

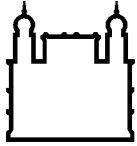
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Análise da resposta imune regional de órgãos linfoides durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos inoculados por via oral, subcutânea e intravenosa

BARBARA A. S. MASCARENHAS DE SOUZA

Rio de Janeiro
Junho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BARBARA A. S. MASCARENHAS DE SOUZA

Análise da resposta imune regional de órgãos linfoides durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos inoculados por via oral, subcutânea e intravenosa

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Juliana de Meis

RIO DE JANEIRO
Junho /2017

Souza, Barbara Angelica .

Análise da resposta imune regional de órgãos linfoides durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos inoculados por via oral, subcutânea e intravenosa / Barbara Angelica Souza. - Rio de Janeiro, 2017.

118 f.; il.

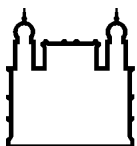
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Juliana de Meis .

Bibliografia: f. 98-118

1. *Trypanosoma cruzi* . 2. Órgãos linfoides. 3. Infecção oral. 4. Infecção subcutânea. 5. Infecção intravenosa.. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BARBARA A. S. MASCARENHAS DE SOUZA

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE REGIONAL DE ÓRGÃOS LINFOIDES
DURANTE UMA FASE DE INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* EM
CAMUNDONGOS INOCULADOS POR VIA ORAL, SUBCUTÂNEA E
INTRAVENOSA**

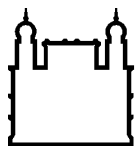
ORIENTADORA: Dra. Juliana de Meis

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto - IOC-FIOCRUZ (Presidente)
Prof. Dr. Alexandre Morrot Lima (IMPG-UFRJ) (Membro)
Prof. Dra. Landi V. Guilherme (UNIRIO) (Membro)
Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro - IOC-FIOCRUZ (Revisora e suplente)
Prof. Dr. Vinícius Frias de Carvalho - IOC-FIOCRUZ (Suplente)

Rio de Janeiro, 29 de junho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, por me incentivar a conquistar essa vitória.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me encorajar e fazer acreditar que Ele sempre está comigo, me abençoando nos momentos mais difíceis.

A minha família, por me apoiar e compreender durante o período em que estive ausente para me dedicar aos estudos.

Aos meus amigos, pelo carinho e conforto nos momentos de tensão.

A minha orientadora, Dra Juliana de Meis, pela atenção, pela ajuda nos experimentos e por compartilhar os seus conhecimentos que contribuíram para o meu crescimento profissional. Além de agradecer pela oportunidade de fazer parte de sua equipe.

A minha co-orientadora, Dra Angela C. V. Junqueira, por acreditar no meu trabalho, pela indicação a minha orientadora, por me encorajar e incentivar a não desistir, além de agradecer pela imensa dedicação a este trabalho.

Ao Dr. Carlos José de Carvalho Moreira, chefe do Insetário do Laboratório de Doenças Parasitárias e responsável pelo biotério do Pavilhão Arthur Neiva, pela amizade, por ceder os triatomíneos e auxiliar o trabalho com os insetos.

Ao Dr. José Rodrigues Coura, chefe do Laboratório de Doenças Parasitárias da Fundação Oswaldo Cruz, a quem eu dedico meu respeito, por ter contribuído imensamente para os meus conhecimentos sobre Doenças de Chagas e permitido a realização de parte deste trabalho em seu laboratório.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Pesquisa sobre o Timo da Fundação Oswaldo Cruz, Dr. Vinícius Cotta de Almeida e Dra. Daniella Areas.

Ao grupo de Chagas, Dina Antunes, Mariana Tavares, Alessandro Marins, Juliana Barreto e Luiz Berbert por me auxiliarem nos experimentos e aos demais componentes do grupo, Rejane Seila, Valéria Santos, Daniele Santos, Déa Villa-Verde e Désio Aurélio pelas sugestões e críticas. Além de agradecer pelo carinho e amizade em todos os momentos difíceis e felizes que passamos juntos.

Aos membros do Laboratório de Pesquisa sobre o Timo da Fundação Oswaldo Cruz, por me auxiliarem na discussão de artigos e procedimentos do laboratório.

A equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da Fundação Oswaldo Cruz, Cristina, Maria José e Amanda, pelo carinho e apoio.

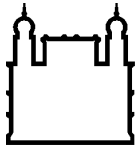
A banca examinadora, Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, Dr. Alexandre Morrot Lima, Dra. Landi V. Guilherme, Dra. Roberta Olmo Pinheiro e Dr. Vinícius Frias de Carvalho, pelas sugestões e críticas.

À Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e toda secretaria acadêmica – IOC/FIOCRUZ, pela competência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelo auxílio financeiro.

E a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para minha formação neste curso e na realização deste trabalho.

“Porque o Senhor (DEUS) dá a sabedoria;
da sua boca procede o conhecimento e o
entendimento” (BÍBLIA, Provérbios, 2.6).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

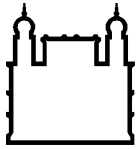
ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE REGIONAL DE ÓRGÃOS LINFOIDES DURANTE A FASE AGUDA DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* EM CAMUNDONGOS INOCULADOS POR VIA ORAL, SUBCUTÂNEA E INTRAVENOSA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Barbara Angelica dos Santos Mascarenhas de Souza

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) acomete 6-8 milhões de pessoas no mundo. As vias de transmissão mais comuns do *T. cruzi* são: oral, vetorial clássica, intravenosa e por via congênita. Considerando a importância da resposta imune para o controle do parasita e desenvolvimento da doença e, sabendo-se que a infecção promove alteração nos tecidos linfoides no hospedeiro, a compreensão dos mecanismos imunorregulatórios na infecção torna-se de grande importância. Nesse trabalho comparamos o comportamento de órgãos linfoides, a dinâmica das populações linfocitárias e produção de citocinas de animais infectados por *T. cruzi* pelas vias oral (IO), subcutânea (SC) ou intravenosa (IV). Camundongos BALB/c foram infectados pelas diferentes vias com formas infectantes do *T. cruzi* (cepa *Tulahuén*) e avaliados em diferentes momentos da fase aguda. Avaliamos a celularidade do timo e dos órgãos linfoides periféricos (linfonodos subcutâneos (LSC) e mesentéricos (LM), das placas de Peyer (PP) e do baço) de animais dos diferentes grupos por citometria de fluxo, além do fenótipo e perfil de ativação de linfócitos nesses órgãos. Também foram feitas análises de citocinas como TNF e IFN- γ (Th1) e IL-10 (Th2), por utilização do kit CBA (BD) no soro de animais infectados. Nossos resultados demonstram uma intensa parasitemia em animais inoculados pela via SC. O timo mostrou-se atrofiado em todos os grupos, em relação ao controle (Co), destacando-se a via IV com 21 dpi. Além disso, observamos aumento na celularidade do baço e LSC dos três grupos infectados, principalmente na IO. Quanto à ativação dos linfócitos nos órgãos linfoides periféricos, os linfócitos T CD4⁺ *naive* (CD44⁺CD62L⁺) estão mais presentes nos LSC na infecção SC com 7dpi e nas PP na via IO com 14dpi em relação ao IV e SC. Os Linfócitos T CD8⁺ *naive* diminuem nos LM com 14dpi nas vias IO,SC e IV mas, estão aumentados com 7 dpi no baço dos grupos infectados e nos LSC da infecção SC. Os linfócitos B *naive* são mais evidentes nos LSC de animais infectados pela via SC em relação aos demais grupos com 7 dpi porém, diminuí nos LM com 14dpi nas vias IO,SC e IV. Os linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ e B de memória central (CD44⁺CD62L⁺) estão reduzidos nos grupos infectados com 7dpi em todos os órgãos. Linfócitos T CD4⁺ efetores (CD44⁺CD62L⁻) no baço e LM estão em menor número em todos os grupos com 7 dpi, porém, nas PP nota-se redução principalmente na IO. Destaca-se que a infecção SC apresenta maior número de T CD4⁺ e linfócitos B efetores que os grupos IO e IV no mesmo momento. No baço, LSC, LM e PP, a infecção IV apresenta mais linfócitos T e B efetores do que a IO e o Co (baço, LSC, LM). Não foi observada diferenças quanto a presença de IL-10 entre os grupos, porém, o TNF aumenta na IO e na IV com relação ao Co. O IFN- γ está presente na IV com 3 dpi, na via SC e IV com 7 dpi e IO e IV com 21 dpi. Estes resultados evidenciam que a via de inoculação leva a um padrão de resposta imune diferente, o que pode afetar o controle da infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANALYSIS OF THE REGIONAL IMMUNE RESPONSE OF LYMPHOID ORGANS DURING A PHASE OF *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION IN MICE INOCULATED ORALLY, SUBCUTANEOUSLY AND INTRAVENOUSLY

