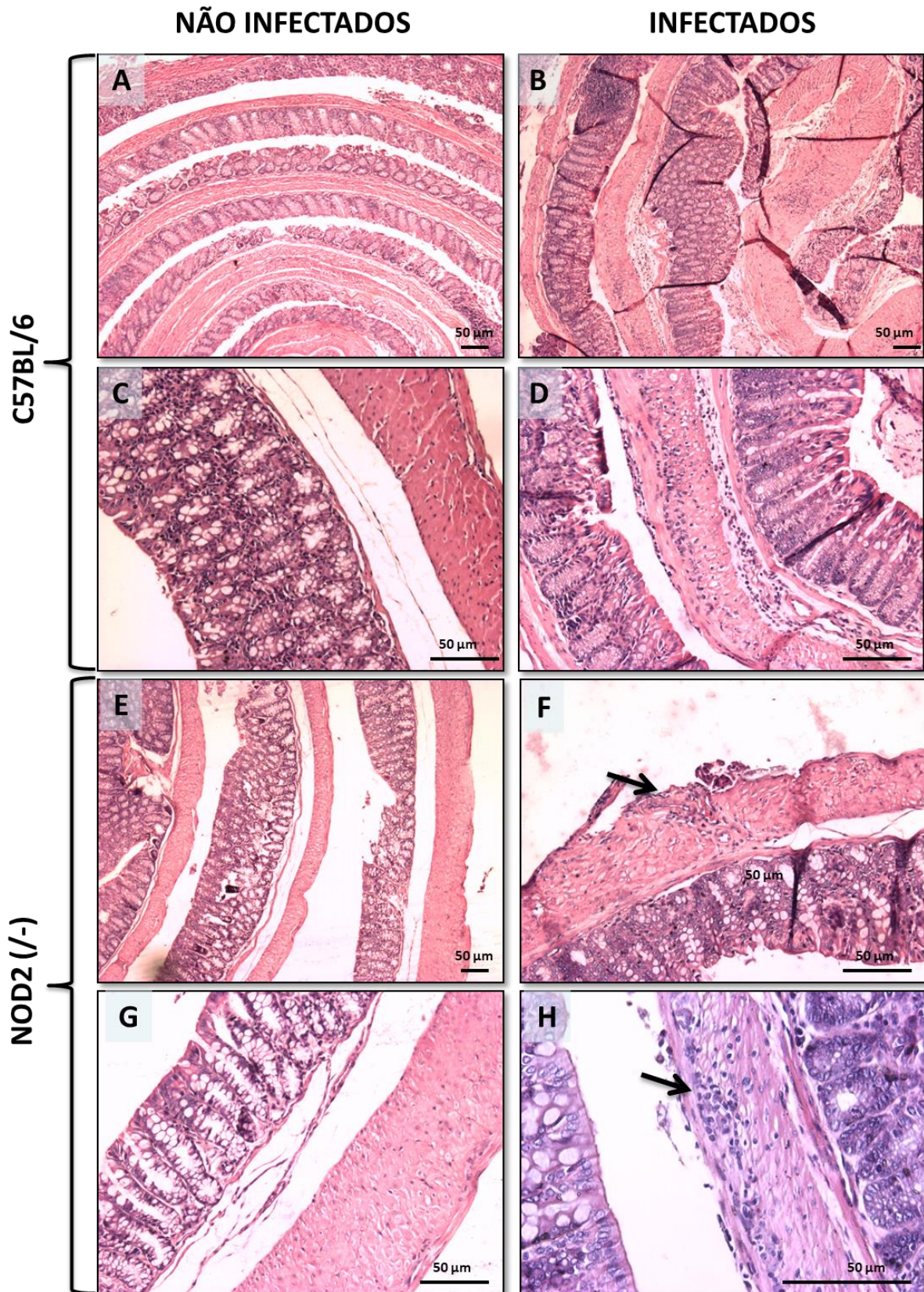


Figura 12 - Camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentam inflamação no cólon discretamente maior que animais C57BL/6 durante a fase aguda da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos fêmea C57BL/6 WT (**A** e **C**-Não infectado), (**B**, **D**-Infectado) e NOD2^(-/-) (**E** e **G** Não infectado), (**F** e **H**-Infectado), infectados por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*. Eutanásia realizada no 19º dia após a infecção. (Aumento de 4x: A, B e E; 10x: C, D e G; 20x: H).

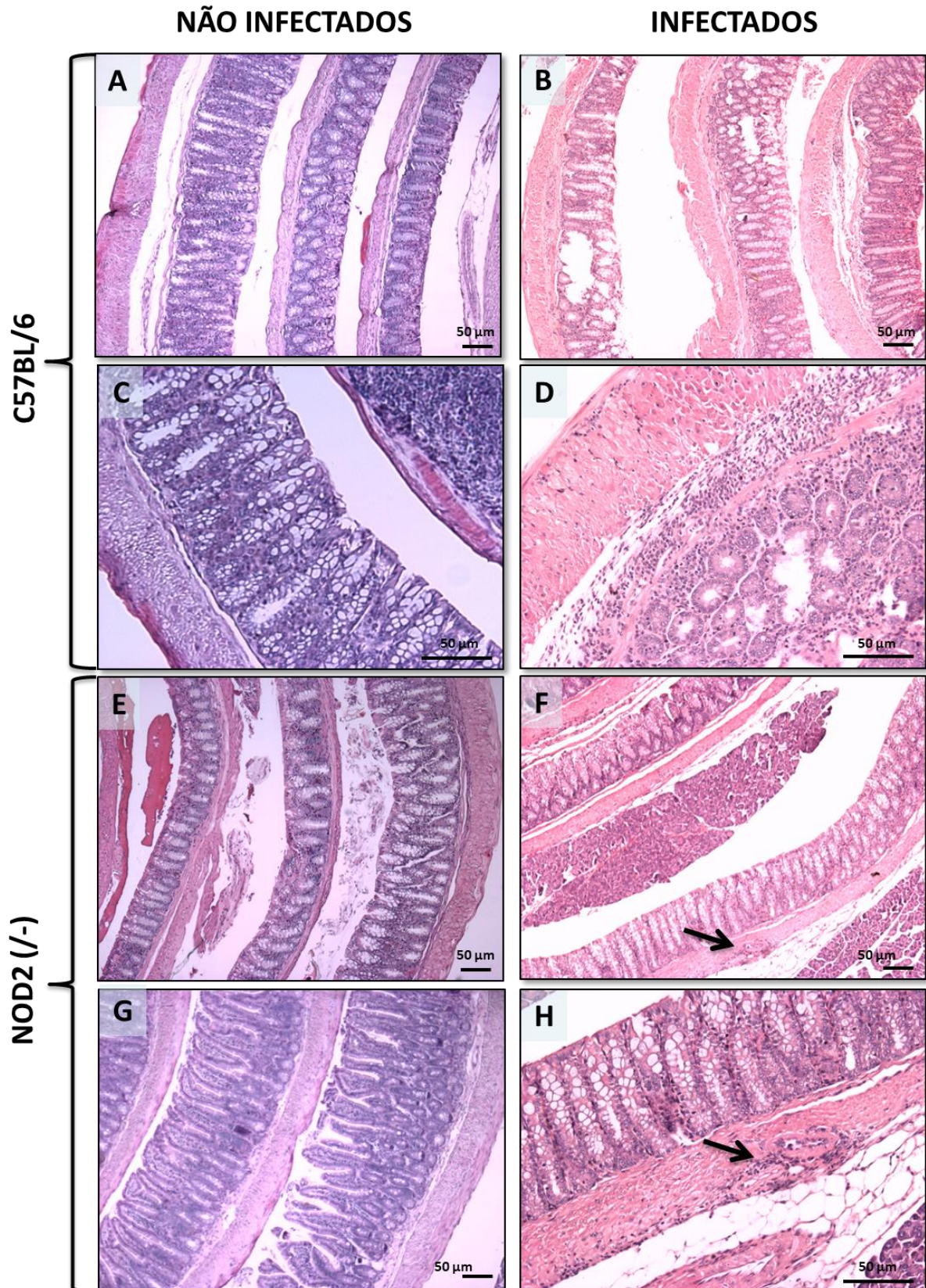


Figura 13 - Animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentam inflamação intensa no cólon durante a fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos fêmeas C57BL/6 WT (A e C- Não infectado), (B, D- Infectado) e NOD2^{-/-} (E e G- Não infectado), (F e H- Infectado), infectados por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*. Eutanásia realizada após 12 meses. (Aumento de 4x: A, B, E, F e G; 10x: C, D e H).

INFECTADOS

45

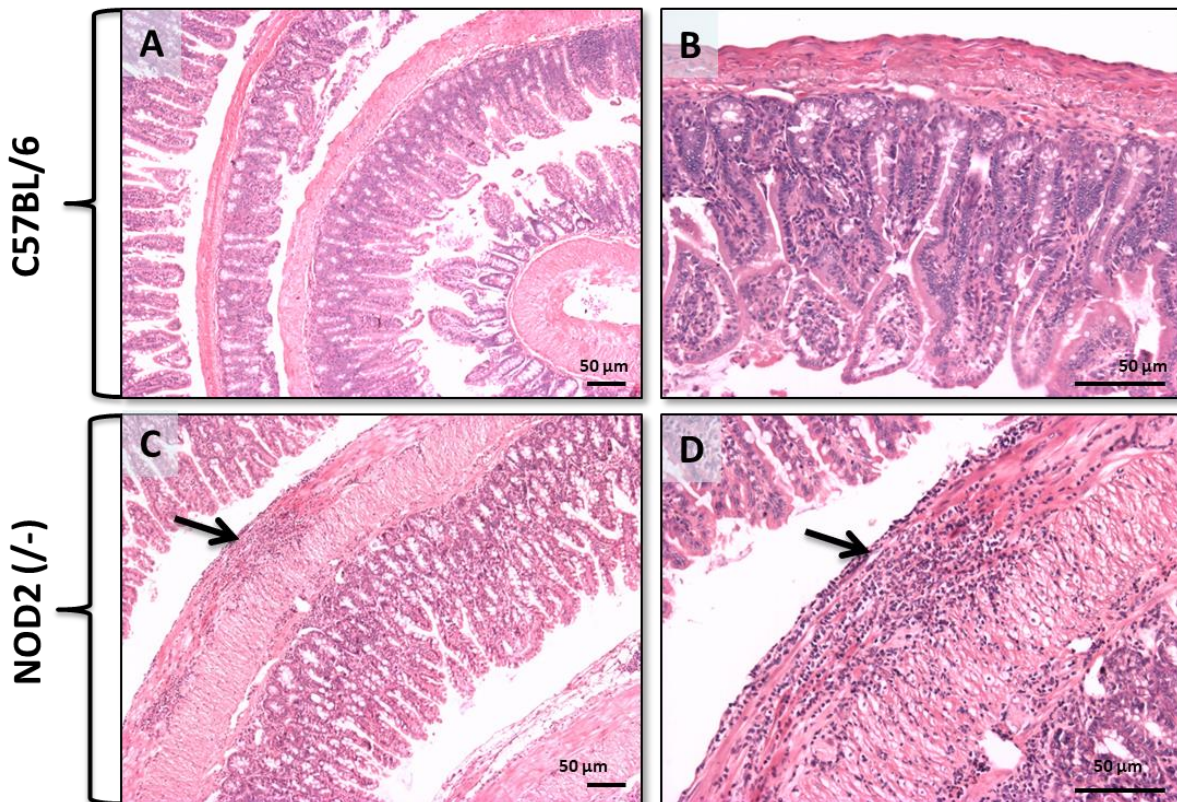


Figura 14 - Animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentam intensa inflamação no jejuno quando comparado com animais C57BL/6 durante a fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do jejuno de camundongos fêmeas C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*. Eutanásia realizada após 12 meses. (Aumento de 4x: A e C; 10x: B e D).

INFECTADOS

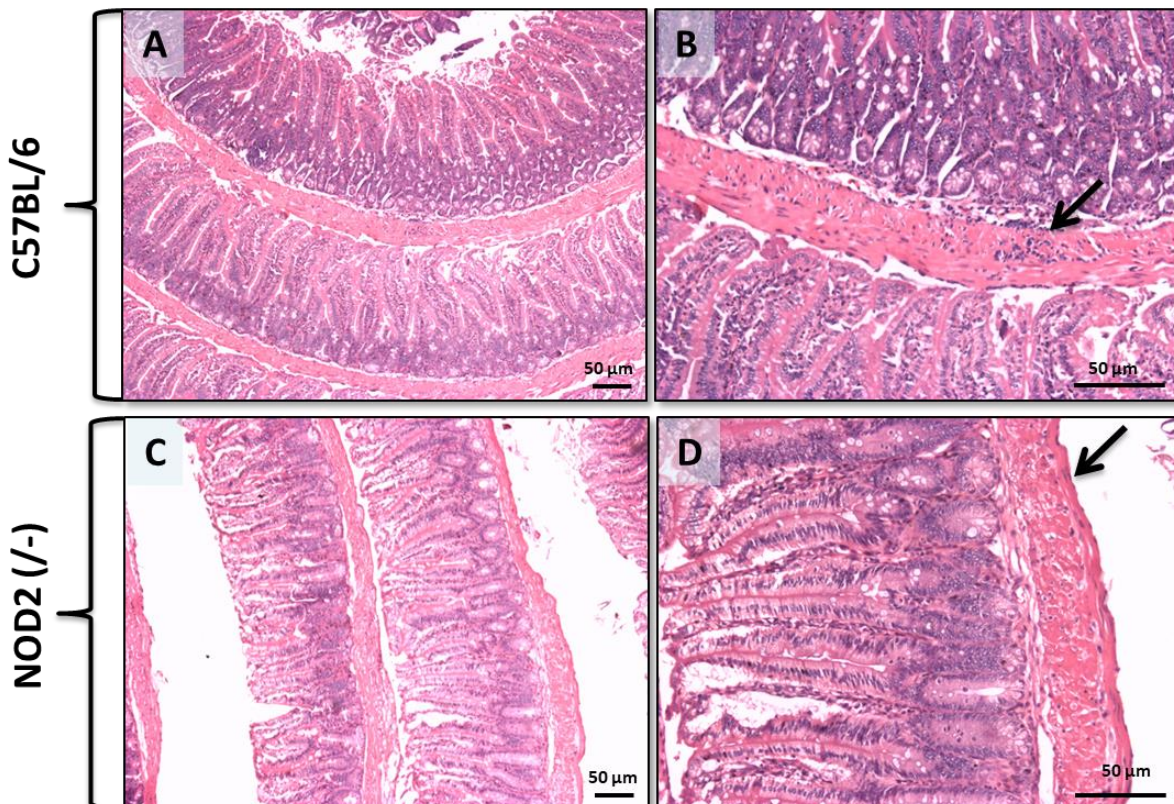


Figura 15 - Animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentam intensa inflamação no íleo quando comparado com animais C57BL/6 durante a fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do íleo de camundongos fêmeas C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 10³ formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*. Eutanásia realizada após 12 meses. . (Aumento de 4x: A e C; 10x: B e D).

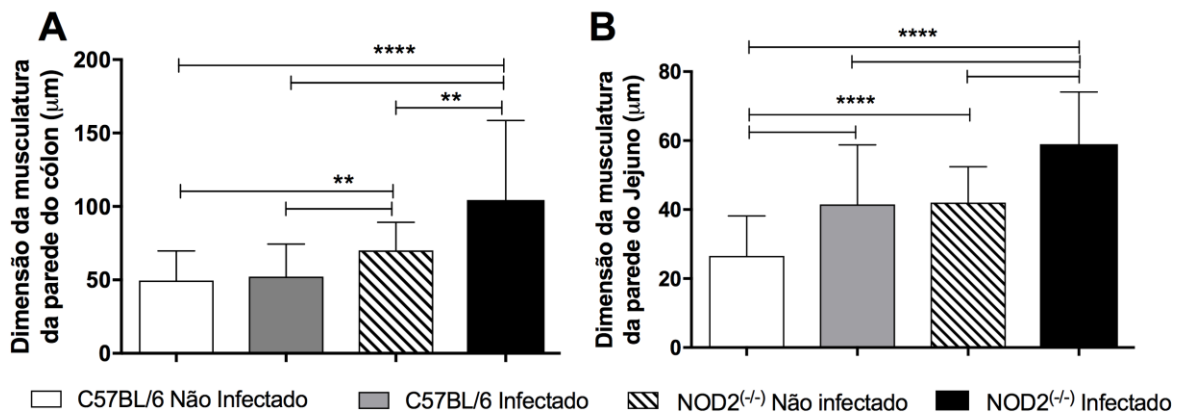


Figura 16 - Animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentam aumento na dimensão da parede do cólon e jejuno durante a fase crônica da infecção. Aspectos dimensionais do cólon (A) e jejuno (B) de camundongos fêmeas C57BL/6 e NOD2^(-/-) não infectados ou infectados por via intraperitoneal com 10^3 formas tripomastigotas sanguíneas do isolado RN25 (TcII) de *Trypanosoma cruzi*. Eutanásia realizada após 12 meses.