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Barbara Angelica dos Santos Mascarenhas de Souza

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and affects approximately 6-8 million people worldwide. The most common routes of transmission are oral, classical vectorial, intravenous and congenitally. Considering the importance of immune response to parasite control and knowing that infection leads to changes in host lymphoid tissues it is important to understand the immunoregulatory mechanisms in infection. Here we compare the behavior of lymphoid organs, the dynamics of lymphocyte populations and cytokine production in animals infected with *T. cruzi* by oral (OI), subcutaneous (SC) or intravenous (IV) routes. Male BALB/c mice were infected through different routes with *T. cruzi* (Tulahuén strain) and we assessed the cellularity at the thymus and lymphoid organs (subcutaneous (SCLN) and mesenteric (MLN) lymph nodes, Peyer's patches (PP) and spleen) by flow cytometry, besides the phenotype and profile of lymphocyte activation in these organs. Cytokine seric levels were analyzed (IL-10, TNF and IFN- γ) by Cytokine bead assay (CBA) (BD). Our results demonstrate an intense parasitemia in animals inoculated subcutaneously. Thymus atrophy was seen in all groups compared to the control (Co), mostly in intravenous route with 21 dpi. Spleen and SCLN cellularity increase was observed, mainly in the oral route. Regarding the lymphocytes activation in secondary lymphoid organs, naïve T CD4 lymphocytes (CD44⁻CD62L⁺) were more expressed in SCLNs by SC infection and in PP in the IO route with 14dpi in relation to IV and SC. Naive T CD8 lymphocytes decrease in LM with 14dpi in the IO, SC and IV route, but, were increased with 7 dpi in spleen and SCLNs by SC route. Naive B lymphocytes were more evident in the SCLNs in SC infection compared to other groups with 7 dpi, however, it decreases in LM with 14dpi in the IO, SC and IV route. Central memory CD4⁺ or CD8⁺ and B lymphocytes (CD44⁺ CD62L⁺) were reduced at 7dpi in all organs. Effector CD4 (CD62L⁻ CD44⁺) decreased in the spleen and MLN in all groups with 7 dpi. Although PP were reduced mainly in OI. It is noteworthy that the SC infection showed higher number of effector T CD4 and B lymphocytes than IO and IV groups at the same time. In IV route, the spleen, SCLNs, MLNs, PP presented more effector T and B lymphocytes than OI and Co. No difference was in the presence of IL-10 between groups, however TNF increased in OI and IV in relation to Co. IFN- γ was present in IV at 3 dpi, SC and IV with 7 dpi and OI and IV with 21 dpi. These results show that the inoculation pathway leads to a different immune response pattern, which may affect infection control.

ÍNDICE

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÍNDICE DE QUADROS.....	xix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A doença de Chagas e sua Epidemiologia.....	1
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas, 1909).....	2
1.3 Vetores e reservatórios.....	2
1.4 Vias de transmissão da doença de Chagas.....	3
1.4.1 Transmissão oral.....	3
1.4.2 Transmissão vetorial ou clássica	5
1.4.3 Transmissão por transfusão sanguínea	6
1.4.4 Transmissão por via vertical ou congênita.....	6
1.5 Período de incubação e Manifestações clínicas da doença de	7
Chagas de acordo com a via de inoculação.....	
1.5.1 Fase aguda.....	7
1.5.2 Fase crônica	8
1.6 Resposta imune na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	9
1.6.1 Resposta imune em humanos.....	9
1.6.2 Resposta imune em modelo experimental.....	12
1.6.2.1 Resposta imune inata.....	12
1.6.2.2 Resposta imune adaptativa.....	14
1.6.2.3 Órgão linfoides e ativação de linfócitos na infecção do	16
<i>Trypanosoma cruzi</i>	
1.7 Justificativa	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais utilizados	24

3.2	Obtenção dos parasitos e infecção.....	24
3.3	Parasitemia.....	25
3.4	Obtenção de células e tecidos de animais normais e infectados.....	25
3.5	Estudos citofluorimétricos.....	26
3.6	Análise de citocinas.....	26
3.7	Análise estatística	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Teste de inóculo... ..	28
4.2	Parasitemia de camundongos BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i> obtido da excreta de triatomíneo.....	30
4.3	Influência da porta de entrada do <i>T. cruzi</i> na celularidade do timo dos animais infectados com parasitos de cultura.....	31
4.4	Celularidade dos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> de cultura.....	35
4.5	Órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> de cultura e com excreta de triatomíneo com 14dpi	38
4.6	Linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e linfócitos B (CD19 ⁺) em animais inoculados com parasitos de cultura.....	41
4.7	Linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e linfócitos B (CD19 ⁺) em animais inoculados com parasitos de cultura e excreta de triatomíneo.....	45
4.8	Perfil de ativação dos linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) e linfócitos B (CD19 ⁺) nos órgãos linfoides periféricos.....	53
4.8.1	Células com perfil <i>naive</i> (CD44 ⁻ CD62L ⁺).....	53
4.8.2	Células de perfil memória central (CD44 ⁺ CD62L ⁺) em órgãos linfoides periféricos.....	56
4.8.3	Células com perfil efetor (CD44 ⁺ CD62L ⁻) em órgãos linfoides periféricos.....	59
4.9	Comparação entre estado de ativação dos linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) e linfócitos B (CD19 ⁺) presente nos órgãos linfoides periféricos de animais infectados com parasito de triatomíneo (IO e SC) e de cultura celular (IV).....	64
4.9.1	Células com perfil <i>Naive</i> (CD44 ⁻ CD62L ⁺).....	64
4.9.2	Células com perfil de memória central (CD4 ⁺ CD62L ⁺).....	69

	4.9.3 Células com perfil efetor (CD4 ⁺ CD62L ⁺).....	73
	4.10 Análise de citocinas séricas.....	80
5	DISCUSSÃO.....	82
6	CONCLUSÕES.....	95
7	PERSPECTIVAS.....	97
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Doença de Chagas aguda no Brasil.	4
Figura 2.	Diferenciação intratímica de células T.	17
Figura 3.	Dinâmica da resposta imune regional em órgãos linfoides após a infecção aguda experimental do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	21
Figura 4.	Teste de inóculo em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido de cultura por diferentes vias.	28-29
Figura 5.	Parasitemia de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido de excreta de triatomíneo infectado.	30
Figura 6.	Celularidade do timo de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido de cultura pelas vias oral, subcutânea e intravenosa.	32
Figura 7.	Número absoluto (10^6) de linfócitos T CD4 ⁺ ou CD8 ⁺ , duplo-positivo (CD4 ⁺ CD8 ⁺) ou duplo-negativo (CD4 ⁻ CD8 ⁻) no timo de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido de cultura pelas vias oral, subcutânea e intravenosa.	33
Figura 8.	Celularidade do baço, linfonodos subcutâneos, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido de cultura celular pelas vias oral, subcutânea e intravenosa.	36
Figura 9.	Comparação entre a celularidade do baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido da excreta de triatomíneo infectado e de cultura celular pelas vias oral e subcutânea.	39

- Figura 10.** Número absoluto (10^6) de linfócitos T ($CD4^+$ ou $CD8^+$) e **B 42-43**
($CD19^+$) em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa.
- Figura 11.** Número absoluto (10^6) de linfócitos T $CD4^+$ presente em órgãos **46**
linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de excreta de triatomíneo infectado e de cultura celular pelas vias oral e subcutânea.
- Figura 12.** Número absoluto (10^6) de linfócitos T $CD8^+$ presente em órgãos **48**
linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de excreta de triatomíneo infectado e de cultura celular pelas vias oral e subcutânea.
- Figura 13.** Número absoluto (10^6) de linfócitos B ($CD19^+$) presente em órgãos **50**
linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de excreta de triatomíneo infectado e de cultura celular pelas vias oral e subcutânea.
- Figura 14.** Número absoluto (10^6) de linfócitos ativados de perfil naive ($CD44^+$ **54-55**
 $CD62L^+$) nos fenótipos $CD4^+(A)$, $CD8^+(B)$ e $CD19^+(C)$ presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa.

- Figura 15.** Número absoluto (10^6) de linfócitos ativados de perfil de memória central ($CD44^+CD62L^+$) nos fenótipos $CD4^+(A)$, $CD8^+(B)$ e $CD19^+(C)$ presente em órgãos linfoides periféricos como baço linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV). **57-58**
- Figura 16.** Número absoluto (10^6) de linfócitos ativados de perfil efetor ($CD44^+CD62L^-$) nos fenótipos $CD4^+(A)$, $CD8^+(B)$ e $CD19^+(C)$ presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. **60**
- Figura 17.** Número absoluto (10^6) de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B ($CD19^+$) ativados de perfil naive ($CD44^-CD62L^+$) presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* de origem distintas pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. **62-66**
- Figura 18.** Número absoluto (10^6) de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B ($CD19^+$) ativados de perfil de memória central ($CD44^+CD62L^+$) presente em órgãos linfoides periféricos como linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* de origem distintas pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. **67-71**
- Figura 19.** Número absoluto (10^6) de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B ($CD19^+$) ativados de perfil efetor ($CD44^+CD62L^-$) presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* de origem distintas pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. **72-75**

Figura 20. Relação entre citocinas presentes no soro de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa e parasitemia. **79**

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.	Citocinas e quimiocinas expressas na infecção por <i>T. cruzi</i> em pacientes e modelo experimental.	11
Quadro 2.	Subpopulações de timócitos em camundongos infectados pelas vias oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV).	35
Quadro 3.	Avaliação da celularidade dos órgãos linfoides periféricos.	38
Quadro 4.	Celularidade dos órgãos linfoides periféricos de animais infectados com cultura e excreta de triatomíneo.	41
Quadro 5.	Linfócitos T CD4 ⁺ nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados por <i>T. cruzi</i> obtido de cultura.	44
Quadro 6.	Linfócitos T CD8 ⁺ nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados por <i>T. cruzi</i> obtido de cultura.	44
Quadro 7.	Linfócitos B (CD19 ⁺) nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados por <i>T. cruzi</i> obtido de cultura.	45
Quadro 8.	Linfócitos T CD4 ⁺ presente nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido da excreta de triatomíneo e de cultura celular pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC).	51
Quadro 9.	Linfócitos T CD8 ⁺ presente nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido da excreta de triatomíneo e de cultura celular pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC).	52
Quadro 10.	Linfócitos (B CD19 ⁺) presente nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> obtido da excreta de triatomíneo e de cultura celular pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC).	52

- Quadro 11.** Linfócitos ativados de perfil *naive* (CD44⁻CD62L⁺) nos fenótipos T CD4⁺, T CD8⁺e B (CD19⁺). **61**
- Quadro 12.** Linfócitos ativados de perfil memória central (CD44⁺CD62L⁺) nos fenótipos T CD4⁺, T CD8⁺e B (CD19⁺). **61**
- Quadro 13.** Linfócitos ativados de perfil efetor (CD44⁺CD62L⁻) nos fenótipos T CD4⁺, T CD8⁺e B (CD19⁺). **77**
- Quadro 14.** Linfócitos ativados de perfil *naive* (CD44⁻CD62L⁺) em animais infectados com parasitos de origens distintas. **77**
- Quadro 15.** Linfócitos ativados de perfil memória central (CD44⁺CD62L⁺) em animais infectados com parasitos de origens distintas. **77**
- Quadro 16.** Linfócitos ativados de perfil efetor (CD44⁺CD62L⁻) em animais infectados com parasitos de origens distintas. **77**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AICD	Morte induzida por ativação - Do inglês <i>activation-induced cel Ideath</i>
AIRE	Gene regulador autoimune - Do inglês <i>Autoimmune Regulator</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno - Do inglês <i>Antigen Presenting Cell</i>
BCR	Receptor de célula B - Do inglês <i>B cell receptor</i>
CBA	Do inglês <i>Cytometric Bead Array</i>
CD	Conjuntos de diferenciação - Do inglês <i>Cluster of differentiation</i>
DN	Duplo negativa
DP	Duplo positiva
Dpi	Dias após a infecção
DTU	Do inglês <i>Discrete Typing Units</i>
ETP	Células precoce de T- Do inglês <i>Early T-cell progenitor</i>
HIV	Do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IG	Infecção intragástrica
IL-10	Interleucina – 10
IL-17	Interleucina – 17
IL-2	Interleucina – 2
IL-4	Interleucina – 4
IL-6	Interleucina – 6
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon gama
IO	Infecção oral
IV	Infecção intravenosa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade - Do inglês <i>Low-Density Lipoprotein</i>
LM	Linfonodos mesentéricos
LSC	Linfonodos subcutâneos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade - Do inglês <i>Major histocompatibility complex</i>
MS	Ministério de Saúde
NK	Células natural killer - <i>Do inglês Killer natural</i>
NO	Óxido nítrico - <i>Do inglês Nitric oxide</i>
NOD	Do inglês <i>nucleotid-binding oligomerization domain receptors</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PP	Placas de Peyer
PRR	Receptores de reconhecimento padrão - <i>Do inglês Pattern Recognition Receptor</i>
RPMI	Meio de cultura celular - <i>Do inglês Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Fetal Bovino
SC	Infecção Subcutânea
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SP	Células T simples positiva
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T reg	Células T regulatórias
TCR	Receptor de células T - <i>Do inglês T cell receptor</i>
Th1	Células T auxiliares tipo 1- <i>Do inglês T helper 1</i>
Th2	Células T auxiliares tipo 2 - <i>Do inglês T helper 2</i>
TLR	Receptores de reconhecimento semelhantes à Toll - <i>Do inglês Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSP	Progenitor de segmentação do timo – <i>Do inglês Thymus settling progenitors</i>
VERO	Célula Epitelial de Rim de Macaco Verde

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas e sua Epidemiologia

Em uma expedição contra malária no estado de Minas Gerais em 1909 o médico brasileiro Carlos Chagas descreveu, a Tripanossomíase americana ou doença de Chagas e descobriu desde seu agente etiológico até vetores e reservatórios domésticos e silvestres (1).

Classificada como uma doença tropical negligenciada, a enfermidade de Chagas acomete principalmente a América Latina com 21 países endêmicos, destacando-se as de população de condições socioeconômicas desfavoráveis. Entretanto, de acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde) existem cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo. Além disso, o fluxo migratório de indivíduos e o aumento de viajantes, também representa um cenário preocupante, uma vez que, diversos casos já foram relatados em países não endêmicos (2,3).

No Brasil e em outros países do cone sul, a prevalência da doença tornou-se menor devido ao programa de controle e vigilância epidemiológica realizada pelo Ministério da Saúde (MS). Estas medidas reduziram significativamente a densidade dos triatomíneos vetores da doença que possuem hábitos domiciliados no país, como a espécie *Triatoma infestans*, controlada no Brasil e erradicada no Chile e Uruguai (3–5). Entretanto, muitos casos da doença ainda podem ser encontrados no Brasil. Dados publicados no boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (2015) mostram que o número de casos notificados da doença sob a fase aguda é crescente e varia de acordo com a forma de infecção. Entre 2000 e 2013, mais de 68% dos casos foram associados à via de transmissão oral, 6,4% vetorial e 0,7% outras formas que incluem a transmissão acidental e transfusional (6).

Além disso, de acordo com a Coordenadoria Estadual do Pará, estado que apresenta maior números de casos agudos da doença no país, entre 2006 e maio de 2016, 1516 novos casos sob a fase aguda da infecção foram registrados no Estado (MS/SINAN/Coordenadoria Estadual do Pará, 2016).

1.2 *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909)

O agente etiológico da Doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* pertencente ao reino Protista, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastogophorea, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae (7).

T. cruzi é um eucarioto e possui como estruturas e organelas mais relevante como por exemplo: a membrana celular, flagelo, citoesqueleto, cinetoplasto, glicosoma, acidocalcisoma, vacúolo contrátil, inclusões lipídicas e o núcleo, descritas por Souza (2009) (8). Assim como outros Kinetoplastidas caracteriza-se pela presença de um flagelo e uma organela, localizada na mitocôndria, chamada cinetoplasto que contém o DNA ou kDNA organizados em minicírculos e maxicírculos podendo chegar a 30% do seu DNA total. O cinetoplasto possui uma organização estrutural que pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento do protozoário. Está sempre localizado perto do corpo basal, definindo a sua localização e conseqüentemente a localização do flagelo (8,9).

Basicamente, ao longo do seu ciclo evolutivo, *T. cruzi* apresenta-se em três formas principais de desenvolvimento. Tais formas podem ser observadas em diversas espécies de hospedeiros (vertebrados e invertebrados) que são considerados vetores e reservatórios importantes do parasito. Em hospedeiros vertebrados encontram-se as formas multiplicativas amastigotas (presente no interior das células) e as infectantes tripomastigotas sanguíneos (encontrada no sangue). Porém, em invertebrados, como forma multiplicativa encontramos as epimastigotas e como forma infectante as tripomastigotas metacíclicas que podem estar presente nas fezes e urina de insetos triatomíneos infectados (7,10).