4.3 Infecção experimental com 5×10^4 tripomastigotas da cepa CL de *T. cruzi*

Os camundongos fêmeas nocautes de NOD2 apresentaram redução da motilidade intestinal 15 e 180 dias após a infecção usando o inóculo de 10^3 tripomastigotas do isolado RN25, indicando a presença de alterações intestinais. Com intuito de induzir robusto mecanismo patofisiológico que poderia gerar a formação de mega na fase crônica da infecção, foi realizado outro experimento utilizando a cepa CL com inóculo de 5×10^4 /animal, seguido de tratamento com dose única de benznidazol após o pico de parasitemia para obter a fase crônica da infecção (CAMPOS et al., 2017).

Camundongos fêmeas nocautes de NOD2 infectados com a cepa CL apresentaram parasitemia mais elevada entre o 30º e 60º dias após a infecção, quando comparados aos animais selvagens (**Figura 17A**). Ademais, camundongos NOD2^(-/-) apresentaram menor sobrevivência (60%) que animais C57BL/6 (90%) até o final do período de avaliação (60 dias após a infecção) (**Figura 17B**).

Em seguida, foi determinada a motilidade intestinal dos camundongos fêmeas nocautes de NOD2 infectados com a cepa CL do *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 e nocautes de NOD2 infectados apresentaram redução de motilidade intestinal no 15º e 30º dia após a infecção quando comparados aos animais não infectados (**Figura 18**). Animais NOD2^(-/-) infectados pelo *T. cruzi* apresentaram maior redução da motilidade gastrointestinal 15 dias após infecção, quando comparados aos animais C57BL/6 infectados (**Figura 18**). Entretanto, com aumento do inóculo de 1000 formas tripomastigotas do isolado RN25 para 50.000 da cepa CL não foi suficiente para induzir redução da motilidade nos camundongos infectados 90

e 180 dias após a infecção, indicando melhora nas alterações do trato gastrointestinal (**Figura 18**).

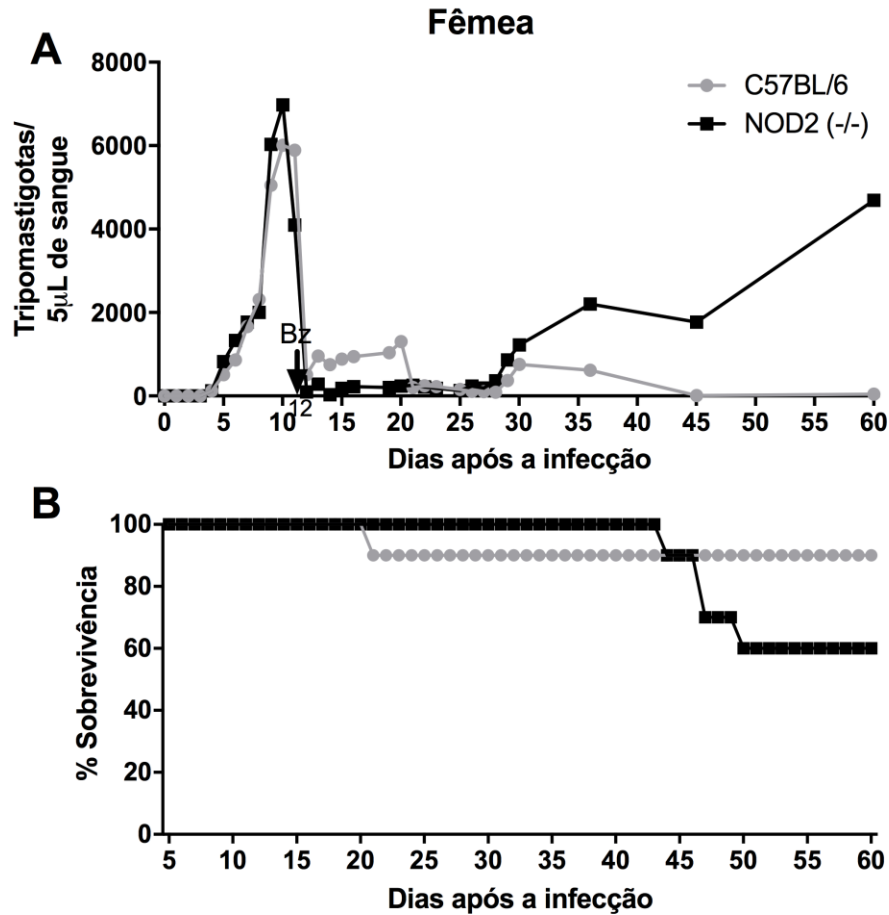


Figura 17 - Camundongos NOD2^(-/-) infectados com a cepa CL do *Trypanosoma cruzi* apresentaram elevada parasitemia e mortalidade. Curvas de parasitemia (A) e sobrevivência (B) de camundongos C57BL/6 e NOD2^(-/-) fêmeas infectadas por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi*. Bz: indica o tratamento com dose única de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção.

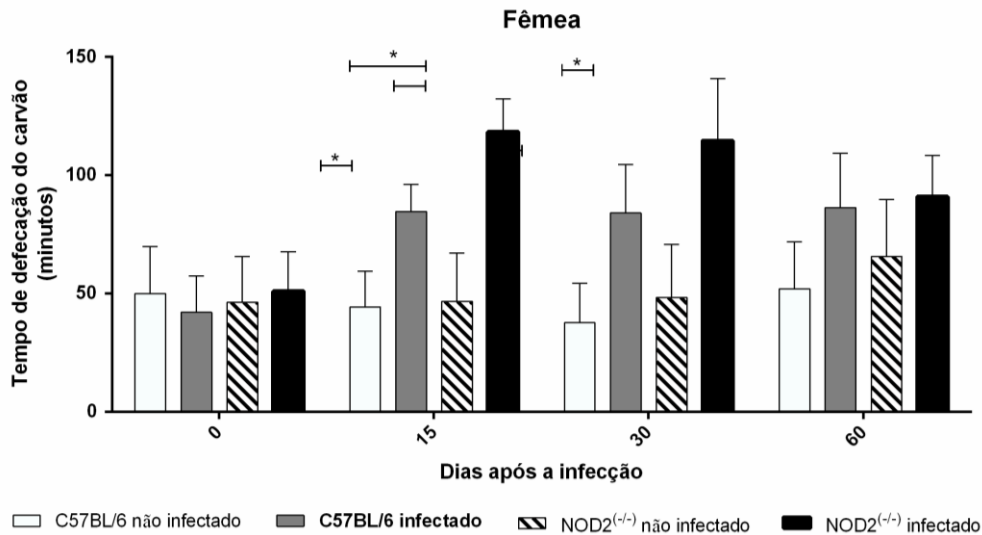


Figura 18 - Camundongos NOD2^(-/-) e C57BL/6 fêmeas infectadas com a cepa CL do *Trypanosoma cruzi* apresentaram redução da motilidade intestinal durante a fase aguda da infecção. Avaliação da motilidade gastrointestinal pelo tempo médio de eliminação de carvão ativado em camundongos C57BL/6 e NOD2^(-/-) fêmeas infectadas por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* e tratados com uma dose de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção.

A diminuição da motilidade intestinal nos camundongos NOD2^(-/-) pode estar correlacionada à inflamação gerada pela infecção com o *T. cruzi* sendo influenciada por fatores intrínsecos ao hospedeiro. Assim, o próximo passo foi avaliar a expressão de receptores da imunidade inata, fator de transcrição da resposta Th1 (T-bet), citocinas e outros mediadores inflamatórios que podem contribuir para a inflamação do trato gastrointestinal na infecção pelo *T. cruzi*. Durante a fase aguda (12 dias após infecção) camundongos fêmea nocautes de NOD2 infectados com 5×10^4 tripomastigotas da cepa CL de *T. cruzi* apresentaram expressão semelhante de TLR2 (Figura 19A) e IL-10 (Figura 19B) no cólon, quando comparados aos camundongos C57BL/6. Por outro lado, camundongos NOD2^(-/-) apresentaram elevada expressão de TLR4 (Figura 19C), T-bet (Figura 19D), IL-17 (Figura 19E), IFN- γ (Figura 19F), TNF- α (Figura 19G), iNOS (Figura 19H) e defensina A (Figura 19I), quando comparados aos animais selvagens.

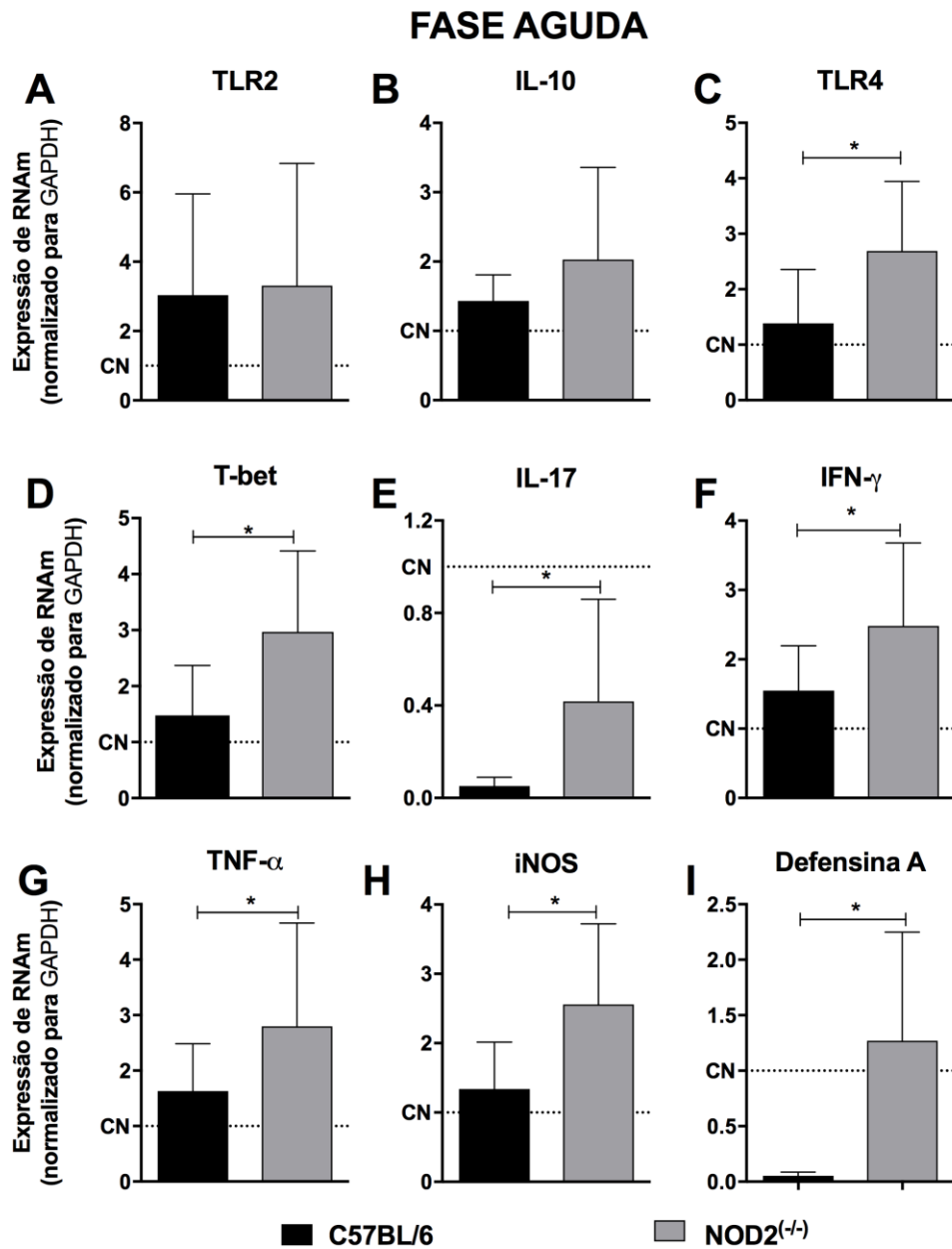


Figura 19 - A infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* induz ao aumento da expressão de marcadores inflamatórios no cólon de camundongos NOD2^(-/-) durante a fase aguda. A expressão de RNAm de TLR2 (A), IL-10 (B), TLR4 (C), T-bet (D), IL-17 (E), IFN- γ (F), TNF- α (G), iNOS (H) e defensina-A (I) foi determinada por qPCR no cólon de camundongos C57BL/6 e NOD2^(-/-) infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) e eutanasiados 12 dias após a infecção. Os dados são representativos de três experimentos independentes e, expressos em média \pm desvio padrão (DP). * $p < 0,05$ CN: Camundongos controles não infectados (n=6).

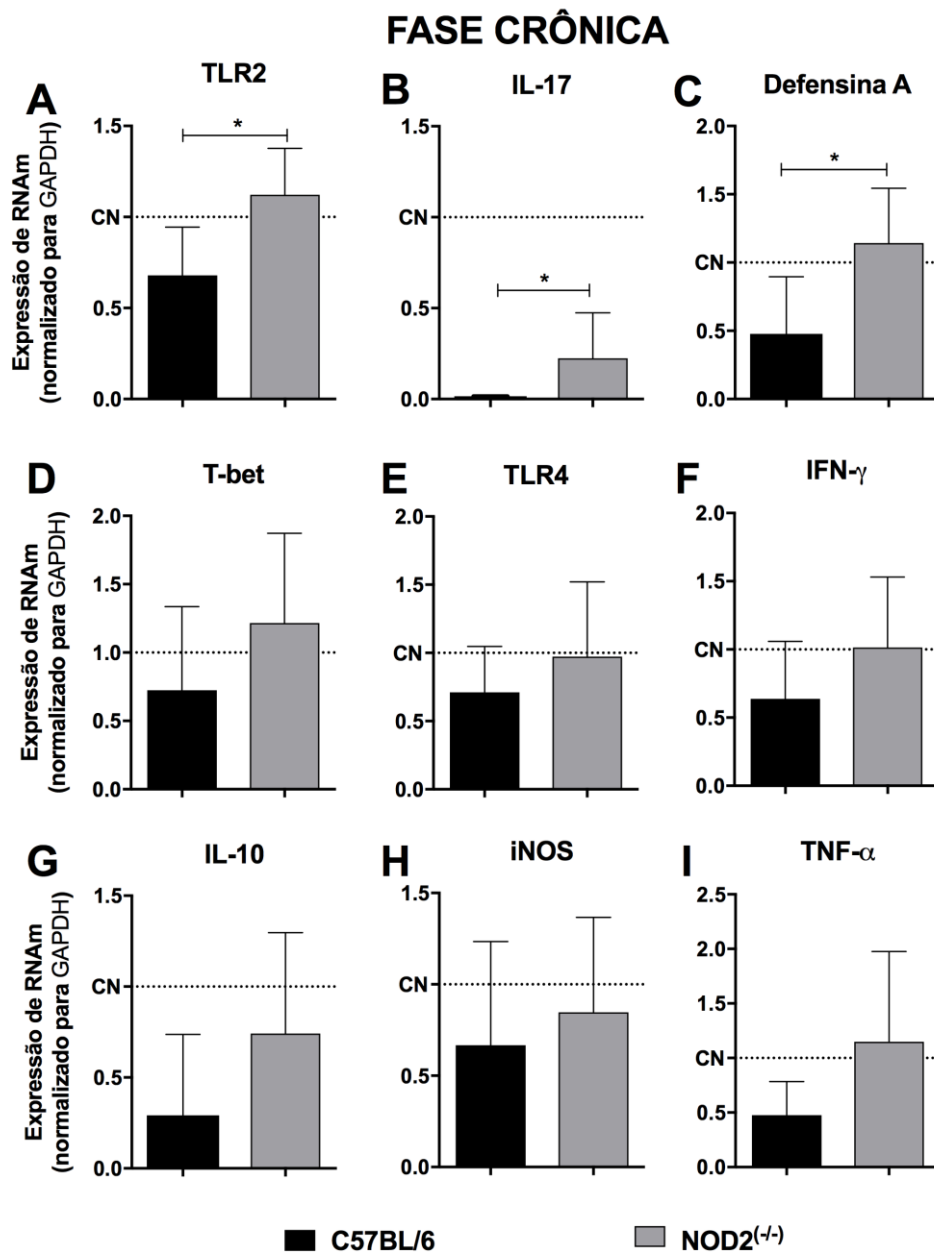


Figura 20 - Camundongos NOD2^(-/-) apresentaram baixa expressão de moléculas inflamatórias no cólon durante a fase crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. A expressão de RNAm de TLR2 (A), IL-17 (B), defensina-A (C), T-Bet (D), TLR-4 (E), IFN- γ (F), IL-10 (G), iNOS (H) e TNF- α (I) foi determinada por qPCR no cólon de camundongos fêmea C57BL/6 e NOD2^(-/-) infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) e eutanasiados 60 dias após a infecção. Os dados são representativos de experimentos independentes e, expressos em média \pm desvio padrão (DP). * $p < 0,05$ CN: Camundongos controles não infectados (n=10). Os camundongos receberam uma dose de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção.

Em seguida foi realizada a análise histopatológica do cólon e jejuno dos camundongos fêmeas NOD2^(-/-) e C57BL/6 infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas da cepa CL e eutanasiados durante a fase aguda (19 dias após infecção) e durante a fase crônica (60 dias após infecção). Durante a fase aguda da infecção os animais NOD2^(-/-) e C57BL/6 infectados apresentaram focos inflamatórios discretos perivascularares, a serosa foi afetada e foi observada inflamação discreta na parede muscular do cólon (**Figura 21A, B, C e D**). Por outro lado, o íleo e jejuno dos animais C57BL/6 (**Figura 22A e B**) infectados pelo *T. cruzi* apresentaram inflamação ausente ou mais discreta, quando comparados aos camundongos NOD2^(-/-) (**Figura 22C e D**), os quais apresentam focos discretos de inflamação mononuclear nesses órgãos.

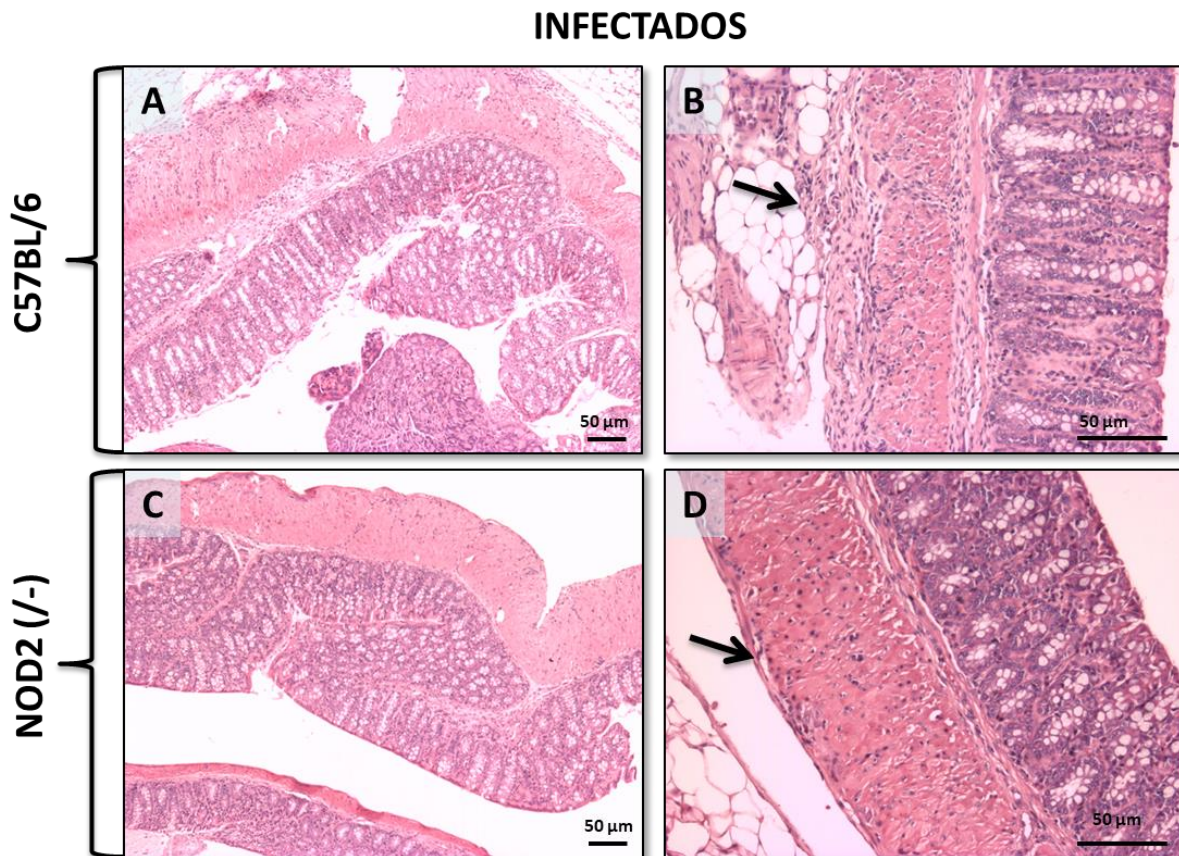


Figura 21 - Camundongos C57BL/6 e deficientes de NOD2 infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentam inflamação discreta e similar no cólon durante a fase aguda da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos fêmeas C57BL/6 (**A e B**) e NOD2^(-/-) (**C e D**) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* e eutanasiados durante a fase aguda da infecção (19 dias após infecção). (Aumento de 4x: A e C; 10x: B e D)

INFECTADOS

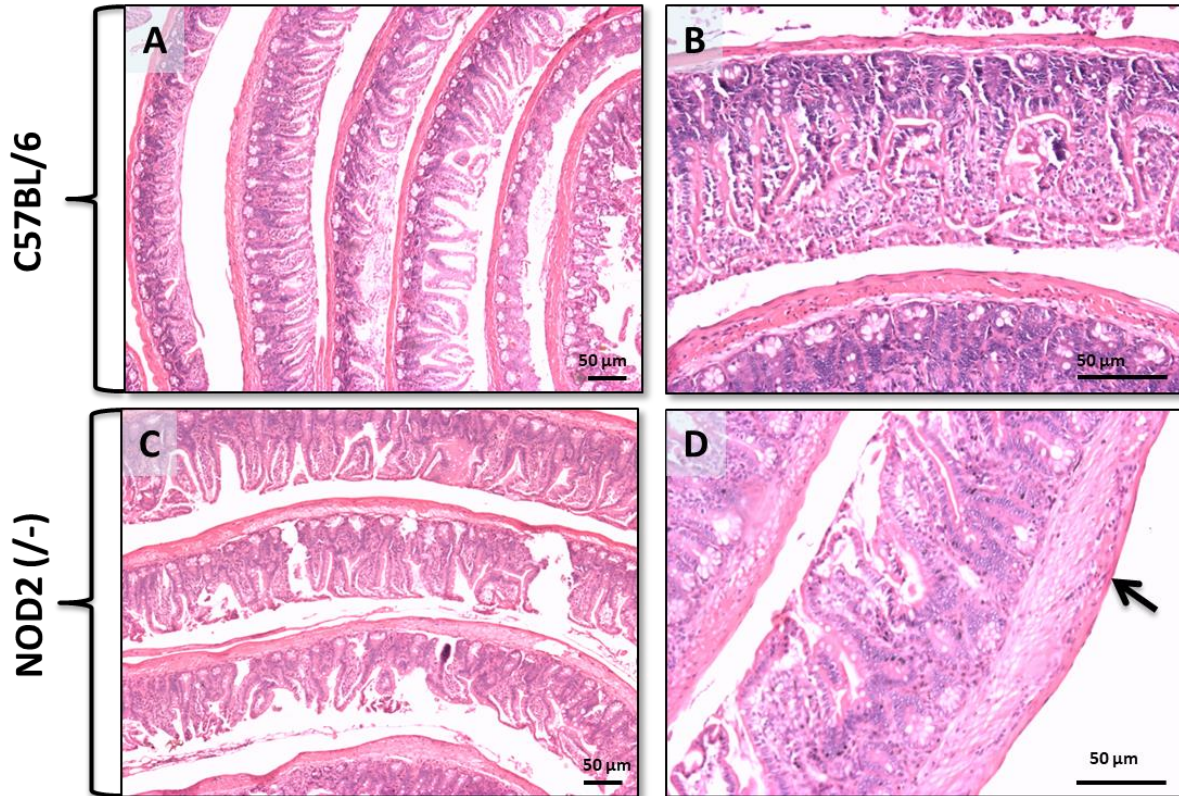


Figura 22 - Animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentam maior inflamação no jejuno durante a fase aguda da infecção. Aspectos histológicos do jejuno de camundongos fêmeas C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* e eutanasiados durante a fase aguda da infecção (19 dias após infecção). (Aumento de 4x: A e C; 10x: B e D)

Os animais inoculados com 5×10^4 formas tripomastigotas da cepa CL receberam dose única de benznidazol no 12º dia de infecção (pico parasitemia) para induzir a cronificação da infecção (CAMPOS et al., 2017). Estes camundongos foram eutanasiados 60 dias após a infecção. A análise histológica do cólon demonstrou inflamação discreta e similar em animais C57BL/6 e NOD2^(-/-) (Figura 23A, B, C e D). Todavia, animais NOD2^(-/-) (Figura 23C e D) apresentaram maior número de focos inflamatórios no cólon com grau de acometimento mais extenso que nos demais segmentos, quando comparado com os animais C57BL/6 (Figura 23A e B). No jejuno foi observada inflamação discreta e mais rara que a observada no cólon. Animais NOD2^(-/-) infectados apresentaram mais focos inflamatórios no jejuno, quando comparados aos camundongos C57BL/6 (Figura 24A, B, C e D), estes apresentaram inflamação ainda mais rara. No íleo de animais NOD2^(-/-) infectados foram observados poucos focos inflamatórios, embora ainda mais numerosos que no jejuno (Figura 25C e D), enquanto nos animais C57BL/6 (Figura 25A e B) são raros e, encontrados pequenos agrupamentos de células mononucleares.

INFECTADOS

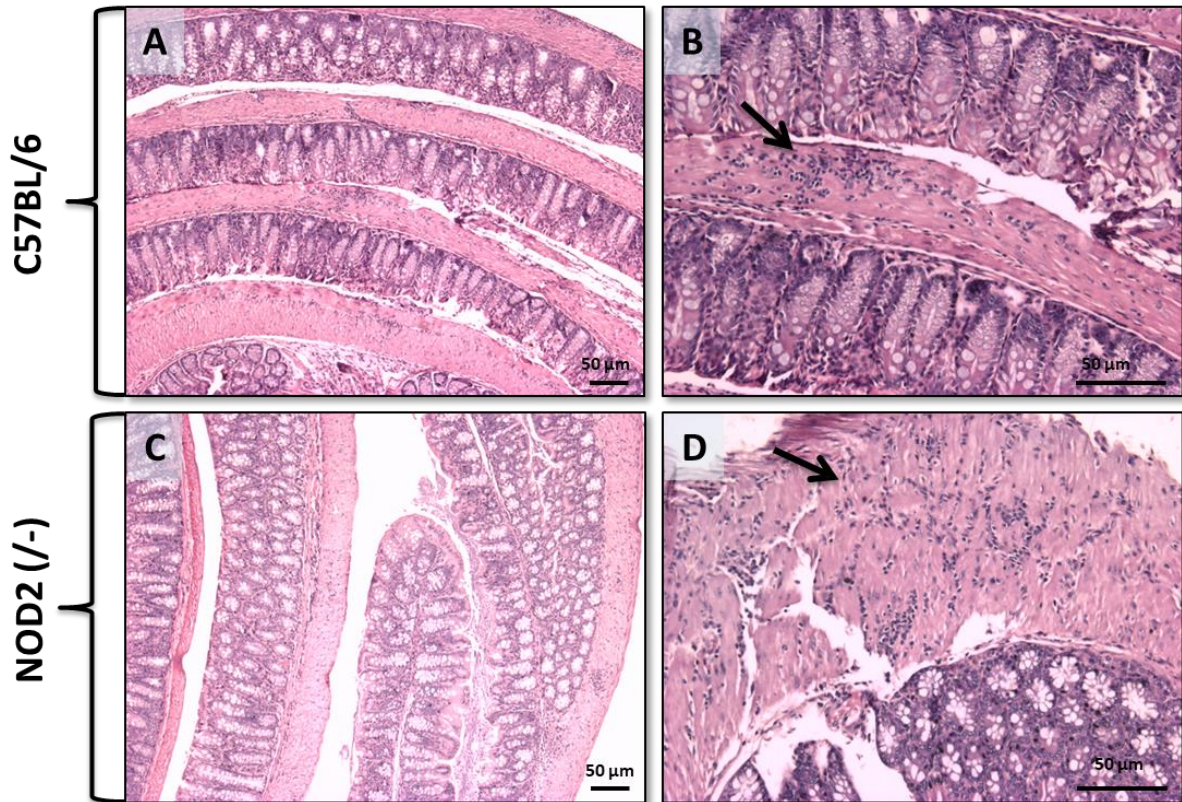


Figura 23 - Animais deficientes de NOD2 infectados apresentaram maior número de focos inflamatórios e acometimento do cólon na fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* e tratados com dose única de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção. (Aumento de 4x: A e C; 10x: B e D)

INFECTADOS

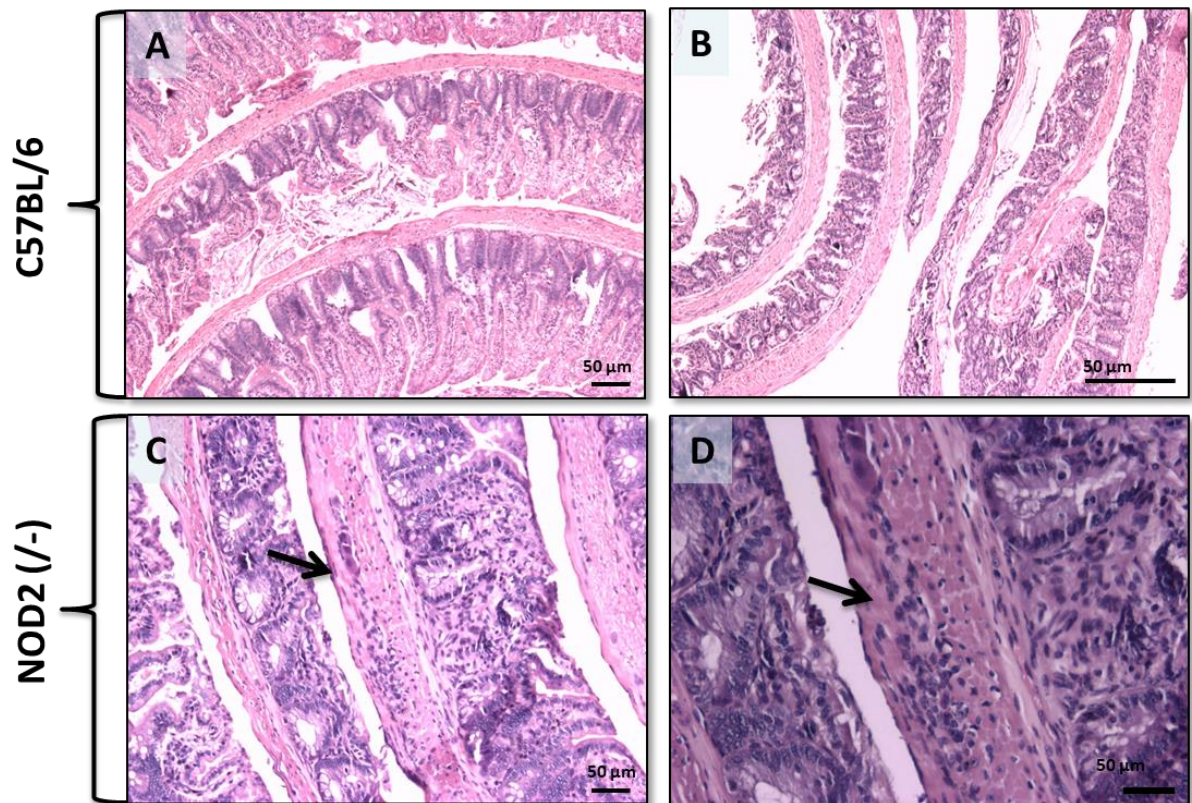


Figura 24 - Animais infectados pela cepa CL do *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentaram maior inflamação no jejuno durante a fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do cólon de camundongos fêmea C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com dose única de benznidazol (100mg/kg) no 12^o dia após a infecção. (Aumento de 4x: A e C; 10x: B; 20x: D)