1.3 Vetores e reservatórios

Os vetores da doença de Chagas são insetos triatomíneos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (7,11). Os gêneros mais importantes na transmissão do *T. cruzi* por via vetorial são: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, sendo conhecidas mais de 141 espécies potencialmente vetoras do parasito (5,12). A espécie *T. infestans* era de grande importância epidemiológica por ser estritamente domiciliada.

Entretanto, no Brasil diversas medidas de controle químico levaram a redução expressiva desta espécie, permitindo ao país receber da Organização mundial de saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), em 2006, uma certificação internacional de interrupção na transmissão da doença por *T. infestans* (3–5).

A suscetibilidade dos triatomíneos a infecção por *T. cruzi* está presente em qualquer de seus estádios evolutivos a partir de sua alimentação em mamífero infectado. No entanto, alguns insetos podem não ser encontrados infectados na natureza devido a grande possibilidade de sua alimentação ocorrer em animais refratários a *T. cruzi*, como aves, anfíbios e répteis (9,13).

Quanto aos reservatórios vertebrados, existem mais de 100 espécies de mamíferos silvestres e domésticos importantes na transmissão da doença de Chagas. Os animais silvestres estão reunidos em diferentes ordens: Marsupialia, Edentata, Chiroptera, Carnivora, Lagomorpha, Rodentia e Primatas. E, dentre os reservatórios domésticos encontramos gatos, cachorros, ratos, camundongos e cobaias com potencial de infecção com *T. cruzi* e transmissão da doença (7,9).

1.4 Vias de transmissão da doença de Chagas

Os principais mecanismos de infecção da doença de Chagas são: a via vetorial clássica, a partir de triatomíneos hematófagos infectados; via oral, através de alimentos contaminados com as dejeções do inseto ou ingestão de carne mal cozida de animal infectado, por transfusão sanguínea e através da via congênita ou canal do parto. Entretanto, existem outras formas de transmissão importantes como o transplante de órgãos, acidentes de laboratório, transmissão sexual que hipoteticamente pode ocorrer quando há ferimento, através do esperma ou fluidos menstruais; e criminalmente induzido, por inoculação ou oralmente (5,9,14).

1.4.1 Transmissão oral

A transmissão da doença de Chagas por via oral tem sido associada a ingestão de alimentos como carne crua ou mal cozida de animais de caça infectados ou

bebidas a base de frutas típicas de regiões endêmicas contaminados com *T. cruzi* (5,9,14).

O primeiro caso da doença por via oral em humanos no Brasil foi em 1965 na cidade de Teutônia no Rio Grande do Sul (5,15). Desde então, a contaminação da doença de Chagas por esta via já tem sido descrito em diversas regiões do país. Dados publicados em 2015 pelo MS mostram que a via oral é a forma de transmissão mais frequente no Brasil, representando mais de 68% dos indivíduos infectados entre 2000 e 2013 (6). Entretanto já foram registrados, por esta via, 71% dos casos confirmados (entre 2000 e 2010), ocorrendo principalmente ao norte do país (Figura 1A e B).

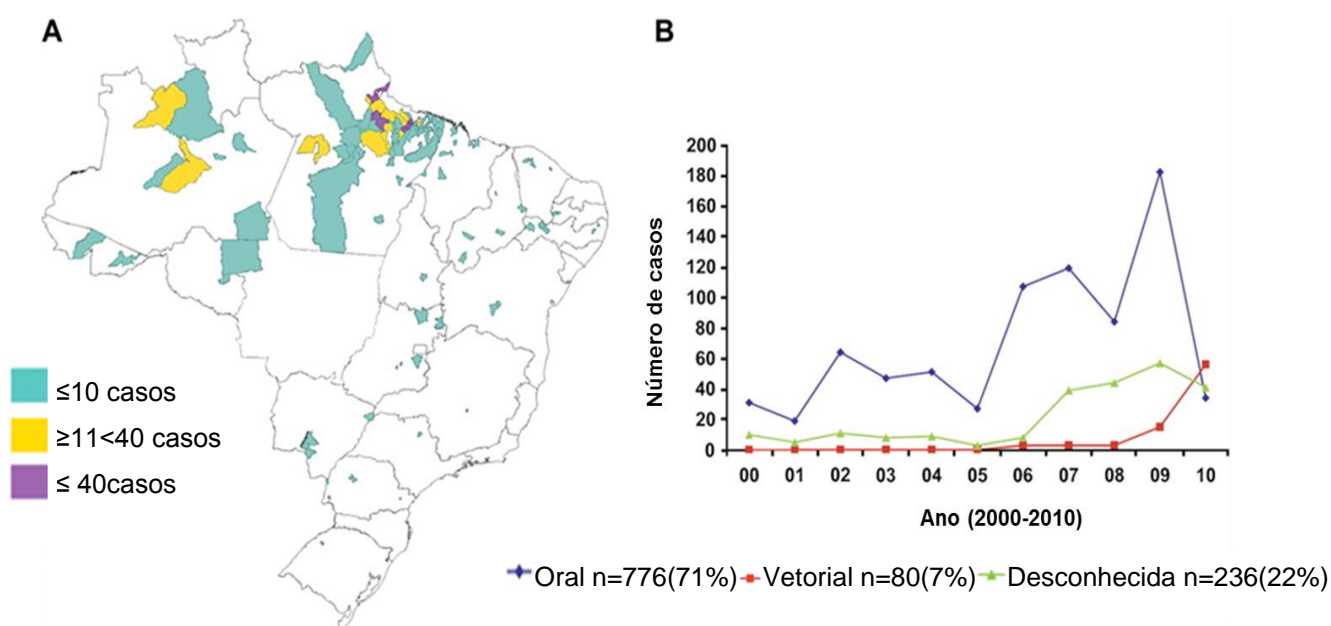


Figura 1 Doença de Chagas aguda no Brasil. A) Doença de Chagas aguda no Brasil por município entre 2000–2010. B) Número de casos de doença de Chagas aguda no Brasil de acordo com o tipo de transmissão, 2000-2010 (16).

Na Região Amazônica, cujo território ocupa 44% da América do sul e 58% do território nacional brasileiro, em que a taxa de infecção aguda se apresenta de forma crescente, a doença de Chagas representa uma importante endemia (4,17). De acordo com Coura e Junqueira (2014) mais de 1500 casos da doença de Chagas por transmissão oral já foram descritos nesta região nas últimas duas décadas (4,18,19). No Estado do Pará, um dos estados que compõe a região amazônica brasileira 1516 novos casos, sob a fase aguda da infecção foram registrados entre

2006 e maio de 2016 (MS/SINAN/ Coordenadoria Estadual do Pará, 2016). Acredita-se que o principal motivo dos surtos de doença no estado está relacionado ao consumo de Açaí, fruta proveniente de palmeira e comumente consumida *in natura* (6,20).

Além do Brasil, outros países da América Latina como: Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa, Bolívia, Argentina e Equador são importantes na transmissão da doença Chagas por via oral, geralmente associado a sucos de frutas como: goiaba, laranja e tangerina, além de alimentos contaminados com secreções das glândulas anais de marsupiais infectados com o parasito (21–24).

Experimentalmente a infecção por esta via já foi demonstrada desde 1921 por Nattan-Larrier, utilizando tripomastigotas sanguíneos e posteriormente por Cardoso (1933), Kofoid and Donat (1933) and Marsden (1967) usando fezes de triatomíneos infectados, além de estudos utilizando leite materno (5,25).

Desde então diversos trabalhos tem sido publicados, geralmente utilizando um modelo de infecção por oral, ocorrendo o inóculo diretamente no estômago (por gavagem) (16,21,26–33). Porém, vale ressaltar que este tipo de infecção não reflete o que ocorre na natureza e pode apresentar resultados distintos quando o inóculo é colocado diretamente na boca. De acordo com Barreto-de-Albuquerque, camundongos infectados por via oral (boca) possuem alta taxa de mortalidade, parasitemia elevada, expressam mais citocinas pró-inflamatória (IFN- γ e TNF- α) e apresentam danos hepáticos, ao contrário do que ocorre com animais infectados por gavagem (34).

1.4.2 Transmissão vetorial ou clássica

Conforme citado anteriormente, a região Amazônica é endêmica para doença de Chagas e um dos fatores que favorece os riscos de contaminação por *T. cruzi* é a extensiva existência de reservatórios e triatomíneos importantes na transmissão vetorial ou clássica do parasito (19).