INFECTADOS

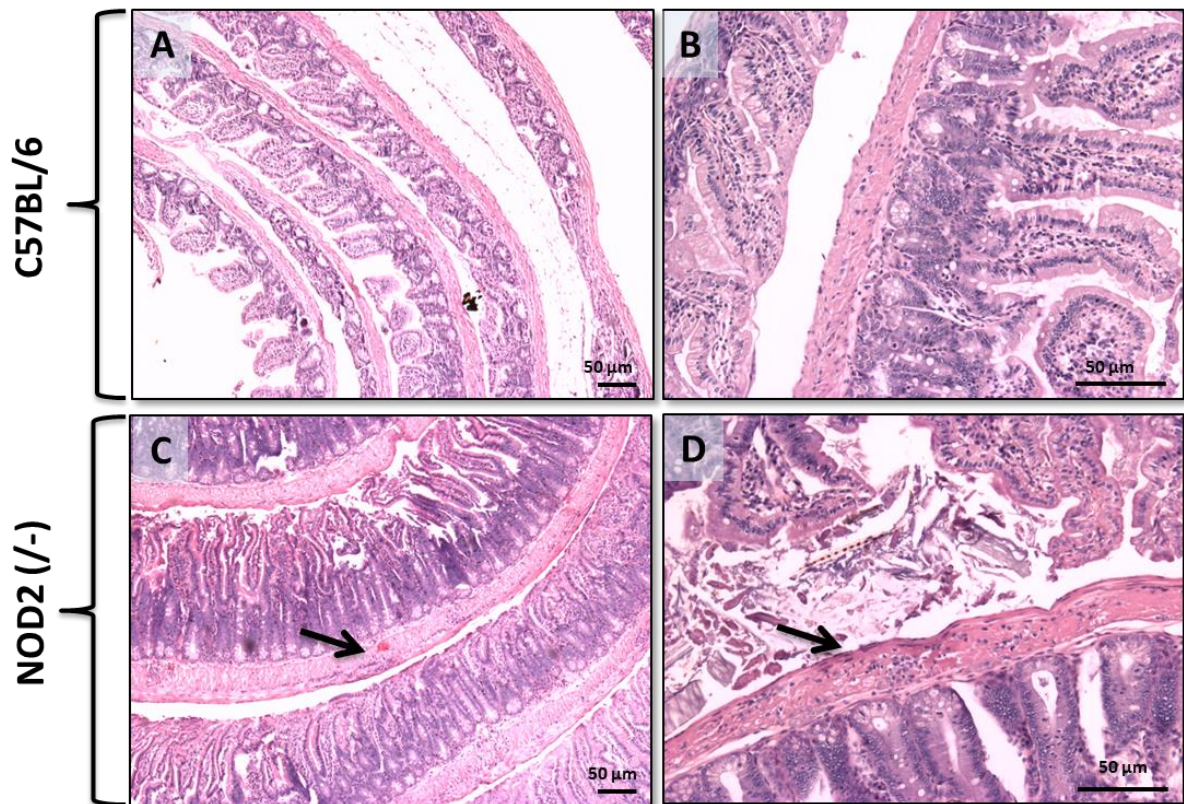


Figura 25 - Animais infectados com a cepa CL do *Trypanosoma cruzi* deficientes de NOD2 apresentaram maior inflamação no íleo durante a fase crônica da infecção. Aspectos histológicos do íleo de camundongos fêmea C57BL/6 (A e B) e NOD2^(-/-) (C e D) infectados por via intraperitoneal com 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL (TcVI) de *Trypanosoma cruzi* tratados com dose única de benznidazol (100mg/kg) no 12º dia após a infecção. (Aumento de 4x: A e C; 10x: B e D)

5 DISCUSSÃO

O papel do receptor NOD2 na gênese de lesões do trato gastrointestinal foi avaliado durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* e sua participação no desenvolvimento da forma clínica digestiva em pacientes com doença de Chagas. Os resultados indicam que a deficiência na expressão da molécula NOD2 pode estar correlacionada ao aparecimento de alterações no trato gastrointestinal durante a infecção experimental e no desenvolvimento da forma clínica digestiva da doença de Chagas humana.

Dados recentes demonstraram que pacientes com a forma digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas apresentam elevada expressão de TLR8 e de IFN- β , citocina produzida após sua ativação, quando comparados aos pacientes com a forma indeterminada (PEREIRA et al., 2018). O TLR8 reconhece RNA de cadeia simples de origem viral e bacteriana e encontra-se aumentado em biópsias do intestino de pacientes com colite ulcerativa (STEENHOLDT et al., 2009; SANCHEZ-MUNHOZ et al., 2011) e doença de *Crohn* (SARUTA et al., 2009; ORTIZ-FERNANDES et al. 2015). Desse modo, em doenças intestinais com caráter inflamatório ocorre quebra de homeostase intestinal permitindo o acesso da microbiota às células epiteliais intestinais, com ativação de TLR8 e contribuindo para a geração de inflamação e lesões. Na doença de *Crohn* ocorre inflamação transmural no intestino delgado associada com polimorfismo do gene do NOD2 que induz expressão reduzida ou truncada (inativa) da proteína desse receptor (HISAMATSU et al., 2003; GOETHEL et al., 2018).

Neste estudo, inicialmente avaliamos a expressão de RNAm dos receptores NOD1 e NOD2 e de moléculas envolvidas em sua via de sinalização em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com intuito de verificar sua possível correlação com o desenvolvimento da forma digestiva da doença. Os pacientes com a forma digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas apresentaram expressão ausente ou reduzida de NOD2. Nós também observamos correlação negativa entre a expressão de RNAm de NOD2 e o grau de dilatação do esôfago, a dimensão do sigmóide e do reto. Isso indica que a molécula NOD2 apresenta função protetora contra o desenvolvimento de lesões do trato gastrointestinal. O receptor NOD2 é bastante expresso nas células de *Paneth* sendo responsável pela regulação da microbiota intestinal por meio da produção de componentes antimicrobianos como as defensinas (FRANCHI et al., 2009; BISWAS et al., 2012). A expressão deficiente de NOD2 ainda influencia a composição da microbiota em humanos, sua ausência leva ao desenvolvimento de número elevado de bactérias com potencial patogênico no trato

gastrointestinal (REHMAN et al., 2011). Pacientes com doença de *Crohn* apresentam alteração da microbiota intestinal, com aumento de *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e redução de *Firmicutes* (SEKSIK et al., 2003). A deficiência na expressão da molécula NOD2 é importante para o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Pacientes chagásicos com megaesôfago e megacólon apresentam aumento do crescimento bacteriano no trato gastrointestinal, quando comparados a microbiota de indivíduos saudáveis. Os pacientes chagásicos com forma digestiva apresentam número mais elevado de bactérias com potencial patogênico e estas estão positivamente correlacionadas à dilatação do esôfago (PAJECKI et al., 2002).

Camundongos deficientes do receptor NOD2 também apresentam disfunção das células de *Paneth* e caliciformes, promovendo o aumento de bactérias no íleo terminal e alteração da microbiota intestinal, favorecendo o aparecimento de bactérias patogênicas e com risco de penetração de bactérias no epitélio intestinal (HISAMATSU et al., 2003; NATIVIDAD et al., 2012). Camundongos NOD2^(-/-) apresentam número reduzido de linfócitos intraepiteliais intestinais prejudicando a integridade do epitélio e levando à resposta imune alterada à microbiota residente (JIANG et al., 2013). Além disso, camundongos deficientes em NOD2 e RIP2 apresentam sensibilidade aumentada à colite e adenocarcinoma colônico devido à desregulação na microbiota (COUTURIER-MAILLARD et al., 2013). NOD2 participa do reconhecimento de um subconjunto de microrganismos patogênicos capazes de invadir e se multiplicar intracelularmente como, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Mycobacteria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Yersinia* (CARUSO et al., 2014; AL NABHANI et al., 2017; BERESWILL et al., 2017). Camundongos deficientes em NOD2 apresentam baixo número de células Th17 e baixa produção de espécies reativas de oxigênio e elevada carga bacteriana fecal após infecção por *Citrobacter rodentium* e *Salmonella* spp. (LECAT et al., 2010). Esses microrganismos também poderiam contribuir com a patogenia do trato gastrointestinal na doença de Chagas devido à deficiência na expressão de NOD2.

Neste estudo observamos aumento da expressão de RIP2 e α -defensina 6 em pacientes com as formas digestiva e cardiodigestiva quando comparados àqueles com as formas indeterminada e cardíaca. A produção de defensinas é estimulada após o contato de bactérias com o epitélio do trato digestivo. O receptor NOD2 reconhece muramildipeptídeo (MDP), substância presente em bactérias, sinaliza via serina-treonina quinase RICK ou RIP2, levando à translocação de NF- κ B para o núcleo e indução da produção de defensinas nas criptas gerando atividade bactericida com a regulação da microbiota intestinal (UEMATSU &

AKIRA, 2006; BISWAS et al., 2012; JIANG et al., 2013). A α -defensina 6 secretada por células de *Paneth* humanas possui ação antibacteriana por formação de nanofibrilas. Bactérias alvo cercadas por fibrilas não são capazes de invadir a mucosa intestinal. A atividade antimicrobiana da α -defensina 5 ocorre por meio da ruptura das membranas bacterianas (BEVINS et al., 2013; NAKAMURA et al., 2016; CHAIRATANA et al., 2017). Assim, o aumento na expressão de α -defensina 6 em pacientes portadores das formas digestiva e cardiodigestiva da doença pode ser mecanismo de defesa na tentativa de controlar o acesso de bactérias ao epitélio intestinal e a inflamação gerada. Além das defensinas, as células de *Paneth* são capazes de secretar outros peptídeos antimicrobianos, incluindo lisozima, fosfolipase secretora A2, RegIII, angiogenina 4 e catelicidinas (CLEVERS et al., 2013; MOWAT et al., 2014; PETERSON et al., 2014). O microbioma apresenta papel central na regulação da produção e secreção de defensinas. Camundongos deficientes de NOD2 não controlam o crescimento bacteriano, no entanto, camundongos C57BL/6 regulam a microbiota e mantêm a secreção de defensinas em níveis fisiológicos (SHANAHAN et al., 2014).

O receptor NOD1 também sinaliza via RIP2, sendo importante na resistência à infecção experimental pelo *T. cruzi* (SILVA et al., 2010), embora a molécula reconhecida por esse receptor no parasito não tenha sido descrita. O aumento na expressão de RIP2 poderia ser referente à sinalização via NOD1, devido ao reconhecimento de moléculas bacterianas ou presentes no *T. cruzi* em pacientes com as formas digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas. Os pacientes com a forma digestiva da doença apresentam parasitismo sanguíneo mais elevado (RAMIREZ et al., 2015) podendo contribuir para o aumento na expressão de RIP2 via reconhecimento do parasito por NOD1. A presença do parasito no tecido esofágico é marcadamente comprovada, mesmo em pacientes que não apresentam o quadro de megaesôfago. Assim como em pacientes com diferentes estágios da forma digestiva, demonstrando que outros fatores são importantes na patogenia da doença além da presença do parasito no tecido (VAGO et al., 1996; VAGO et al., 2000; LAGES-SILVA et al., 2001; VAGO et al., 2003; LAGES-SILVA et al., 2006). Todavia, tais mecanismos ainda não estão bem elucidados na forma digestiva, a expressão deficiente ou truncada da proteína NOD2 parece ser fator que contribui para o processo patofisiológico de deformação do megacólon e megaesôfago.

A via de sinalização do NOD2 conduz a ativação de NF- κ B, MAPK e caspase-1 que resultam no aumento da expressão de fatores próinflamatórios, incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, quimiocinas (CCL2, CXCL8, CXCL2), agentes antimicrobianos, recrutamento de

neutrófilos, monócitos inflamatórios e células dendríticas (KIM et al., 2011; BEYNON et al., 2008, FRITZ et al., 2005, COULOMBE et al., 2012). Diversos estudos mostraram que a coestimulação com NOD2 e agonistas do receptor *toll-like* (TLR) induz a produção sinérgica de citocinas associadas a Th1 em diferentes tipos de células, embora o mecanismo ainda não esteja claro (TADA et al., 2005, JEONG et al., 2014). Entretanto, o estímulo independente de NOD2 é capaz de ativar o sistema imune adaptativo, estimulando a resposta Th2 resultando na produção de IL-4 e IL-5 (MAGALHÃES et al., 2011). A indução da resposta do perfil Th2 após ativação de NOD2 é dependente tanto da produção de linfopietina estromal tímica pelas células estromais quanto da regulação da molécula co-estimulatória, o ligante OX40, sobre as células dendríticas (MAGALHÃES et al., 2011). O NOD2 ativa a via de sinalização Notch, o sinergismo entre NOD2 e a via de sinalização Notch1-PI3K nos macrófagos contribui para a sobrevivência de macrófagos, reduzindo a apoptose induzida por TNF α /IFN- γ e regulando positivamente a expressão de IL-10 além de outros genes associados a funções anti-inflamatórias (BANSAL et al., 2011). Além do papel protetor desempenhado pelo NOD2 na imunidade inata, inclusive envolvendo o controle da microbiota intestinal, existe a função imunomoduladora da resposta imune adaptativa que necessita melhor compreensão no modelo de inflamação intestinal induzida pela infecção com o *T. cruzi*, em que a deficiência do NOD2 pode contribuir para aumento da inflamação devido à diminuição de células do perfil Th2.

Na forma digestiva da doença de Chagas as lesões inflamatórias no sistema nervoso entérico estão associadas com a redução substancial do número de neurônios, fator marcante no desenvolvimento dos “megs” (ADAD et al., 2001). Ocorre denervação parassimpática intramural particularmente do plexo miontérico do sistema nervoso autônomo (TAFURI & RASO, 1983; ANDRADE et al., 2000; REZENDE & MOREIRA, 2000). As lesões de base do trato gastrointestinal apresentam o reto e cólon como segmentos mais comprometidos exibindo aumento luminal e hipertrofia muscular marcante (KÖBERLE, 1968). A patogenia desta forma clínica é dependente do parasitismo associado à inflamação do trato gastrointestinal, em que o ambiente inflamatório gerado é substrato importante para o processo de denervação do plexo miontérico que culmina na formação do megacólon e megaesôfago (TAFURI et al., 1971; ARANTES et al., 2004, CAMPOS et al., 2017).

Além de considerar a lesão de base causada pelo parasito e sua presença no tecido, a redução da atividade de NOD2 expõe ainda mais a mucosa à ação invasiva da microbiota no hospedeiro, influenciando a resposta inflamatória mais intensa na mucosa do trato gastrointestinal. Desse modo, os resultados sugerem que o receptor NOD2 apresenta

importante função na gênese das lesões do trato digestivo de pacientes chagásicos. Outro aspecto interessante é que a presença de megacólon é mais frequente que a presença de megaesôfago em pacientes chagásicos crônicos (LOPES et al., 1989). O cólon e o reto apresentam número mais elevado e diversidade de bactérias em relação ao esôfago (SUNDIN et al., 2017), o que poderia contribuir para intensa inflamação, denervação e dilatação observadas no cólon e reto. Ademais, pacientes chagásicos apresentam prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* mais elevada que indivíduos não chagásicos, tanto em áreas urbanas como rurais (NASCIMENTO et al., 2002). Além disso, para o aparecimento de megacólon é necessário denervação de pelo menos 50% do plexo mientérico, enquanto para desenvolvimento de megaesôfago é necessário denervação de 90% (KÖBERLE, 1968). Este aspecto é influenciado pela anatomia do órgão, já que no esôfago o conteúdo alimentar passa mais facilmente influenciado pela gravidade, enquanto no cólon e reto apresenta tendência natural de estagnação.

Posteriormente para confirmar a importância do receptor NOD2 na gênese das lesões do trato digestivo na doença de Chagas, camundongos nocautes de NOD2 foram infectados com o isolado RN25, obtido de paciente com a forma digestiva da doença e, avaliado o desenvolvimento de lesões do trato gastrointestinal. A diminuição da motilidade intestinal foi observada 15 e 180 dias após a infecção em camundongos NOD2^(-/-), quando comparada aos animais C57BL/6, indicando aparecimento de alterações no trato gastrointestinal em animais nocautes de NOD2. A análise histopatológica do cólon demonstrou lesão inflamatória de grau discreto na camada subserosa e muscular, mais acentuada em animais NOD2^(-/-) que C57BL/6 durante a fase aguda da infecção com o RN25. Entretanto, durante a fase crônica houve inflamação focal intensa no cólon, jejuno e íleo dos animais NOD2^(-/-), atingindo todas as camadas musculares e elementos ganglionares do sistema nervoso entérico. Esses resultados indicam que a infecção com o isolado obtido de paciente com a forma digestiva gera inflamação discreta e progressiva durante o curso da infecção, sendo discreta na fase aguda e intensificando na fase crônica. Essa inflamação é distribuída em focos ao longo de todo o trato gastrointestinal e, quando somadas podem contribuir significativamente para o processo de denervação. Estudos demonstram a importância do IFN- γ e iNOS no processo de degeneração do plexo mioentérico durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, camundongos nocautes de iNOS e IFN- γ não apresentam destruição neuronal e alterações do plexo gastrointestinal (ARANTES et al., 2004).

A hipertrofia do cólon foi observada somente em animais nocautes de NOD2 infectados com o isolado RN25, não foi observada hipertrofia da parede do cólon em

camundongos C57BL/6 infectados. Estes achados demonstram a importância do NOD2 para a proteção do desenvolvimento de lesões do trato gastrointestinal em camundongos. Devido ao fato de NOD2 ser um regulador negativo da sinalização de TLR (*toll like receptors*), sua deficiência pode resultar na produção de citocinas relacionadas à Th1 em ambientes ricos em receptores TLR, como o intestino (WATANABE et al., 2004). Camundongos deficientes em NOD2 expostos ao Dextran sulfato de sódio (DSS) apresentam níveis 20 vezes mais elevados de IFN- γ no intestino quando comparados aos camundongos C57BL/6 (SOUZA et al., 2018). Células dendríticas de pacientes com doença de *Crohn* e mutações no gene do NOD2 falham em ativar linfócitos Th17, mas continuam a estimular a produção de IFN- γ , sugerindo que a mutação no NOD2 promove um desequilíbrio na resposta imune, provavelmente contra diferentes componentes da microbiota (VAN BEELEN et al., 2007). Como descrito anteriormente, o NOD2 tem um papel central no controle de microbiota intestinal e a função anormal deste receptor incita a depuração prejudicada de microrganismos potencialmente patogênicos e geração de inflamação (KOBAYASHI et al., 2005; PETNICKI-OCWIEJA et al., 2009). Essas características apontam para o papel central deste receptor no controle da homeostase intestinal e, poderia explicar o aumento da inflamação que é substrato da denervação do plexo mioentérico e hipertrofia muscular exacerbada gerada pela presença de cepa do *T. cruzi* com tropismo pelo trato gastrointestinal.

No presente estudo, o íleo de camundongos deficientes de NOD2 infectados e não infectados pelo *T. cruzi* apresentou inflamação intensa, sendo a inflamação e hipertrofia da musculatura longitudinal e circular mais pronunciada nos animais infectados pelo *T. cruzi*. NOD2 é altamente expresso em células de *Paneth* no íleo que essencialmente contribuem para a regulação da microbiota ileal pela secreção de peptídeos antimicrobianos (SIDIQ et al., 2016). Na doença de *Crohn* ocorre expressão reduzida de α -defensinas (WEHKAMP et al., 2005; WEHKAMP et al., 2010) permitindo que bactérias presentes no íleo gerem inflamação intestinal e contribuindo para o processo patofisiológico do trato gastrointestinal. Assim, devido a expressão de NOD2 ser maior em células do íleo quando comparado ao cólon, este aspecto contribui para a inflamação mais intensa no íleo quando comparado ao cólon dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

Assim, o desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas também está associado com as diferentes subpopulações do *T. cruzi*, já que as diferentes subpopulações apresentam diferentes tropismos teciduais, sendo também importante considerar o tamanho do inóculo (MACEDO & PENA, 1998; ZINGALES et al., 1998; VIRREIRA et al., 2006; CURA et al., 2012; MEZA et al., 2014). A forma digestiva da doença de Chagas é mais frequente em

países como, Brasil, Bolívia, Argentina, Chile e Peru. No Brasil o acometimento cardíaco é mais frequente na região central e nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Bahia e casos descritos no Rio Grande do Norte. Nos países situados ao norte da linha equatorial, megacólon e megaesôfago são menos frequentes, países como Panamá, México, Honduras e Venezuela. As manifestações digestivas da doença de Chagas têm sido descritas com frequência variável conforme a região geográfica ou país considerado, indicando diferenças no perfil genético dos pacientes e do parasito (KOEBERLE et al, 1955; DIAS et al., 1983; MENEGHELLI, 2004; ANDRADE et al., 2015). O *T. cruzi* é classificado em seis diferentes *discrete typing units* (DTU I-VI) (ZINGALES et al., 2009) entretanto, estudos que avaliaram a correlação entre DTUs e as formas clínicas da doença de Chagas não têm demonstrado associações, principalmente devido a grande diversidade genética presente dentro de cada DTU do parasito (DEL PUERTO et al., 2010). Outro aspecto a ser considerado é a genética do paciente. Três tipos de mutação em alelos do gene NOD2/CARD15 conferem susceptibilidade a doença de *Crohn* e outras doenças inflamatórias intestinais, a ocorrência dessas mutações variam de acordo com a etnia e a região geográfica dos indivíduos (HUGOT et al., 2001; LESAGE et al., 2002; CUTHBERT et al., 2002). A frequência de encontro de uma das três mutações frequentes no gene NOD2/CARD15 foi de 38,5% na Grã-Bretanha (AHMAD et al., 2002), 46,3% na Bélgica (ESTERS et al., 2004), 38,2% na Itália (ANNESE et al., 2005), 38% na França (HERESBACH et al., 2004) e 36,5% na Alemanha (BUNING et al., 2004). Por outro lado, houve falta de variantes mutantes nas populações asiáticas do Japão (INOUE et al., 2002), Coréia (CROUCHER et al., 2003), China (LI et al., 2008; LEONG et al., 2003) e Índia (PUGAZHENDHI et al., 2008). Estudo na Malásia demonstrou que nenhum paciente malaio com a doença de *Crohn* apresentou qualquer uma das mutações patogênicas NOD2/CARD15 (CHUA et al., 2002; 2009). No Brasil ainda não existe estudo descrevendo a frequência de ocorrência dessas mutações, este estudo seria importante para correlacionar as áreas de ocorrência de megaesôfago e megacólon no Brasil.

Dados recentes demonstraram que a lesão do trato gastrointestinal em camundongos C57BL/6 experimentalmente infectados com diferentes inóculos da cepa Y (TcII) do *T. cruzi*, é dependente do tamanho do inóculo. Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias no cólon foi mais elevada, havendo aumento da espessura da camada mucosa, miosite, periganglionite, presença de ninhos de amastigotas e, tamanho do cólon nos animais infectados com inóculos elevados. Ainda foi sugerido que a maioria das lesões do trato gastrointestinal ocorre no início da fase aguda havendo correlação positiva com a carga parasitária e a intensidade do infiltrado inflamatório (VAZQUEZ et al., 2015). Como as

alterações do trato gastrointestinal durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* dependem do tamanho do inóculo (VAZQUEZ et al., 2015; FONTES et al., 2018) e devido a redução da motilidade intestinal observada nos camundongos nocautes de NOD2 infectados com 1×10^3 tripomastigotas do isolado RN25, realizamos novo experimento com a cepa CL do *T. cruzi*, utilizando inóculo de 5×10^4 tripomastigotas/animal e tratamento com dose única de benznidazol para evitar a mortalidade e permitir a obtenção da fase crônica da infecção (CAMPOS et al., 2017). O isolado RN25 não foi utilizado neste experimento devido sua baixa virulência impossibilitando a utilização do inóculo de 5×10^4 tripomastigotas. Camundongos nocautes de NOD2 infectados com a cepa CL apresentaram redução de motilidade intestinal na fase aguda da infecção e aumento de mediadores inflamatórios no cólon. Na fase crônica foi observada inflamação e hipertrofia menores que as observadas em camundongos inoculados com baixo inóculo do RN25. Desse modo, a genética do *T. cruzi* parece ser preponderante sobre o tamanho do inóculo na geração das alterações do trato gastrointestinal, contudo as lesões sofrem influência da intensidade do parasitismo. Estudo recente com isolados TcI, TcII e TcIII obtidos de pacientes na fase crônica da doença de Chagas no estado do Rio Grande do Norte demonstraram que TcI e TcII estão associados a forma digestiva da doença e o TcIII a forma indeterminada (MARTINS et al., 2015). O TcI está amplamente distribuído nas Américas (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, México, Panamá, Paraguai, Guiana Francesa, Venezuela e EUA), mantém maior afinidade com os marsupiais do que outros mamíferos, está associado aos ciclos silvestres e domésticos e, apresenta grande espectro de patogenicidade humana (BRIONES et al., 1999; CURA et al., 2010; TOMASINI et al., 2010). A infecção humana com TcI no Brasil é comumente concentrada na bacia amazônica e parte norte da América do Sul e América Central. TcII é predominante nas regiões sul e central da América e foi isolado principalmente em ciclos domésticos de transmissão de vetores, primatas, e outros mamíferos (CORTEZ et al.; 2006; LISBOA et al., 2007). TcIII está associado principalmente ao ciclo silvestre no Brasil, com roedores como reservatórios ao longo da Venezuela até a região do Chaco na Argentina (LLEWELLYN et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010).

A diminuição da motilidade intestinal nos camundongos NOD2^(-/-) pode estar relacionada à inflamação gerada pela infecção com o *T. cruzi* e influenciada por fatores intrínsecos ao hospedeiro. Dados da literatura relataram que a denervação mioentérica na infecção experimental com a cepa Y do *T. cruzi* ocorre na fase aguda e é causada pela produção de óxido nítrico induzida por IFN- γ , resultante da ativação da iNOS nos focos inflamatórios ao longo da parede intestinal (ARANTES et al., 2004). As lesões no cólon

induzidas pelo *T. cruzi* durante a infecção experimental na fase aguda incluem parasitismo, degeneração e necrose de fibras musculares e, resultam em fibrose intramuscular e aumento da parede do cólon (CAMPOS et al., 2017), estas alterações também são descritas em pacientes chagásicos com megacólon (PINHEIRO et al., 2003). A dilatação e a hipertrofia do cólon em pacientes chagásicos são iniciadas quando a diminuição do número de células ganglionares excede o limiar crítico de 55% (KÖBERLE 1963, 1966). A diminuição do número de células neuronais no plexo mioentérico também é observada durante a infecção experimental em camundongos, com redução significativa na densidade da inervação intramuscular (densidade axonal dentro do músculo liso) (CAMPOS et al., 2017).

Nossos resultados indicam que a ausência ou baixa expressão de RNAm de NOD2 pode estar correlacionada ao desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas. Pacientes desenvolveriam a forma digestiva da doença quando infectados por cepa de *T. cruzi* com tropismo pelo trato gastrointestinal, esta cepa provoca inflamação promovendo a quebra da homeostase do sistema digestivo. Bactérias presentes na microbiota atravessam o muco e a barreira de IgA, entrando em contato com a camada epitelial do trato digestivo, induzindo ou potencializando a inflamação gerada pelo parasito em pacientes com deficiência de NOD2. A inflamação é responsável pela denervação do trato intestinal, incoordenação e perda gradual do peristaltismo, com o curso do processo patológico começará a acumular material no trato intestinal que iniciará a compressão das vísceras gerando também patologias isquêmicas que irão amplificar o processo de formação do megaesôfago e megacólon. Desta forma, a molécula NOD2 protege contra o desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Os pacientes com as formas digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas apresentaram expressão deficiente de RNAm de NOD2 (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2*) e está inversamente correlacionada ao grau de dilatação do esôfago, colón sigmoide e reto;
- ✓ Os pacientes com a forma clínica digestiva da doença apresentaram elevada expressão de RNAm da substância antimicrobica α -defensina 6;
- ✓ Os camundongos NOD2^{-/-} experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* apresentaram aumento de lesões intestinais (inflamação e hipertrofia muscular) com diminuição da motilidade do trato gastrointestinal, indicando que a molécula NOD2 pode estar correlacionada ao desenvolvimento de alterações no sistema digestivo em animais infectados;
- ✓ A cepa do *T. cruzi* é fator importante no desenvolvimento de lesões do trato gastrointestinal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp. Parasitol.*, v. 84, p. 231–244, 1996.

ADAD, S. J.; CANÇADO, C. G.; ETCHEBEHERE, R. M.; TEIXEIRA, V. P.; GOMES, U. A.; CHAPADEIRO, E.; LOPES E. R. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchow. Arch.*, v. 438, p. 254-8, 2001.

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; LANE, C. E.; LUCAS, J.; BASS, D.; BOWSER, S. S.; BROWN, M.W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; GALL, L. L.; LYNN, D.H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E.A.; MOZLEY-STANRIDGE, S.E.; PARFREY, L.W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C.L.; SMIRNOV, U.M.; SPIEGEL, F.W. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, v. 59, n. 5, p. 1–45, 2013.

AHMAD, T.; ARMUZZI, A.; BUNCE, M.; MULCAHY-HAWES, K.; MARSHALL, S. E.; ORCHARD, T. R.; CRAWSHAW, J.; LARGE, O.; DE SILVA, A.; COOK, J. T. BARNARDO, M.; CULLEN, S.; WELSH, K. I.; JEWELL, D. P. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*, v. 122, p. 854–866, 2002. AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v. 124, p. 783–801, 2006.

AL NABHANI, Z.; DIETRICH, G.; HUGOT, J. P.; BARREAU, F. Nod2: the intestinal gate keeper. *PLoS Pathog.*, v. 13, n. 3, e1006177, 2017.

ALIBERTI, J. C.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.*, v. 158, p. 1433-1440, 2001.

ALIBERTI, J. C.; CARDOSO, M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 1961-1967, 1996.

AMORIM, M.; CORREA NETTO, A. A histopathologia e pathogenese do megaesôfago e megareto. Considerações em torno de um caso de “mal do engasgo”. *An Fac. Med. Univ. São Paulo*, v. 8, p. 101-127, 1932.

ANDRADE, C.M.; CÂMARA A.C.J.; NUNES, D.F.; GUEDES, P.M.M.; PEREIRA, W.O.; CHIARI, E.; DINIZ, R.V.Z.; GALVÃO, L.M.C. Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 48, n 6, p. 706-15, 2015.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; SOBRAL, S. C.; MAGALHÃES, J. B.; GUEDES, R. S. P.; GUERREIRO, M. L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myosites in mice. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, p. 1–8, 2006.

ANDRADE, Z. A. Patologia da doença de Chagas. In: Brener Z.; Andrade Z. A.; *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p. 201-30, 2000.

ANDRADE, C. M.; CÂMARA, A. C. J.; NUNES, D. F.; GUEDES, P. M. M.; PEREIRA, W. O.; CHIARI, E.; DINIZ, R. V. Z.; GALVÃO, L. M. C. Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 48, n. 6. p. 706-15, 2015.

ANNESE, V.; LOMBARDI, G.; PERRI, F.; D’INCÀ, R.; ARDIZZONE, S.; RIEGLER, G.; GIACCARI, S.; VECCHI, M.; CASTIGLIONE, F.; GIONCHETTI, P.; VECCHI, M.; CASTIGLIONE, F.; GIONCHETTI, P.; COCCHIARA, E.; VIGNERI, S.; LATIANO, A.; PALMIERI, O.; ANDRIULLI, A. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn’s disease-an IG-IBD study. *Am. J. Gastroenterol.*, v. 100, p. 84–92, 2005.

AOKI, M. P.; CARRERA-SILVA, E. A.; CUERVO, H.; FRESNO, H.; GIRONÈS, N.; GEA, S. Non immune cells contribute to crosstalk between immune cells and inflammatory mediators in the innate response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Parasitol. Res.*, v. 2012, p. 1-13, 2012.

ARANTES, R. M. E.; MARCHE, H. H. F.; BAHIA, M. T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am. J. Pathol.*, v. 164, p. 1361-1368, 2004.

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, v. 177, n. 6, p. 3515-3519, 2006.

BANSAL, K.; BALAJI, K. N. Intracellular pathogen sensor NOD2 programs macrophages to trigger Notch1 activation. *J. Biol. Chem.*, v. 286, p. 5823–5835, 2011.

BARBARA G, DE GIORGIO R, STANGHELLINI V, et al. Pathophysiology of gastrointestinal motor dysfunction in infectious enteritis. *Gastroenterol. Int.*, v. 11(suppl 1) p. 93–6, 1998.

BARRNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, v. 23, p. 16–20, 2007.

BARTHOLOMEU, D. C.; ROPERT, C.; MELO, M. B.; PARROCHE, P.; JUNQUEIRA, C. F.; TEIXEIRA, S. M.; SIROIS, C.; KASPERKOVITZ, P.; KNETTER, C. F.; LIEN, E.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Recruitment and endolysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, v. 181, p. 1333-1344, 2008.

BERESWILL, S.; GRUNDMANN, U.; ALUTIS, M. E.; FISCHER, A.; HEIMESAAT, M. M. *Campylobacter jejuni* infection of conventionally colonized mice lacking nucleotide-oligomerization-domain-2. *Gut Pathog.*, v. 9, p. 5, 2017.

BEVINS, C. L. Innate immune functions of α -defensins in the small intestine. *Dig Dis.*, v. 31, p. 299–304, 2013.

BEYNON, V.; COTOFANA, S.; BRAND, S.; LOHSE, P.; MAIR, A.; WAGNER, S.; MUSSACK, T.; OCHSENKÜHN; FOLWACZNY, M.; FOLWACZNY, C.; GLAS, J.; TÖRÖK, H. P. NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm. Bowel Dis.*, v. 14, n. 8, p. 1033–1040, 2008.

BISWAS, A.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; KOBAYASHI, K. S. Nod2: A key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J. Mol. Med.*, v. 90, p. 15-24, 2012.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.4, p. 389-396, 1962.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 5, p. 220-244, 1963.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 114, p. 103-110, 1997.

BRIONES, M. R.; SOUTO, R. P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the

interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.104, p. 219–32, 1999.

BÜNING, C.; GENSCHEL, J.; BÜHNER, S.; KRÜGER, S.; KLING, K.; DIGNASS, A.; BAIER, P.; BOCHOW. B.; OCKENGA, J.; SCHMIDT, H. H.; LOCHS, H. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther.*, v. 19, p. 1073–1078, 2004.

CAETANO, B. C.; CARMO, B. B.; MELO, M. B.; CERNY, A.; SANTOS, S. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, v. 187, p.1903-1911, 2011.