A transmissão vetorial ou clássica da doença de Chagas ocorre por meio do contato das fezes e urina do triatomíneo infectado (também conhecido como barbeiro), contendo formas tripomastigotas metacíclicas, com a mucosa ou com o local da picada do inseto durante o repasto sanguíneo (5,35). No boletim de 2015, o MS relatou que apesar do certificado de interrupção de transmissão por *T. infestans*

no Brasil, a via clássica vetorial representou 6,4% dos casos da doença entre 2000 e 2013 com a maioria ao Norte do País (SVS/MS, 2015).

1.4.3 Transmissão por transfusão sanguínea

A transfusão de sangue é um importante mecanismo de transmissão do *T. cruzi*. Na década de 1970, a alta prevalência de pessoas infectadas nos centros urbanos e a falta de controle nos hemocentros, foram responsáveis por milhares de casos da doença no Brasil, cujo primeiro caso foi descrito em 1952 (5,36). Em pesquisa realizada por Coura (1966) em hemocentros do Rio de Janeiro, foram analisados 4595 doadores tendo sido encontrados 58 indivíduos positivos (1,26%). Foram localizados 24 receptores e destes 6 estavam infectados (25%), sendo que 1 receptor apresentava sinais de fase aguda da infecção (37).

Recentemente, iniciativas para o controle de doadores realizadas no Brasil e em outros países da América do Sul e Central tem contribuído para diminuição do número dos indivíduos infectados por transfusão sanguínea, porém a migração de indivíduos de áreas endêmicas para regiões não endêmicas como Estados Unidos, Espanha e países da Europa, Ásia e Oceania além de torna a transmissão da doença por essa via um grande desafio (2,5).

1.4.4 Transmissão por via vertical ou congênita

Outra via de transmissão da doença de Chagas com grande relevância é a transmissão vertical ou congênita na qual o parasito é transmitido da mãe infectada para o filho. A transmissão vertical ocorre principalmente por via transplacentária mas, pode acontecer também através do canal de parto pelo contato da mucosa do recém-nascido com o sangue da mãe infectada (38,39). Os principais fatores de risco na transmissão congênita incluem mães que: possuem parasitemia patente, moram ou migram para áreas endêmicas e com alta taxa de transmissão, apresentam coinfeção com malária ou HIV (*do inglês Human Immunodeficiency Virus*) ou que possuem deficiência na resposta mediada por células T (40). Já foi observado que quando a criança é infectada, o crescimento e a maturidade do feto ficam comprometidos, sendo possível ocorrer malformações fetais e predisposição ao aborto. Além disso, aumenta o risco de parto prematuro, há perda de peso do

recém-nascido e ruptura da membrana amniótica devido à inflamação placentária (38,40).

Estima-se que de 2,7% a 5% das crianças infectadas no mundo foram contaminadas por transmissão congênita (41). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, 60% das crianças infectadas são do Rio Grande do Sul, com prevalência nacional de 0,4% de transmissão por esta via (6).

1.5 Período de incubação e Manifestações clínicas da doença de Chagas de acordo com a via de inoculação

Após a entrada no organismo, *T. cruzi* passa por um período de incubação que varia de acordo com a porta de entrada, com o inóculo, a cepa e com as condições de saúde do paciente. Este período dura desde a entrada do parasito até os primeiros sintomas da doença. Geralmente, os indivíduos infectados pela via vetorial clássica apresentam período de incubação que varia de 4 a 15 dias, os infectados por via oral de 3 a 22 dias e por transfusão sanguínea de 20 a 40 dias. Após este período observamos que a doença de Chagas pode apresentar-se em duas fases subsequentes: fase aguda ou inicial e a fase crônica (7,42).

1.5.1 Fase aguda

A fase aguda dura cerca de 4 a 8 semanas pós-infecção e caracteriza-se pela parasitemia patente, podendo ser detectável por exames parasitológicos diretos. Esta fase pode ser assintomática ou apresentar-se de forma moderada ou grave com sintomas específicos e inespecíficos. Dentre os sinais e sintomas observados encontra-se febre generalizada, mal estar, linfadenopatia, sinais de porta de entrada do parasito, edema local ou generalizado, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite severa em alguns casos (14,43). De acordo com Rassi, durante esta fase de <5-10% dos pacientes sintomáticos morrem devido à miocardite grave ou meningoencefalite ou ainda, apresentando as duas enfermidades simultaneamente (43). Estudos anteriores mostram que indivíduos infectados por via oral apresentam sintomatologia grave com mortalidade de 8 a 35% dos indivíduos infectados (20,43). Em geral, 75% dos pacientes infectados por essa via são

sintomáticos e possuem febre prolongada, edema de face e membros inferiores, taquicardia, dispneia, cefaleia, mialgia, vômito, dor abdominal, diarreia, meningoencefalite e miocardite aguda (20,44–46). Na infecção pela via vetorial clássica, a taxa de mortalidade varia entre <5 -10% e apenas 3,3% das pessoas infectadas apresentam-se sintomáticas. Durante esta fase inicial (aguda), observam-se sinais de porta de entrada como chagoma de inoculação e sinal de Romana, hepatoesplenomegalia, edema subcutâneo, miocardite e meningoencefalite. Quanto aos indivíduos infectados por transfusão sanguínea, seus sinais e sintomas são semelhantes à via vetorial clássica no que se refere à febre, miocardite e meningoencefalite, porém, sem sinais de porta de entrada. Em geral, admite-se que 80% desses indivíduos apresentam sintomas que podem levar a morte (44–46).

Contudo, pacientes que sobrevivem à fase aguda apresentam sintomas que se resolvem espontaneamente e possuem considerável redução da parasitemia devido à forte ativação da resposta imune nesta fase (47,48).

1.5.2 Fase crônica

Após a fase inicial (aguda), inicia-se a fase crônica da doença de Chagas que corresponde de 30% a 40% dos indivíduos infectados (47). Nesta fase, os parasitos geralmente estão nos tecidos e a doença pode desenvolver-se sob as formas: indeterminada (ou assintomática) com 60% dos pacientes infectados, sob a forma cardíaca (30%), digestiva (8%) e mista (2%) cuja infecção apresenta complicações digestiva e cardíaca (43,49). Os pacientes em fase crônica infectados pela via vetorial clássica e por transfusão sanguínea podem desenvolver cardiomiopatia, alterações no sistema digestório com megacólon e megaesôfago e alterações no sistema nervoso. Indivíduos infectados por via oral também podem apresentar esses sintomas nesta fase (43).

De acordo com o que foi visto anteriormente, existem diversos fatores que contribuem para evolução da doença, tais como: períodos de incubação do parasito, sintomatologia e taxa de mortalidade doença que variam de acordo com a via de transmissão. A atuação do sistema imune na fase inicial da doença é essencial na defesa contra o parasito e contribui para a resistência do hospedeiro (50,51). A intensa resposta imune na fase aguda leva ao controle do parasito e permite que o

indivíduo entre em outras fases da doença sem ser diagnosticado devido a presença de sintomas inespecíficos (52).

1.6 Resposta imune na infecção por *Trypanosoma cruzi*

1.6.1 Resposta imune em humanos

A análise da resposta imune em pacientes chagásicos sob a fase aguda mostra ativação de células NK e macrófagos, desencadeando a ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺; além de mostrar a produção de anticorpo antígeno específico por células plasmáticas (52,53).

De acordo com Sathler-Avelar *et al* (2003) (54) crianças infectadas com *T. cruzi* e que estão sob a fase aguda da doença, apresentam alta frequência de células NK com fenótipo CD16⁺CD56⁻. Este estudo, também mostra um aumento de linfócitos B (CD19⁺) com expansão do subtipo B1 (CD19⁺CD5⁺), em estágios iniciais da fase crônica da doença (54). O aumento de células B persiste durante a imunidade adquirida e conseqüente mente o aumento de anticorpos IgM é observado no soro de paciente sob a fase aguda, sendo importante no diagnóstico da doença. Além disso, anticorpos IgG específicos e anticorpos líticos que medeiam a lise do parasito também são identificados nesta fase (52,53).

Em uma análise realiza por Chaves colaboradores (2016) (55) com indivíduos infectados e diagnosticados em fase crônica, mostrou que tanto pacientes que apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas quanto os que possuem a forma cardíaca da doença possuem aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em apoptose. De acordo com esse estudo amostras de sangue de pacientes com cardiopatia, submetido ao estímulo com antígenos de *T. cruzi*, possuem aumento no percentual de células T CD4⁺CD62L⁻ circulante, e sugere envolvimento dessas células na miocardite observada nos pacientes levando ao dano tecidual (55). Acredita-se que a severidade clínica da doença em fase crônica esteja relacionada com a miocardite devido a presença de infiltrado inflamatório (Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e macrófagos), fibrose, danos nas fibras cardíacas e baixa carga parasitária (56).

Vale ressaltar que pacientes sob forma indeterminada apresentam mais células T regulatórias (T reg) no sangue quando comparados com indivíduos não infectados (57). Acredita-se que as células T reg ($CD4^+CD25^{high}$) modulam negativamente a produção de citocinas com perfil Th1, uma vez que, essas células são responsáveis pelo controle da resposta imune exacerbada observada em indivíduos com a forma cardíaca da doença (58).

No que se refere a produção de citocinas, a infecção do *T. cruzi* em indivíduos em fase crônica apresenta mais citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-9 e IL-12) em pacientes com cardiopatia chagásica do que em pacientes assintomáticos (com a forma indeterminada da doença). Além disso, indivíduos assintomáticos possuem a presença mais elevada de citocinas circulantes com perfil anti-inflamatório, como IL-13, IL-5, IL-4 e IL-10, do que os pacientes com a forma cardíaca da doença (52,59–61). Interessantemente, as diferenças no padrão de citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória em pacientes chagásicos não está relacionada com diferenças de DTUs (do inglês *Discrete Typing Units*) das cepas de *T. cruzi* (49).

A produção de citocinas é um fator crítico no desenvolvimento da doença e de fato, várias citocinas e quimiocinas importantes já foram descritas na durante a resposta imune do hospedeiro na infecção tanto em humanos quanto em modelo experimental (Tabela 1) (56,62).

Quadro 1 Citocinas e quimiocinas expressas na infecção por *T. cruzi* em pacientes e modelo experimental

Citocinas e quimiocinas	Fases (aguda/crônica/IND/ severa/CCC moderada)	Hospedeiro (humano/animal)	Órgão/ tipo celular	REFERÊNCIAS
IFN- γ	CCC Severa	Humano	Células mononucleares	(59,63)
IFN- γ	CCC Severa	Humano	Miocárdio	(64,65)
IFN- γ	CCC Severa	Humano	Infiltrado inflamatório no coração (células T)	(63)
IFN- γ	IND/CCC Severa	Humano	Plasma	(63,66,67)
TNF- α	CCC Severa	Humano	Células mononucleares	(59,63)
TNF- α	CCC Severa	Humano	Infiltrado inflamatório no coração (células T)	(63)
TNF- α	CCC Severa	Humano	Miocárdio	(64,65)
TNF- α	IND/CCC Severa	Humano	Plasma	(63,66,68)
IFN- γ	Aguda/crônica	camundongo	Coração	(69,70)
TNF- α	Aguda/crônica	camundongo	Coração	(71)
IL-6	CCC Severa	Humano	Infiltrado inflamatório no coração (células T)	(63–65)
IL-2	CCC Severa	Humano	Infiltrado inflamatório no coração (células T)	(63–65)
IL-4	CCC Severa	Humano	Infiltrado inflamatório no coração (células T)	(63–65)
IL-10	CCC Severa	Humano	Infiltrado inflamatório no coração (células T)	(63–65)
IL-7	CCC Severa	Humano	Miocárdio	(72)
IL-15	CCC Severa	Humano	Miocárdio	(72)
IL-12	Aguda	camundongo	Células mononucleares	(73)
IL-18	Aguda	camundongo	Células mononucleares	(74)
IL-10	Aguda	camundongo	Células mononucleares	(75–77)
TGF- β	Aguda	camundongo	Células mononucleares	(28–30)
IL-17	crônica	camundongo	Células mononucleares	(78)
CCL2,CXCL10, CXCL9 (mRNA)	CCC Severa	Humano	Miocárdio	(79)
CCR2,CXCR3 (mRNA)	CCC Severa	Humano	Miocárdio	(79)
CCR5,CXCR3	IND/CCC Severa	Humano	Células mononucleares	(80)
CCL5,CXCL9,CXCL10	crônica	camundongo	Cardiomiócito	(81)
CCR5	crônica	camundongo	Coração	(82,83)
CCL5,CCL4, CXCR3, (mRNA)	crônica	cachorro	Coração	(84)

IND= Indeterminada/ CCC= Chagas Crônica com cardiopatia

traduzido de Cunha-Neto, 2014

1.6.2 Resposta imune em modelo experimental

1.6.2.1 Resposta imune inata

Após a entrada do patógeno no organismo, diversos fatores solúveis do sistema imune inato são ativados, como: proteínas do sistema complemento, anticorpos naturais e proteínas de fase aguda (85).

Entretanto, em modelo experimental a resposta imune inata na infecção por *T. cruzi* é desencadeada pela interação de moléculas do parasito com receptores de reconhecimento padrão (PRR, do inglês *Pattern Recognition Receptor*), que incluem os semelhantes à Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptor*) presente em diferentes tipos celulares do sistema fagocítico e não fagocítico. A ligação de *T. cruzi* com TLR leva a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B responsável pela transcrição de citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (IFN- γ), fatores de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucinas (IL) (IL-1, IL-12, IL-6 e IL-18) (53,86,87). De acordo com estudos realizados em animais independentemente da via (intraperitoneal e intravenosa), os principais TLRs envolvidos na infecção de *T. cruzi* são TLR-2, TLR-4 e TLR-9 interagindo com glicoproteínas, glicoinositolfosfolípideo ou DNA do parasito respectivamente. A deficiência desses receptores resulta na diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL12 (88–91).

No entanto, existem evidências da interação do parasito com outros receptores como por receptores do tipo NOD (do inglês *Nucleotid-binding Oligomerization Domain Receptors*) e a ativação de outros fatores de transcrição independente de TLR (87,92). Além disso, já foi observado que a invasão de *T. cruzi* pode ocorrer através de receptores LDL (do inglês *Low-Density Lipoprotein*) (93). A interação com esses receptores é essencial na ativação de células apresentadoras de antígenos, recrutamento de fagócitos para o tecido infectado e a morte do parasito (87,92).

Componentes de *T. cruzi* ativam células natural killer (NK) e macrófagos, resultando na produção de IFN- γ e IL-12 respectivamente. A presença de IL-12 em animais infectados pela via intraperitoneal induz o aumento de IFN- γ proveniente de NK, tornando-as as principais produtoras desta citocina na fase inicial da infecção. As células NK também são responsáveis pela produção de IL-4, que por sua vez, são importantes na diferenciação de células Th2 que secretam IL-10 para reduzir os efeitos exacerbados da resposta imune (87,94,95).

O IFN- γ é uma citocina importante na ativação de macrófagos e conseqüentemente estimula ao aumento de IL-12, TNF- α e óxido nítrico (NO) produzido por essas células (87,95). Já foi descrito que a presença de IFN- γ está relacionada à redução parasitemia e mortalidade de camundongos (linhagem 129Sv) infectados com *T. cruzi* por via intraperitoneal. Nesse trabalho foi observado que animais deficientes de IFN- γ (IFN- γ -R^{-/-}) apresentam um número elevado de parasitos circulantes e alta mortalidade quando comparados com camundongos normais (IFN- γ -R^{+/+}) (96). Além disso, em camundongos infectados por via intraperitoneal a produção de IFN- γ é essencial para a imunidade mediada por células T (97).

Os macrófagos são uns dos principais fagócitos que atuam contra micro-organismos intracelulares pela produção de componentes oxidativos e apresentação de antígenos para linfócitos T (85). Sua atuação contra *T. cruzi* em modelo murino infectado por via intraperitoneal está relacionada à produção de NO (*do inglês Nitric oxide*) estimulada por IFN- γ que inicialmente é produzido por NKs e posteriormente por linfócitos T ativados (51,70,71).

O NO é uma enzima com função citotóxica para *T. cruzi*, mas pode inibir a expressão molécula MHC II em APC. Em altas concentrações o NO inibe a síntese de IL-12, favorece a proliferação de células T reg e inibe a expressão de moléculas de adesão e migração celular (87,98).

Embora sejam importantes, de acordo com Kress, macrófagos não ativados só podem controlar a infecção se a taxa de parasitos por células for de 5:1. Se essa taxa for de 10:1, os macrófagos são destruídos após a multiplicação e os parasitos liberados para infectar outras células (99,100). Além disso, a infecção dos macrófagos induz a expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β por células Th2 prejudicando a resposta imune e favorecem a evolução da doença (43,50).

Além dos macrófagos e NKs, outras células do sistema imune inato também estão envolvidas na proteção contra *T. cruzi* como as células dendríticas que possuem suas funções prejudicadas por inibição de IL-12 secretada por macrófagos e inibida por mucinas derivadas do parasito (50,101).