CAETANO, L. C.; ZUCOLOTO, S.; KAWASSE, L. M.; TOLDO, M. P.; PRADO, J. C. Influence of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in the depletion of esophageal neurons in *Calomys callosus*. *Dig. Dis. Sci.*, v. 51, n. 10, p. 1796-1800, 2006.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 8, p. 227-235, 1966.

CAMPOS, C. F.; CANGUSSÚ, S. D.; DUZ A. L. C.; CARTELLE, C. T.; NOVIELLO, M. L.; VELOSO, V. M.; BAHIA, M. T.; ALMEIDA-LEITE, C. M.; ARANTES, R. M. E. Enteric neuronal damage, intramuscular denervation and smooth muscle phenotype changes as mechanisms of chagasic egacolon: Evidence from a long-term murine Model of *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One*, v. 12, n. 4, e0176224, 2017.

CAMPOS, J. V.; TAFURI, W. L. Chagas enteropathy. *Gut*, v. 14, n. 11, p. 910-919, 1973.

CAMPOS, M. A. S.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCÓPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.*, v. 167, n. 1, p. 416-423, 2001.

CAMPOS, M. A.; CLOSEL, M.; VALENTE, E. P.; CARDOSO, J.E.; AKIRA, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.*, v. 1, p. 1711-8, 2004.

CARUSO, R.; WARNER, N.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*, v. 4, p. 898–908, 2014.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.*, v. 73, p. 203–266, 1998.

CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosyst.*, v. 14, p. 461–481, 1981.

CAVALIER-SMITH, T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 52, p. 297–354, 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.1, p.159-218, 1909.

CHAGAS, C. Tripanosomíase Americana. Forma aguda da moléstia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 8, p. 37-65, 1916.

CHAGAS, C.; VILLELA, E. Forma cardíaca da Tripanossomíase Americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 14, p. 55-61, 1922.

CHAIRATANA, P.; NOLAN, E. M. Defensins, lectins, mucins, and secretory immunoglobulin A: microbe-binding biomolecules that contribute to mucosal immunity in the human gut. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v. 52, p. 45–56, 2017.

CHUA, K. H.; HILMI, I.; NG, C. C.; ENG, T. L.; PALANIAPPAN, S.; LEE, W. S.; GOH, K. L. Identification of NOD2/CARD15 mutations in Malaysian patients with Crohn's disease. *J. Dig. Dis.*, v.10, n. 2, p. 124–130, 2009.

CHUA, K. H.; NG, C. C.; HILMI, I.; GOH, K. L. Co-inheritance of variants/mutations in Malaysian patients with Crohn's disease. *Genet. Mol. Res.*, v. 11, n. 3, p. 3115–3121, 2012.

CLEVERS, H. C.; BEVINS, C. L. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 75, p. 289–311, 2013.

CORTEZ, M. R.; PINHO, A. P.; CUERVO, P.; ALFARO, F.; SOLANO, M.; XAVIER, S. C. C.; D'ANDREA, P. S.; FERNANDES, O.; TORRICO, F.; NOIREAU, F.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba. Bolivia. *Exp. Parasitol.*, v. 114, n. 4, p. 305–313, 2006.

COSSIO, P. M.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; KREUTZER, E.; CANDIOLO, B.; ARANA, R. M. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, v. 49, p. 13-21, 1974.

COULOMBE, F.; FIOLA, S.; AKIRA, S.; CORMIER, Y.; GOSSELIN, J. Muramyl dipeptide induces NOD2-dependent Ly6C^{high} monocyte recruitment to the lungs and protects against influenza virus infection. *PLoS One*, v. 7, n. 5, e36734, 2012.

COURA J. R. Determinantes epidemiológicos da doença de Chagas no Brasil: a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.83, p. 392–402, 1988.

COUTURIER-MAILLARD, A.; SECHER, T.; REHMAN, A.; NORMAND, S.; DE ARCANGELIS, A.; HAESLER, R.; HUOT L.; GRANDJEAN, T.; BRESSENOT, A.; DELANOYE-CRESPIN, A.; GAILLOT, O.; SCHREIBER, S.; LEMOINE, Y.; RYFFEL, B.; HOT, D.; NÚÑEZ, G.; CHEN, G.; ROSENSTIEL, P.; CHAMAILLARD, M. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J. Clin. Invest.*, v. 123, n. 2, p. 700–711, 2013.

CROUCHER, P. J.; MASCHERETTI, S.; HAMPE, J.; HUSE, K.; FRENZEL, H.; STOLL, M.; LU, T.; NIKOLAUS, S.; YANG, S. K.; KRAWCZAK, M.; KIM, W. H.; SCHREIBER, S. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 11, p. 6–16, 2003.

CUNA, W. R., CUNA, C. R. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 503-506, 1995.

CURA, C. I.; LUCERO, R. H.; BISIO, M.; OSHIRO, E.; FORMICHELLI, L.B.; BURGOS, J. M.; LEJONA, S.; BRUSÉS, B. L.; HERNÁNDEZ, D. O.; SEVERINI, G. V.; VELAZQUEZ, E.; DUFFY, T.; ANCHART, E.; LATTES, R.; ALTICHEH, J.; FREILIJ, H.; DIEZ, M.; NAGEL, C.; VIGLIANO, C.; FAVALORO, L.; FAVALORO, R. R.; MERINO, D. E.; SOSA-ESTANI, S.; SCHIJMAN, A. G. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*, v. 139, n. 4, p. 516-21, 2012.

CURA, C. I.; MEJIA-JARAMILLO, A. M.; DUFFY, T.; BURGOS, J. M.; RODRIGUERO, M.; CARDINAL, M. V.; KJOS, S.; GURGEL-GONÇALVES, R.; BLANCHET, D.; DE PABLOS, L. M.; TOMASINI, N.; SILVA, A.; RUSSOMANDO, G.; CUBA CUBA, C. A.; AZNAR, C.; ABATE, T.; LEVIN, M. J.; OSUNA, A.; GÜRTLER, R. E.; DIOSQUE, P.; SOLARI, A.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; SCHIJMAN, A. G. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int. J. Parasitol.*, v.40, n. 14, p. 1599–1607, 2010.

DEL PUERTO, R.; NISHIZAWA, J. E.; KIKUCHI, M.; IIHOSHI, N.; ROCA, Y.; AVILAS, C.; GIANELLA, A.; LORA, J.; VELARDE, F. U. G.; RENJEL, L. A.; MIURA, S.; HIGO, H.; KOMIYA, N.; MAEMURA, K.; HIRAYAMA, K. Lineage analysis of circulating

Trypanosoma cruzi parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 4, n. 5, e687, 2010.

DIAS, E; LARANJA, F. S.; MIRANDA, A.; NOBREGA, G. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, v. 14, p. 1035–1060, 1956.

DIAS, J. C. P. Natural history of Chagas disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 65, p. 359-366, 1995.

DIAS, J. C. P.; CAMACHO, L. A. B.; SILVA, J. C.; MAGALHÃES, J. S.; KRIEGER, H. Esofagopatia chagásica na area de Bambuí, MG, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 16, p. 1, 1983.

DIAS, J. C.; RAMOS Jr, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R. et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 49, Supplement I, 2016.

DUARTE, R.; SILVA, A. M.; VIEIRA, L. Q.; AFONSO, L. C.; NICOLI, J. R. *Trypanosoma cruzi*: Influence of predominant bacteria from indigenous digestive on experimental infection in mice. *Exp. Parasitol.*, v.111, p. 87-96, 2005.

DUTRA, W. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; CANÇADO, J. R.; PINTO-DIAS, J. C.; BRENER, Z.; FREEMAN JÚNIOR, G. L.; COLLEY, D. G.; GAZZINELLI, G.; PARRA, J. C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int. Immunol.*, v. 6, p. 499-506, 1994.

ESTERS, N.; PIERIK, M.; VAN STEEN, K.; VERMEIRE, S.; CLAESSENS, G.; JOOSSENS, S.; VLIETINCK, R.; RUTGEERTS, P. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, v. 99, p. 299–305, 2004.

FONTES, C. E. R.; ABREU A. P.; GASPARIM A. Z. Radiological study of megacolon in *Trypanosoma cruzi* infected rats. *Arq. Bras. Cir. Dig.*, v. 31, n. 1, e1341, 2018.

FRANCHI, L.; WARNER, N.; VIANI, K.; NUÑEZ, L. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.*, v. 227, p. 106-128, 2009.

FRITZ, J. H.; GIRARDIN, S. E.; FITTING, C.; WERTS, C.; MENGIN-LECREULX, D.; CAROFF, M.; CAVAILLON, J. M.; PHILPOTT, D. J.; ADIB-CONQUY, M. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.*, v.35, n. 8, p. 2459–2470, 2005.

GANZ, T.; LEHRER, R. I. Defensins. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 6, p. 584-89, 1994.
GARCIA, S.B.; PAULA, J.S.; GIOVANNETTI, G.S.; ZENHA, F.; RAMALHO, E.M.; ZUCOLOTO, S.; SILVA, J.S.; CUNHA, F. Q. Nitric oxide is involved in the lesions of the

peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.*, v. 93, p. 191-7, 1999.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.*, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

GOETHEL, A.; CROITORU, K.; PHILPOTT, D. J. The interplay between microbes and the immune response in inflammatory bowel disease. *J. Physiol.*, v. 596, n. 17, p. 3869-3882, 2018.

GOIN, J. C.; LEIROS, C. P.; BORDA, E.; STERIN-BORDA, L. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *Faseb J.*, v. 11, n. 1, p. 77-83, 1997.

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, L.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect. Immun.*, v. 7, p. 1185-1193, 2003.

GUEDES, P. M. M.; GUTIERREZ, F. R. S.; MAIA, F. L.; MILANEZI, C. M.; SILVA, G. K.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 4, n. 2, e604, 2010.

GUEDES, P. M. M.; GUTIÉRREZ, F. R. S.; SILVA, G. K.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; RASSI Jr, A.; RASSI, A.; SCHMIDT, A.; MACIEL, B. C.; MARIN-NETO, J. A.; SILVA, J. S. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 6, n. 4, e1630, 2012.

HAMPL, V.; HUG, L.; LEIGH, J. W.; DACKS, J. B.; LANG, B. F.; SIMPSON, A. G.; ROGER, A. J. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 106, p. 3859-3864, 2009.

HERESBACH, D.; GICQUEL-DOUABIN, V.; BIREBENT, B.; D'HALLUIN, P. N.; HERESBACH-LE BERRE, N.; DREANO, S.; SIPROUDHIS, L.; DABADIE, A.; GOSSELIN, M.; MOSSER, J.; SEMANA, G.; BRETAGNE, J. F.; YAOUANQ, J.

NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 16, n. 1, p. 55–62, 2004.

HISAMATSU, T.; SUZUKI, M.; REINECKER, H. C.; NADEAU, W. J.; MCCORMICK, B. A.; PODOLSKY, D. K. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, v. 124, p. 993-1000, 2003.

HOEFKENS, E.; NYS, K.; JOHN, J. M.; VAN, STEEN K.; ARIJS, I.; VAN, D. G. J.; VAN, A. G.; AGOSTINIS, P.; RUTGEERTS, P.; VERMEIRE, S.; CLEYNEN, I. Genetic association and functional role of Crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress, *Autophagy*, v.12, p. 2046-2055, 2013.

HOLSCHER, C.; KÖHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 1208-1215, 1998.

HONIGBERG, B. M. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In LUDVÍK, J.; LOM, J.; VÁVRA, J. Progress in protozoology: proceedings of the first International congress on protozoology held at Prague. *Academic Press.*, 1963.

HUGOT, J. P.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; CEZARD, J. P.; BELAICHE, J.; ALMER, S.; TYSK, C.; O'MORAIN, C. A.; GASSULL, M.; BINDER, V.; FINKEL, Y.; CORTOT, A.; MODIGLIANI, R.; LAURENT-PUIG, P.; GOWER-ROUSSEAU, C.; MACRY, J.; COLOMBEL, J. F.; SAHBATOU, M.; GILLES, T. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, v. 411, p. 599–603, 2001.

IANTORNO, G.; BASSOTTI, G.; KOGAN, Z.; LUMI, C. M.; CABANNE, A. M.; FISOGNI, S.; VARRICA, L. M.; BILDER, C. R.; MUNÓZ, J. P.; LISERRE, B.; MORELLI, A.; VILLANACCI, V. The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.31, p. 460-468, 2007.

INOHARA, N.; CHAMAILLARD; MCDONALD, C.; NUÑEZ, L. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 74, p. 355–383, 2005.

INOUE, N.; TAMURA, K.; KINOCHI, Y.; FUKUDA, Y.; TAKAHASHI, S.; OGURA, Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G.; KISHI, Y.; KOIKE, Y.; SHIMOSEGAWA, T.; SHIMOYAMA, T.; HIBI, T. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, v. 123, p. 86–89, 2002.

JEONG, Y. J.; KANG, M. J.; LEE, S. J.; KIM, C. H.; KIM, J. C.; KIM, T. H.; KIM, D. J.; KIM, D.; NÚÑEZ, G.; PARK, J. H. Nod2 and Rip2 contribute to innate immune responses in mouse neutrophils. *Immunology*, v.143, p. 269–276, 2014.

JIANG, W.; WANG, X.; ZENG, B.; LIU, L.; TARDIVEL, A.; WEI, H.; HAN, J.; MACDONALD, H. R.; TSCHOPP, J.; TIAN, Z.; ZHOU, R. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Exp. Med.*, v. 21, 210(11):2465-76, 2013. Erratum in: *J. Exp. Med.*, v. 18, 210(12):2791, 2013.

JIANG, W.; WANG, X.; ZENG, B.; LIU, L.; TARDIVEL, A.; WEI, H.; HAN, J.; MACDONALD, H. R.; TSCHOPP, J.; TIAN, Z.; ZHOU, R. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Exp. Med.*, v. 210, p. 2465–2476, 2013.

JUDGE, T.; LICHTENSTEIN, G. R. The NOD2 gene and Crohn's disease: Another triumph for molecular genetics. *Gastroenterology*, v. 122, p. 826–828, 2002.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.*, v.21, p. 317-337, 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, v. 11, p. 373-384, 2010.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines: IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol.*, v. 153, p. 4948-4958, 1994.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microb. Infect.*, v.12, p. 511-517, 2010.

KENT, W. S. A manual of the infusoria, including a description of all known flagellate, ciliate, and tentaculiferous protozoa, British and foreign and an account of the organization and affinities of the sponges. *London D. Bogue*, v. 1, p. 218-220, 1880.

KIM, Y. G.; KAMADA, N.; SHAW, M. H.; WARNER, N.; CHEN, G. Y.; FRANCHI, L.; NÚÑEZ, G. The NOD2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity*, v. 34, p. 769–780, 2011.

KLEISEN, C. M.; BORST, P.; WEIJERS, P. J. The Structure of kinetoplast DNA. I. Properties of the intact multi-circular complex from *Crithidia luciliae*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 390, p. 155-167, 1975.

KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, v. 6, p.63-116, 1968.

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

KÖBERLE, F. Hiperplasia muscular no megaesôfago chagásco. *Rev Goiana Med.*, v. 6, p.147-153, 1960.

KÖBERLE, F.; NADOR, E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Revista Paulista de Medicina/São Paulo Med. J.*, v. 47, p. 643-661, 1955.

KOGA, R.; HAMANO, S.; KUWATA, H.; ATARASHI, K.; OGAWA, H.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, H.; TAKEDA, K. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, v. 177, p. 7059-7066, 2006.

KRETTLI, A. U.; WEISZ-CARRINGTON, P.; NUSSENZWEIG, R. S. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.*, v.37, p. 416-423, 1979.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L. E.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: Blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65, p. 435-441, 2001.

LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L. E.; PEDROSA, A. L.; CREMA, E.; GALVÃO, L. M. C.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 2167-2171, 2006.

LAKATOS, P. L.; FISCHER, S.; LAKATOS, L.; GAL, I.; PAPP, J. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? *World J. Gastroenterol.*, v. 28, p. 1829-1841, 2006.

LECAT, A.; PIETTE, J.; LEGRAND-POELS, S. The protein Nod2: an innate receptor more complex than previously assumed. *Biochem. Pharmacol.*, v. 80, p. 2021–2031, 2010.

LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D. N.; LIMA, M. T.; GATTASS, C. R. *Trypanosoma cruzi* paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp. Parasitol.*, v. 84, p. 16-27, 1996.

LEONG, R. W.; ARMUZZI, A.; AHMAD, T.; WONG, M. L.; TSE, P.; JEWELL, D. P.; SUNG, J. J. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol. Ther.*, v. 17, p. 1465–1470, 2003.

LESAGE, S.; ZOUALI, H.; CÉZARD, J. P.; COLOMBEL, J. F.; BELAICHE, J.; ALMER, S.; TYSK, C.; O'MORAIN, C.; GASSULL, M.; BINDER, V.; FINKEL, Y.;

MODIGLIANI, R.; GOWER-ROUSSEAU, C.; MACRY, J.; MERLIN, F.; CHAMAILLARD, M.; JANNOT, A. S.; THOMAS, G.; HUGOT, J. P. CARD15/ NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 70, p. 845-857, 2002.

LI, M.; GAO, X, GUO, C. C.; WU, K. C.; ZHANG, X.; HU, P. J. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, v. 14, p. 4923–4927, 2008.

LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MONTEIRO, R. V.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Exp. Parasitol.*, v. 116, p. 150–155, 2007.

LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; ACOSTA, N.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; SEGOVIA, M.; VARGAS, J.; TORRICO, F.; MILES, M. A.; GAUNT, M. W. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas' disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 3, n. 9, e510, 2009.

LOPES, E. R.; ROCHA, A.; MENESES, A.C.; LOPES, M. A.; FATURETO, M.C.; LOPES, G. P.; CHAPADEIRO, E. Prevalence of visceromegalies in necropsies carried out in Triângulo Mineiro from 1954 to 1988. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 22, p. 211-215, 1989.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W.L. & PRATA, A. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. In E.R. Lopes, E. Chapadeiro, P. Raso & W.L. Tafuri. Bogliolo Patologia, 4.ed. Rio de Janeiro, *Guanabara Koogan*, 1987.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today.*, v. 14, p. 119–124, 1998.

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F. L.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. *Trypanosoma cruzi* - infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, v. 12, p. 3003-3008, 2000.

MAGALHÃES, J. G.; RUBINO, S. J.; TRAVASSOS, L. H.; LE BOURHIS, L.; DUAN, W.; SELLGE, G.; GEDDES, K.; REARDON, C.; LECHMANN, M.; CARNEIRO, L. A.; SELVANANTHAM, T.; FRITZ, J. H.; TAYLOR, B. C.; ARTIS, D.; MAK, T. W.; COMEAU, M. R.; CROFT, M.; GIRARDIN, S. E.; PHILPOTT, D. J. Nucleotide oligomerization domain-containing proteins instruct T cell helper type 2 immunity through stromal activation. *Proc. Nat.l Acad. Sci. U S A.*, v.108, p.14896–14901, 2011.

MARIANO, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; PAVANELLI, W. R.; MILANEZI, C. M.; CAVASSANI, K.; MOREIRA, A. P.; FERREIRA, B. R.; CUNHA, F. Q.; CARDOSO, C. R.; SILVA, J. S. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.*, v. 10, p. 825-833, 2008.

MARINHO, C. R. F.; BASTOS, K. R.; SARDINHA, L. R.; GRISOTTO, M. G.; LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M. Challenge of *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice with trypomastigotes activates the immune system and reduces subpatent parasitemia levels. *J. Parasitol.*, v. 90, p. 516-523, 2004.

MARONA, H. R.; LUCCHESI, M. B. Protocol to refine intestinal motility test in mice. *Lab Anim.*, v. 38, p. 257-260, 2004.

MARTINS, K.; ANDRADE, C. M.; BARBOSA-SILVA, A. N.; NASCIMENTO, G. B.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; CÂMARA, A. C. J. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 39, p. 68-75, 2015.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N. JR.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.*, v. 130, p. 167-74, 2014.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics (São Paulo)*, v. 64, p. 1219-1224, 2009.

MCCALL, L. I.; TRIPATHI, A.; VARGAS, F.; KNIGHT, R.; DORRESTEIN, P. C.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.12, n. 3, e0006344, 2018.

MCDONALD, C.; INOHARA, N.; NUNEZ, G. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J. Biol. Chem.*, v. 280, p. 20177-20180, 2005.

MENEGHELLI, U. G. Chagasic enteropathy. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 37, p. 252-60, 2004.

MENEGHELLI, U.G. Chagasic enteropathy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, p. 252-260, 2004.

MEZA, S. K. L.; KANESHIMA, E. N.; SILVA, S. O.; GABRIEL, M.; DE ARAÚJO, S. M.; GOMES, M. L.; MONTEIRO, W. M.; BARBOSA, M. G. V.; DE ORNELAS TOLEDO, M. J. Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Exp. Parasitol.*, v. 146, p. 34-42, 2014.

MONTEIRO, W. M.; MAGALHÃES, L. K.; SANTANA-FILHO, F. S.; BORBOREMA, M.; SILVEIRA, H.; BARBOSA, M. G. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop. Med. Int. Health.*, v. 15, p. 1049–1051, 2010.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 54, p. 1861-1875, 2004.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 Cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 145-173, 1989.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 14, p. 667–685, 2014.

NAKAMURA, K.; SAKURAGI, N.; TAKAKUWA, A.; AYABE, T. Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Biosci. Microbiota Food Health*, v. 35, p. 57–67, 2016.

NASCIMENTO, R. D.; LISBOA, A. S.; FUJIWARA, R. T.; FREITAS, M. A. R.; ADAD, S. J.; OLIVEIRA, R. C.; D'AVILA REIS, D.; SILVEIRA, A. B. Characterization of enterogial cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus. *Hum. Pathol.*, v. 41, p. 528-534, 2010.

NASCIMENTO, R. S.; VALENTE, S. R.; OLIVEIRA, L. C. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in chronic chagasic patients, and in the rural and urban population from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.44, p. 251-254, 2002.

NATIVIDAD, J. M. M.; PETIT, V.; HUANG, X.; DE PALMA, G.; JURY, J.; SANZ, Y.; PHILPOTT, D.; GARCIA-RODENAS, C. L.; MCCOY, K. D.; VERDU, E. F. Comensal and probiotic bacteria influence intestinal barrier function and susceptibility to colitis in Nod1^{-/-}; Nod2^{-/-} mice. *Inflamm. Bowel Dis.*, v. 18, p.1434-1446, 2012.

OGURA, Y.; BONEN, D. K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D. L.; CHEN, F. F.; RAMOS, R.; BRITTON, H.; MORAN, T.; KARALIUSKAS, R.; DUERR, R. H.; ACHKAR, J. P.; BRANT, S. R.; BAYLESS, T. M.; KIRSCHNER, B. S.; HANAUER, S. B.; NUNEZ, G.; CHO, J. H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, v. 411, p. 603– 606, 2001a.

OGURA, Y.; INOHARA, N.; BENITO, A.; CHEN, F. F.; YAMAOKA, S.; NUNEZ, L. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 4812-4818, 2001b.

OLIVEIRA, A. C.; DE ALENCAR, B. C.; TZELEPIS, F.; KLEZEWSKY, W.; SILVA, R. N.; NEVES, F. S.; CAVALCANTI, G. S.; BOSCARDIN, S.; NUNES, M. P.; SANTIAGO, M. F.; NÓBREGA, A.; RODRIGUES, M. M.; BELLIO, M. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog.*, v. 6, n. 4, e1000870, 2010.

OLIVEIRA, A. C.; PEIXOTO, J. R.; DE ARRUDA, L. B.; CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T.; AKIRA, S.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA PREVIATO, G.; NOBREGA, U. M.; BELLIO, M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.*, v. 173, p. 5688-5696, 2004.

OLIVEIRA, G. M.; MEDEIROS, M. M.; BATISTA, W. S.; SANTANA, R.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; SOUZA, A. P. Applicability of the use of charcoal for the evaluation of intestinal motility in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.*, v. 102, n. 4, p. 747-750, 2008.

ORTIZ-FERNANDEZ, L., GARCIA-LOZANO, J. R.; MONTES-CANO, M. A.; CONDE-JALDON, M.; LEO, E.; ORTEGO-CENTENO, N., GÓMEZ-GARCÍA, M.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, F. J.; MÁRQUEZ, J. L.; ESPINOSA, G.; GRAÑA-GIL, G.; SÁNCHEZ-BURSÓN, J.; JULIÁ, M. R.; BLANCO, R.; BARNOSI-MARÍN, A. C.; SOLANS, R.; FANLO, P.; RODRÍGUEZ-CARBALLEIRA, M.; CAMPS, T.; CASTAÑEDA, S.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ-ESCRIBANO, M. F. Association of haplotypes of the TLR8 locus with susceptibility to Crohn's and Behcet's diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.*, v. 33, p. S117-122, 2015.

OSTERMAYER, A. L.; PASSOS, A. D. C.; SILVEIRA, A. C.; FERREIRA, A. W.; MACEDO, A.; PRATA, A. R. The national survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001-2008). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 44, Supl. II, p. 108-121, 2011.

PADILLA A. M; BUSTAMANTE J. M.; TARLETON R. L. CD8+ T cells in infection. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 21, p. 385-390, 2008.

PAJECKI, D.; ZILBERSTEIN, B.; SANTOS, M. A.; UBRIACO, J. A.; QUINTANILHA, A. G.; CECCONELLO, I.; GAMA-RODRIGUES, J. Microbiota de

Megaesôfago: uma análise qualitativa e quantitativa. *J. Gastrointest. Surg.*, v.6, p. 723-729, 2002.

PEREIRA, N. S. Correlação entre a expressão de receptores da resposta imune inata e as formas clínicas na doença de Chagas humana. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

PEREIRA, N. S.; QUEIROGA, T. B. D.; NUNES, D. F.; ANDRADE, C. M.; NASCIMENTO, M, S. L.; DO-VALLE-MATTA, M. A.; CÂMARA, A. C. J.; GALVÃO, L. M. C.; GUEDES, P. M. M.; CHIARI, E. Innate immune receptors over expression correlate with chronic chagasic cardiomyopathy and digestive damage in patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 12, n. 7, e0006589, 2018.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 14, p. 141–153, 2014.

PETNICKI-OCWIEJA, T.; HRNCIR, T.; LIU, Y. J.; BISWAS, A.; HUDCOVIC, T.; TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; KOBAYASHI, K. S. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 106, p. 15813-15818, 2009.

PINHEIRO, S. W.; RUA, A. M.; ETCHEBEHERE, R. M.; CANÇADO, C. G.; CHICA, J. E.; LOPES, E. R.; ADAD, S. J. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, p. 461-466, 2003.

PINTO, N. X.; TORRES-HILLERA, M. A.; MENDOZA, E.; LEÓN-SARMIENTO, F. E. Immune response, nitric oxide, autonomic dysfunction and stroke: a puzzling linkage on *Trypanosoma cruzi* infection. *Med. Hypotheses*, v.58, p. 374-377, 2002.

PIZZI, T.; PRAGUER, R. Inmunidad a la sobre infección inducida mediante cultivo de *Trypanosoma cruzi* de virulência atenuada. *Bol. Inform. Parasitar. Chilenas*, v. 7, p. 20-21, 1952.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.*, v. 1, p. 92-100, 2001.

PROELL, M.; RIEDL, S. J.; FRITZ, J. H.; ROJAS, A. M.; SCHWARZENBACHER, R. The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS One*, v. 3, n. 4, e2119, 2008.

PUGAZHENDHI, S.; AMTE, A.; BALAMURUGAN, R.; SUBRAMANIAN, V.; RAMAKRISHNA, B. S. Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian J. Gastroenterol.*, v. 27, p. 201–203, 2008.

RAMÍREZ, J. C.; CURA, C. I.; MOREIRA, O. C.; LAGES-SILVA, E.; JUIZ, N.; VELÁZQUEZ, E.; RAMÍREZ, J. D.; ALBERTI, A.; PAVIA, P.; FLORES-CHÁVEZ, M. D.; MUÑOZ-CALDERÓN, A.; PÉREZ-MORALES, D.; SANTALLA, J.; GUEDES, P. M. M.; PENEAU, J.; MARCET, P.; PADILLA, C.; CRUZ-ROBLES, D.; VALENCIA, E.; CRISANTE, G. E.; GREIF, G.; ZULANTAY, I.; COSTALES, J. A.; ALVAREZ-MARTÍNEZ, M.; MARTÍNEZ, N. E.; VILLARROEL, R.; VILLARROEL, S.; SÁNCHEZ, Z.; BISIO, M.; PARRADO, R.; GALVÃO, L.M.C.; DA CÂMARA, A. C. J.; ESPINOZA, B.; ALARCÓN DE NOYA, B.; PUERTA, C.; RIARTE, A.; DIOSQUE, P.; SOSA-ESTANI, S.; GUHL, F.; RIBEIRO, I.; AZNAR, C.; BRITTO, C.; YADÓN, Z. E.; SCHIJMAN, A. G. Analytical validation of qPCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *J. Mol. Diagn.*, v. 17, p. 605-615, 2015.

RASSI Jr, A.; RASSI, A. G.; RASSI, S.G.; RASSI JR, L.; RASSI, A. Ventricular arrhythmia in Chagas disease. Diagnostic, prognostic, and therapeutic features. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 65 p. 377. 1995.

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lancet.*, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

REHMAN, A.; SINA, C.; GAVRILOVA, O.; HÄSLER, R.; OTT, S.; BAINES, J. F.; SCHREIBER, S.; ROSENSTIEL, P. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial. *Gut*, v. 60, p. 1354-1362, 2011.

REIS, M. M.; HIGUCHI, M. D. E.; BENVENUTI, L. A.; AIELLO, V. D.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, L.; PILEGGI, F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *J. Clin. Immunol. Immunopathol.*, v. 83, p. 165-172, 1997.

REZENDE, J. M. Forma digestiva da doença de Chagas. *Rev Goiana Med.*, v. 5, p. 193-227, 1959.

REZENDE, J. M.; LAUAR, K. L.; OLIVEIRA, A. R. Aspectos clínicos e radiológicos da aperistalsis do esôfago. *Rev. Bras. Gastroenterol.*, v.12, p. 247-262, 1960.

REZENDE, J. M.; MOREIRA H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: Brener Z; Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, p. 297-343, 2000.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: Brener Z; Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, p. 297-343, 2000.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; MARQUEZ, J. O.; VON GAL FURTADO, C. C.; RAMOS DE OLIVEIRA, J. C.; MARTINS, A. R.; KÖBERLE, F. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed Parasitol.*, v. 30, p. 19-23, 1979.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *J. Parasitol. Res.*, v. 2012, p. 1-12, 2012. doi:10.1155/2012/507874

SANCHEZ-MUNOZ, F.; FONSECA-CAMARILLO, G.; VILLEDA-RAMIREZ, M. A.; MIRANDA-PEREZ, E.; MENDIVIL, E. J.; BARRETO-ZÚÑIGA, R.; URIBE, M.; BOJALIL, R.; DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J.K.; Transcript levels of Toll-Like Receptors 5, 8 and 9 correlate with inflammatory activity in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol.*, v. 11, p. 138, 2011.

SANTANA, R. O. Susceptibilidade do *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae Triatominae) à infecção por isolados do *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, trypanosomatidae) do estado do Rio Grande do Norte. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, v. 134, p. 577-594, 2008.

SARUTA, M.; TARGAN, S. R.; MEI, L.; IPPOLITI, A. F.; TAYLOR, K. D.; ROTTER, J.I. High-frequency haplotypes in the X chromosome locus TLR8 are associated with both CD and UC in females. *Inflamm. Bowel. Dis.*, v. 15, p. 321-327, 2009.

SCHNEIDER, L.C.L.; ARAÚJO, S.M.; BUTTOW, N.C. *Trypanosoma cruzi* (cepa CL) promove perda neuronal no plexo mioentérico do cólon de ratos. *Saúde e Pesquisa, Maringá (PR)*, v. 9, p. 235 – 242, 2016.

SEKSIK, P.; RIGOTTIER-GOIS, L.; GRAMET, G.; SUTREN, M.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; JIAN, R.; DORÉ J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, v. 52, p. 237-242, 2003.

SHANAHAN, M. T.; CARROLL, I. M.; GROSSNIKLAUS, E.; WHITE, A.; VON, FURSTENBERG, R. J.; BARNER, R.; FODOR, A. A.; HENNING, S. J.; SARTOR, R. B.; GULATI, A. S. Mouse Paneth cell antimicrobial function is independent of Nod2. *Gut*, v. 63, p. 903–910, 2014.

SIDIQ, T.; YOSHIHAMA, S.; DOWNS, I.; KOBAYASHI, K. S. Nod2: A critical regulator of ileal microbiota and Crohn's disease. *Front Immunol.*, v. 7, p. 367, 2016.

SILVA, G. K.; GUTIERREZ, F. R.; GUEDES, P. M. M.; HORTA, C. V.; CUNHA, L. D.; MINEO, T. W.; SANTIAGO-SILVA, J.; KOBAYASHI, K. S.; FLAVELL, R. A.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, v. 184, p. 1148-1152, 2010.

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.*, v. 175, p. 169-174, 1992.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J. Exp. Med.*, v. 174, p. 539-545, 1991.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. 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.*, v. 63, p. 4862-4867, 1995.

SILVEIRA, A. B. M.; ARANTES, R. M. E.; VAGO, A. R.; LEMOS, E. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; D'AVILA-REIS, D. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology*, v. 131, p. 627-634, 2005.