Assim como macrófagos, as células dendríticas são fagocíticas, porém células especializadas na apresentação de antígenos, sendo essenciais na resposta mediada por linfócitos T e B. Elas contribuem para a conexão entre a resposta

imune inata e adquirida, e induzem uma resposta imune mais específica e eficiente contra o patógeno (85). A participação das células dendríticas na infecção por *T. cruzi* é muito importante devido a sua especialidade em apresentação de antígeno e expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e regulatórias como TGF- β e IL-10, secretadas em condições especiais (102). Além disso, Jaramillo e colaboradores (2016) mostram entre outros fatores que a expressão de MHC, CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) é diminuída quando as células dendríticas reconhecem o *T. cruzi* (102).

Embora sejam observados diversos mecanismos da resposta imune inata para eliminação do parasito, a resposta imunidade celular ou adaptativa é essencial e se inicia com atuação dos fagócitos e ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como linfócitos B, produzindo anticorpos antígenos específicos e de grande importância no controle do patógeno (50,101).

1.6.2.2 Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa se inicia com o reconhecimento de antígenos capturados, processado e apresentados por células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cell*) aos linfócitos, nos órgãos linfoides periféricos que estão localizados nos pontos de convergência dos vasos linfáticos (85). A migração das APC para os órgãos linfoides é um importante mecanismo do sistema imune para ativação dos linfócitos. Esse mecanismo depende da atuação de quimiocinas essenciais para o deslocamento celular, estrutura dos órgãos linfoides, além de facilitar a distribuição de células efetoras (103).

Constituem os órgãos linfoides periféricos o baço, responsável pela drenagem de antígenos provenientes do sangue, os linfonodos subcutâneos, que drenam de antígenos da pele; e tecidos associados à mucosa, como por exemplo: a mucosa do intestino, representado pelas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (85,104).

Nesses órgãos, os antígenos apresentados pelas APC são reconhecidos por receptores de células T (TCR, do inglês *T Cell Receptor*) quando expostos à superfície das APC via moléculas que fazem parte do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). As principais APC constituem as células dendríticas e macrófagos, além de linfócitos B que capturam antígenos solúveis que entram nos órgãos linfoides pelos vasos

linfáticos e os apresentam via MHC II a linfócitos T CD4 auxiliar. Porém, todas as células nucleadas podem atuar como APC apresentando seus antígenos via MCH I para os linfócitos T CD8. Vale ressaltar que o reconhecimento dos antígenos apresentados é de extrema importância para que esses linfócitos sejam ativados e promovam uma resposta mais eficiente contra o parasito (85,105).

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ secretam IFN- γ capaz de ativar macrófagos que exercem uma função microbicida contra o parasito pelo a produção de NO. Além disso, as APC são importantes na geração de linfócitos efetores que são essenciais na eliminação do *T. cruzi*, liberando citocinas responsáveis pela sua própria diferenciação em células com perfil Th1 e Th2 (87,106,107).

Embora existam diversas ações do sistema imune contra a permanência do *T. cruzi* no organismo, a infecção pode persistir e desencadear a doença crônica (87,108). A infecção por *T. cruzi* leva a proliferação intensa de linfócitos T CD8⁺ e diminuição da carga parasitária nos tecidos onde esses linfócitos são recrutados. E acredita-se que à inibição de linfócitos T CD8⁺ por outras populações como T CD4⁺CD25⁺ (T reg) e pela produção de TGF- β favoreça a presença dos parasitos nos tecidos. Além disso, o processo inflamatório contra o parasito também desencadeia uma forte ativação policlonal de linfócitos B. Estudos anteriores já mostraram a que a deficiência desses linfócitos (linfócitos B) ou de anticorpos induz uma parasitemia elevada e baixa taxa de sobrevivência. Durante a infecção os linfócitos B produzem anticorpos e seus diferentes isotipos podem exercer funções que contribuem para fixação do complemento, aglutinação ou citotoxicidade do parasito (87,109,110).

A ativação do sistema imune com atuação de linfócitos T/B e produção de citocinas pró-inflamatórias é importante para evitar a permanência do parasito no organismo. Entretanto, a resposta imune exacerbada pode causar danos teciduais durante a infecção. E para controlar a resposta contra o parasito é necessário a geração de mecanismos imunoreguladores que inclui a inibição de citocinas pró-inflamatórias, produzidas em excesso, que podem desencadear uma patologia como a cardiopatia (52,59). Dentre os mecanismos imunoreguladores encontra-se a supressão da resposta imune mediada por células T reg que controlam a resposta tanto em humanos quanto em modelo experimental (80).

Além disso, já se sabe que a IL-17, produzida por células Th17 regula o recrutamento de células inflamatórias e a diferenciação de células Th1 no tecido cardíaco (78,87).

1.6.2.3 Órgãos linfoides e ativação de linfócitos na infecção pelo *T. cruzi*

Os órgãos linfoides são formados por agregados de linfócitos (em sua maioria), emaranhado em uma rede de células não linfoides. Estão divididos em órgãos linfoides centrais que inclui medula óssea e o timo, e órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos e tecidos associados à mucosa(85,112,113).

A medula óssea é o órgão linfóide responsável pela maturação de linfócitos B, enquanto que, os linfócitos T passam pelo processo de maturação (aquisição do receptor TCR) e diferenciação (expressão de moléculas CD4 e/ou CD8) no timo. (85). A diferenciação dos linfócitos T ocorre a partir de células precursoras da medula óssea que migram para o timo. Essas células interagem com microambiente tímico, composto por células dendríticas, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais tímicas, além de citocinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8 e IFN- γ) e quimiocinas (CCL25, CXCL12, CCL21) presentes no órgão. A interação leva ao rearranjo dos genes de receptor TCR (receptor de células T) e ao processo de seleção positiva e negativa das células a partir da interação do receptor peptídeo-MHC próprio. A seleção dos timócitos é um processo importante no órgão e permite a morte das células que reagem fortemente com antígeno próprio (seleção negativa) ou a sobrevivência dos timócitos se o sinal de interação for fraco (seleção positiva). Além disso, as células precursoras de T duplo negativas (DN) (CD4⁻CD8⁻) passam por diferentes estágios de diferenciação (DN1, DN2, DN3 e DN4), tornando-se posteriormente duplo positiva (DP) (CD4⁺CD8⁺). Essas células se diferenciam ainda em linfócitos simples positivo, expressando CD4 ou CD8 conforme ilustrado na figura 2 (112,114,115).