SILVEIRA, A. B. M.; FREITAS, M. A. R.; OLIVEIRA, E. C.; NETO, S. G.; LUQUETTI, A. O.; FURNESS, J. B.; CORREA-OLIVEIRA, R.; D'ÁVILA-REIS, D. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. *Hum. Pathol.*, v. 40, p. 244-251, 2009.

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

SOUZA, P. R.; GUIMARÃES, F. R.; SALES-CAMPOS, H. W.; BONFÁ, G.; NARDINI, V.; CHICA, J. E. L.; TURATO, W. M.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S.; CARDOSO, C. R. B. Absence of NOD2 receptor predisposes to intestinal inflammation by a deregulation in the immune response in hosts that are unable to control gut dysbiosis. *Immunobiology*, v. 223, n. 10, p. 577-585, 2018.

SOUZA, P. R.; GUIMARÃES, R.; SALES-CAMPOS, H.; BONFÁ, G.; NARDINI, V.; CHICA, E. L.; TURATO, W. M.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S.; CARDOSO, C. R. B. Absence of NOD2 receptor predisposes to intestinal inflammation by a deregulation in the

immune response in hosts that are unable to control gut dysbiosis. *Immunobiol.*, v. 223, p. 577-585, 2018.

STEENHOLDT, C.; ANDRESEN, L.; PEDERSEN, G.; HANSEN, A.; BRYNSKOV, J. Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, v. 144, p. 195-204, 2009.

SUNDIN, O. H.; MENDOZA-LADD, A.; ZENG, M.; DIAZ-ARÉVALO, D.; MORALES, E.; FAGAN, B. M.; ORDOÑEZ, J.; VELEZ, P.; ANTONY, N.; MCCALLUM, R. W. The human jejunum has an endogenous microbiota that differs from those in the oral cavity and colon. *BMC Microbiol.*, v. 17, n. 160, p. 1-17, 2017.

TADA, H.; AIBA, S.; SHIBATA, K.; OHTEKI, T.; TAKADA, H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 7967–7976, 2005.

TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 13, p. 76-91, 1971.

TAFURI, W. L.; RASO, P. Anatomia Patológica. In: Raia AA. (ed) Manifestações digestivas da moléstia de Chagas. 1ª edição. *Savvier*, São Paulo, p.60-79, 1983.

TAKEUCHI, O., AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, v. 140, p. 805-820, 2010.

TARLETON, R. L. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.*, v. 73, p. 106-109, 1991.

TARLETON, R. L.; SOL, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.*, v. 62, p. 1820-1829, 1994.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease-a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 463-491, 2006.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 262-265, 2002.

TOMASINI, N.; LAUTHIER, J. F.; MONJE-RUMI, M.; RAGONE, P. G.; ALBERTI-D'AMATO, A. A.; BRANDAN, C. P.; CURA, C. I.; SCHIJMAN, A. G.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; BASOMBRÍO, M. A.; FALLA, A.; HERRERA, C.; GUHL, F.; DIOSQUE, P. Interest and limitations of spliced leader intergenic region sequences for analyzing *Trypanosoma cruzi* I phylogenetic diversity in the Argentinean Chaco. *Infect. Genet. Evol.*, v. 11, p. 300-307, 2010.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med. (Berl)*., v. 84, p. 712-25, 2006.

UMEZAWA, E. S.; NASCIMENTO, M. S.; KESPER, N. J. R.; COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A. C.; CAMARGO, M. E. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microb.*, v. 34, p. 2143-2147, 1996.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; D'ÁVILA REIS, D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES Jr, S.; MOREIRA, M. C. V.; BRASILEIRO-FILHO, G.; PENA, S. D. J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.*, v. 156, n. 5, p. 1805-1809, 2000.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; D'ÁVILA REIS, D.; SILVA, G. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, v. 348, p. 891-892, 1996.

VAGO, A. R.; SILVA, D. M.; ADAD, S. J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; D'ÁVILA REIS, D. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the esophagus of patients without megaesophagus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 97, n. 3, p. 308-309, 2003.

VAZQUEZ, B. P.; VAZQUEZ, T. P.; MIGUEL, C. B.; RODRIGUES, W. F.; MENDES, M. T.; OLIVEIRA, C. J.; CHICA, J. E. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. *Parasite Vectors*, v. 8, n. 206, p. 1-12, 2015.

VIRREIRA, M.; SERRANO, G.; MALDONADO, L.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from Bolivian patients. *Acta Trop.*, v. 100, p. 252-255, 2006.

WEHKAMP, J.; HARDER, J.; WEICHENTHAL, M.; SCHWAB, M.; SCHÄFFELER, E.; SCHLEE, M.; HERRLINGER, K. R.; STALLMACH, A.; NOACK, F.; FRITZ, P.; SCHRÖDER, J. M.; BEVINS, C. L.; FELLERMANN, K.; STANGE, E. F. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, v.53, p. 1658-1664, 2004.

WEHKAMP, J.; SALZMAN, N. H.; PORTER, E.; NUDING, S.; WEICHENTHAL, M.; PETRAS, R. E.; SHEN, B.; SCHAEFFELER, E.; SCHWAB, M.; LINZMEIER, R.; FEATHERS, R. W.; CHU, H.; LIMA, H. JR.; FELLERMANN, K.; GANZ, T.; STANGE, E. F.; BEVINS, C. L. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 102, p. 18129-18134, 2005.

WEHKAMP, J.; STANGE, E. F. Paneth's disease. *J. Crohns Colitis*, v. 4, p. 523-531, 2010.

WIRTH, J. J., KIERSZENBAUM, F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, v. 134, p. 1989-1993, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Epidemiology: Chagas disease (American trypanosomiasis). *Disponível em:* <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>, 2018.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.*, v. 28, p. 105-112, 1998.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* v.184. p. 38-52, 2018.

8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

8.1 Artigos publicados

- PEREIRA, N. S.; QUEIROGA, T. B. D.; NUNES, D. F. ; ANDRADE, C. M.; NASCIMENTO, M. S. L.; DO-VALLE-MATTA, M. A.; CÂMARA, A. C. J.; GALVÃO, L. M. C.; GUEDES, P. M. M.; CHIARI, E. Innate immune receptors over expression correlate with chronic chagasic cardiomyopathy and digestive damage in patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2018.
- GUEDES, P.M.M.; ANDRADE, C. M.; NUNES, D. F.; PEREIRA, N. S.; QUEIROGA, T. B.; MACHADO-COELHO G. L. L.; NASCIMENTO, M. S. L.; DO-VALLE-MATTA M. A.; CÂMARA, A. C. J.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.

Inflammation enhances the risks of stroke and death in chronic Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Online)., v.10, p.e0004669 - , 2016.

8.2 Apresentações em Eventos Científicos

- PEREIRA, N. S.; QUEIROGA, T. B.; SILVA DD; NASCIMENTO, M,S,L.; ANDRADE, C. M.; ZAMBONI, D.; ARANTES, R.M.E.; CHIARI, E.; CAMARA, A. C. J.; GALVAO, L. M.; GUEDES. P.M.M. The Role of NOD2 Receptor in The Pathogenesis of the digestive system in Chagas disease In: XLIII Congress of the Brazilian Society of Immunology and XI Extra Section of Clinical Immunology, 2018, Ouro Preto, 2018.
- PEREIRA, N. S.; ARANTES, R. M. E.; ANDRADE, C. M.; NUNES, D. F.; QUEIROGA, T. B.; SILVA D.D.; CHIARI, E.; ZAMBONI, D.; CÂMARA, A. C. J.; GALVÃO, L. M. C.; GUEDES, P. M. M. NOD2 Protege contra o desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas In: *VIII Encontro de Pesquisa em Parasitologia Prof. Edward Félix da Silva do ICB/UFMG: Esquecidas por quem? Doenças negligenciadas: da pesquisa à sociedade, um elo perdido*. CAD 1 UFMG, Belo Horizonte/MG, 23-24/11/2017. www.parasitologia.icb.ufmg.br
- PEREIRA, N. S.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, A. K. G.; OLIVEIRA, B. V.; LEAL, T. P.; NEPOMUCENO FILHO, L. C.; QUEIROGA, T. B.; SILVA D. D.; CHIARI, E.; ZAMBONI, D.; CÂMARA, A. C. J.; GALVÃO, L. M. C.; GUEDES, P. M. M. Papel da molécula NOD2 na infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* In: *FLAP XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología*, Santiago/Chile, 2017.
- PEREIRA, N. S.; ANDRADE, C. M.; NUNES, D. F.; QUEIROGA, T. B. D.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; NASCIMENTO, M. S. L.; DO-VALLE-MATTA, M. A.; CÂMARA, A. C. J.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; GUEDES, P. M. M. Inflammation enhances the risks of stroke and death in chronic Chagas disease patients, apresentado na forma de pôster no *VII Encontro de Pesquisa em Parasitologia Prof. Pedro Marcos Linardi–Da pesquisa à inovação: novos caminhos para a Parasitologia*, realizado no ICB/UFMG, Belo Horizonte/MG, 24-25/11/2016. www.parasitologia.icb.ufmg.br
- PEREIRA, N. S.; ANDRADE, C. M.; NUNES, D. F.; CÂMARA, A. C. J.; GALVÃO, L. M. C.; GUEDES, P. M. M.; CHIARI, E. Correlação entre a expressão de RNAm dos receptores Toll-TLRs e as formas clínicas na doença de Chagas humana. Resumo apresentado no *51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Centro

de Eventos do Ceará, Fortaleza, CE, 14-17/06/2015. *Anais Med. Trop.* 2015. www.medtrop2015.com.br

- PEREIRA, N. S.; QUEIROGA, T. B.; NUNES, D. F.; NASCIMENTO, M. S. L.; DO-VALLE-MATTA M. A; ANDRADE, C. M.; CÂMARA, A. C. J.; GALVÃO, L. M. C.; GUEDES, P.M.M.; CHIARI, E. NALP3 Inflammasome and IL-1b are correlated with chronic chagasic cardiomyopathy In: *Resumo HP165, p. 144, Anais da XXXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology XLII Annual Meeting on basic research in Chagas' Disease*, Hotel Glória, Caxambu, MG, 9-11/11/2015. www.sbpz.org.br

8.3 Pré-submissão do artigo

PLOS Neglected Tropical Diseases
NOD2 is crucial for protecting against the digestive form of Chagas disease
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PNTD-D-18-01815
Full Title:	NOD2 is crucial for protecting against the digestive form of Chagas disease
Article Type:	Pre-submission Inquiry
Corresponding Author:	Paulo Marcos Matta Guedes Universidade Federal do Rio Grande do Norte Natal, Rio Grande do Norte BRAZIL
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
First Author:	Nathalie de Sena Pereira
Order of Authors:	Nathalie de Sena Pereira Tamyres Bernadete Dantas Queiroga Denis Dantas Silva Manuela Sales Lima Nascimento Cléber Mesquita de Andrade Daniella Castanheira Bartholomeu Rosa Maria Esteves Arantes Dario Simões Zamboni Egler Chiari Antônia Cláudia Jácome da Câmara Lúcia Maria da Cunha Galvão Paulo Marcos Matta Guedes
Abstract:	Digestive and cardiodigestive forms of Chagas' disease are observed in 2% to 15% of the patients, but immunopathological mechanisms remain undefined. The aim of this work was to evaluate the role of NOD2 innate immune receptor in the pathogenesis of the digestive system in Chagas' disease. Initially we evaluated the mRNA expression of NOD2, RIP2 and α -defensins in peripheral blood mononuclear cells of patients with indeterminate (n=18), cardiac (n=17), digestive (n=15) and cardiodigestive (n=15) clinical forms of Chagas' disease, by Real-Time PCR, and correlated with the degree of dilation of the esophagus, sigmoid and rectum. Patients with digestive form of the disease showed lower expression of NOD2, higher expression of RIP2 and α -defensin, compared to indeterminate form. Also, there was a negative correlation between the expression of NOD2 and the degree of dilation of the esophagus, sigmoid and rectum. Posteriorly, C57BL/6 and NOD2 ^{-/-} mice were infected with <i>Trypanosoma cruzi</i> (RN-25 strain, isolated from digestive patient) and the susceptibility to infection (parasitemia and mortality), gastrointestinal tract alterations (motility, inflammation and denervation) and mRNA expression of TLR2, TLR4, T-bet, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ , iNOS and defensin in colon were determined. NOD2 ^{-/-} mice showed higher parasitemia and reduced intestinal motility when compared to C57BL/6 animals. Histopathological analysis of the colon of NOD2 ^{-/-} and C57BL/6 animals revealed discrete inflammatory foci during the acute phase of infection (19 days post infection). Interestingly, during the chronic phase of the infection (12 months) there was moderate inflammation and hypertrophy of the longitudinal and circular muscular layer only in the colon and jejunum from NOD2 ^{-/-} animals, alterations were not observed in the C57BL/6 mice. Together, our results suggest that NOD2 protecting against the development of digestive form of Chagas' disease.

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1



Governo do Estado do Rio Grande do Norte
 Secretaria de Estado da Educação e da Cultura - SEEC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE - UERN
 Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
 Rua Afonso Miguel da Silva Neto, s/n - Aeroporto
 Mossoró - RN - CEP: 59607-560

PARECER CONSUBSTANCIADO CEP/UERN Nº 027/11

Nº PROTOCOLO (CEP)	027/11
Nº CAAE (SISNEP)	0021.0.428.000-11
Título do Projeto	Morbidade da doença de Chagas e avaliação do perfil imunológico de indivíduos sororreativos procedentes de área endêmica do oeste potiguar.

1 – RESUMO (Média de 250 palavras) Elaborado pelo(s) relator(s)

A pesquisa tem como objetivo a avaliação clínica de indivíduos sorologicamente reativos para infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na mesoregião oeste potiguar, para correlacionar o risco de morte e a resposta imune na cardiopatia chagásica crônica – CCC. Serão avaliados indivíduos sororreativos para *T. cruzi* procedentes da zona rural de Mossoró, Caraúbas, Governador Dix-sept Rosado, Apodi, Severiano Melo e Felipe Guerra, além de pacientes com infecção chagásica pertencentes a mesoregião Oeste Potiguar que procurarem atendimento no Hospital Rafael Fernandes. O período de coleta dos dados se dará após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP até o 2º semestre de 2012. Estão previstos ressarcimento e/ou indenização aos participantes da pesquisa, caso necessário. Os riscos decorrentes da pesquisa estão descritos bem como seus benefícios. Os sujeitos participarão da pesquisa após leitura e assinatura do TCLE e podem desistir da pesquisa a qualquer momento sem que lhe sejam imputadas nenhuma penalidade. Os dados coletados serão armazenados em computador e mídia por um período mínimo de 5 anos no laboratório de Bioquímica da FACS/UERN. O material biológico será armazenado em conformidade com a resolução 367/2005 do CNG. Os gastos oriundos da pesquisa terão como fonte orçamentária recursos do CNPq e FAPERN de acordo com os editais.

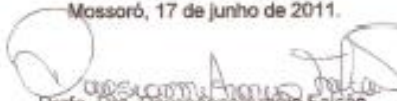
2 – ENTENDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES

O protocolo apresentado atende às recomendações da resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96, podendo ser executado a partir da liberação deste parecer. Após o período de realização da pesquisa, o pesquisador deverá preparar um relatório final, conforme modelo contido na home page deste Comitê e em seguida encaminhá-lo a este CEP.

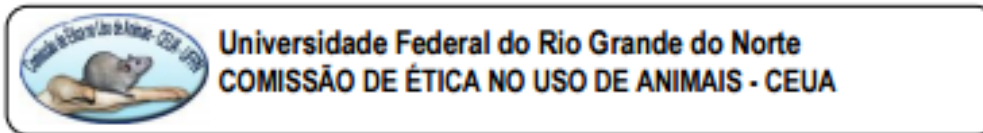
3- PARECER

O Protocolo de Pesquisa foi aprovado.

Mossoró, 17 de junho de 2011.


 Prof. Dra. Dayseanne Araújo Falcão
 Vice-Coordenadora CEP/UERN

9.2 Anexo 2



PROTOCOLO N.º 023/2015

Professor/Pesquisador: *PAULO MARCOS DA MATTA GUEDES*

Natal (RN), 05 de agosto 2015.

Certificamos que o projeto intitulado "Papel do receptor NOD2 na patogenia do sistema digestivo durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*", protocolo 023/2015, sob a responsabilidade de PAULO MARCOS DA MATTA GUEDES, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN, em reunião de 05 de agosto de 2015.

Vigência do Projeto	Dezembro 2018
Número de Animais	70
Espécie/Linhagem	Camundongos (<i>Mus musculus</i>) / C57BL6 e NOD2 ^{-/-}
Peso/Idade	20-25 g / 6-8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	NOD2 ^{-/-} : Universidade de São Paulo C57BL6: Biotério Laboratório de Imunofarmacologia da UFRN

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa for concluída.


 Josy Carolina Cován Portes
 Coordenadora da CEUA