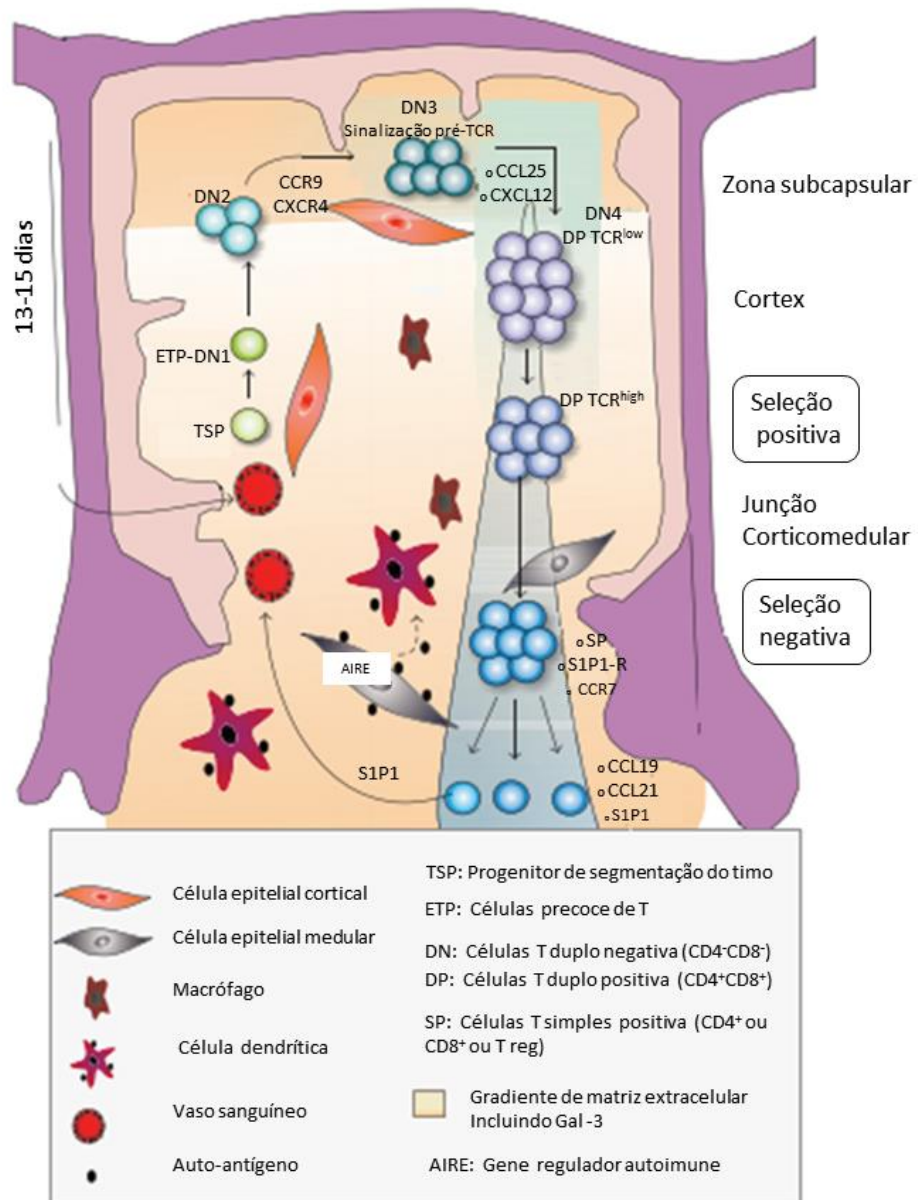


Figura 2. Diferenciação intratímica de células T. A diferenciação linfocitária inicia quando os precursores de células T entram no timo através de vénulas pós-capilares localizadas na junção corticomedular. Depois de entrarem no órgão, as células interagem com o microambiente tímico (células epiteliais tímicas, macrófagos, células dendríticas e fibroblastos), levando a sua proliferação e rearranjo de TCR. As interações entre timócitos e células especializadas do microambiente tímico apoiam e dirigem a diferenciação das células T através de uma série de interações incluindo interações receptor / co-receptor (MHC-TCR, Integrina/ ECM), citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IFN- γ), quimiocinas (CCL25, CXCL12 e CCL21) e hormônios, com os correspondentes receptores. Na zona sub-capsular, estes timócitos sofrem reordenamento e seleção da cadeia beta TCR. Os timócitos duplamente positivos (DP) migram através do córtex e iniciam o teste de TCR (seleção positiva). Os timócitos selecionados positivamente, localizados na medula, são rastreados quanto à auto-reatividade através de seleção negativa. A resistência na medula é seguida pela emigração, que é regulada pela esfingosina-1-fosfato e seu receptor (S1P1). Fonte: De Meis e colaboradores (2012) (116).

Os órgãos linfoides periféricos são responsáveis pela ativação dos linfócitos T e B conhecidos como linfócitos *naive* (virgens ou não ativados) (85,105,112). A ativação dos linfócitos é essencial para o início da resposta imune adaptativa. Resumidamente, em linfócitos T essa ativação ocorre após três eventos importantes: Interação antígeno-TCR, ligação de moléculas co-estimuladoras e expressão e atuação de citocinas (85,105). Especificamente, o primeiro evento se refere ao reconhecimento do antígeno por receptores TCR presentes na superfície dos linfócitos T. Esses antígenos são expostos à superfície da célula e apresentados pelas APC via moléculas de MHC de classe I para linfócitos T CD8⁺ ou MHC de classe II para linfócitos T CD4⁺. O 2º evento está relacionado à interação com moléculas co-estimuladoras como B7.1 e B7.2 (CD80 e CD86 respectivamente), presentes nas APC, com a molécula CD28 em linfócitos T. E o 3º e último evento que corresponde a atuação de citocinas importantes para proliferação e diferenciação dessas células (85,105). Além disso, os antígenos podem ser reconhecidos por linfócitos B presentes nos órgãos linfoides através de seu receptor BCR (*do inglês B cell receptor*). Nesse processo os linfócitos B são co-ativados por células T CD4⁺, tornando-se células plasmáticas para produção de anticorpos antígenos-específicos (85,105).

Na infecção por *T. cruzi* as células dendríticas são essenciais na apresentação dos seus antígenos e ativação dos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, via moléculas de MHC I e MHC II, respectivamente (102). Durante o processo de ativação os linfócitos recebem um sinal de ligação que dependendo da sua intensidade podem provocar a morte celular ou a modulação de moléculas de superfície importantes para diferenciação dessas células. De acordo com Lanzavecchia e Sallusto (2005) (117) se a intensidade de ligação desses linfócitos for muito fraca, as células podem morrer por negligência, ou morrer por morte induzida por ativação ou AICD (*do inglês "Activation-Induced Cell Death"*), se esse sinal for muito forte. No entanto, se a ligação entre as APCs e os linfócitos gerar um sinal intermediário, essas células são conhecidas como linfócitos não efetores de memória central e se diferem por expressar o receptor de quimiocina CCR7 e a molécula de adesão CD62L que é uma L-selectina importante para o retorno dos linfócitos aos linfonodos. Além disso, as células de memória central podem expressar em sua superfície a molécula ligante de CD40 (CD40L) e a CD44 que é um marcador de ativação de linfócitos, mas, está expresso em menor densidade nessas células (117,118).

Para que a célula *naive* se torne realmente uma célula de memória efetora, é necessário que o sinal de ativação seja um pouco mais forte do que o recebido pelas células de memória central. Esse sinal promove a perda de expressão do CCR7 e da molécula CD62L, mas aumenta nos linfócitos, a expressão de CD44 que é uma molécula de adesão importante para direcionamento dos linfócitos para o foco inflamatório e se liga a ácidos hialurônicos presentes no epitélio vascular (117–119).

É importante ressaltar que, tanto as células de memória central como as de memória efetora também podem ser diferenciadas pela expressão de citocinas como a IL-2 que é predominantemente secretada por células de memória central e, por citocinas como IL-4 e IFN- γ que são mais expressas em células de memória efetora do que nas de memória central (117).

O processo de ativação dos linfócitos na imunidade adaptativa, é essencial para proteção contra o parasito. Existem evidências que camundongos C57BL/10 imunizados com linfócitos T devido a uma transferência adotiva, estão mais protegidos contra a infecção (100,120,121). Além disso, a infecção por *T. cruzi* promove uma intensa resposta Th1 com linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e a presença de citocinas específicas como IFN- γ , IL-12 e TNF- α (43). No entanto, uma resposta imune exacerbada provocada pela infecção de *T. cruzi* promove dano tecidual mediado por células T CD4⁺ e CD8⁺ (59). Podemos observar que durante a fase aguda da infecção, existem reações inflamatórias localizadas com presença de células mononucleares e formação de granuloma e em alguns casos, hiperplasia dos linfonodos, fígado, baço e macrófagos parasitados (43). Além disso, já foi observado linfadenopatia e esplenomegalia, com deleção clonal de linfócitos T e forte ativação policlonal de linfócitos B tanto em humanos como modelos experimentais inibindo a formação de linfócitos antígeno-específicos (50).

De acordo com estudos anteriores, a resposta imune contra *T. cruzi*, durante a infecção aguda promove diversas alterações em tecidos linfoides como expansão do baço e linfonodo subcutâneo, retração dos linfonodos mesentéricos e das placas de Peyer, além de atrofia do timo. Esses dados evidenciam que os órgãos linfoides podem se comportar de maneira distinta, frente a uma infecção sistêmica, ou seja, que alcança todos os tecidos igualmente, promovendo uma resposta imune regional (114,122,123).

Já foi descrito que durante a infecção intraperitoneal de *T. cruzi* a atrofia do timo ocorre com depleção de linfócitos T imaturos (timócitos CD4⁺CD8⁺), apoptose

de timócitos por ativação de caspases 8 e 9, e pode estar associada a presença de TNF- α e glicocorticóides no soro e o envolvimento de moléculas derivadas do parasitos, como transialidases, ou do hospedeiro como galectina 3, e ATP extracelular (114,124,125). Além disso, a infecção induz um aumento na capacidade migratória de timócitos (favorecendo a liberação anormal de células para órgãos linfoides periféricos) e diminuição da capacidade proliferativa dessas células com deprivação de fatores de crescimento como IL-2 (123,124,126).

Em órgãos linfoides periféricos, a infecção intraperitoneal induz esplenomegalia, hipertrofia de linfonodos de drenagem subcutânea (LSC) com aumento da ativação de linfócitos T/B (ativação policlonal) e citocinas (IL-4, IL-10 e IFN- γ)(122). Em estágios mais tardios da infecção, a morte de linfócitos por apoptose (AICD) (127,128). Nos linfonodos mesentéricos (LM) foi observada uma atrofia associada à baixa capacidade proliferativa de linfócitos no tecido (menor produção de IL-2 e IL-4) e apoptose precoce de linfócitos por AICD e por deprivação de fatores de crescimento.

As placas de Peyer podem demonstrar atrofia durante a infecção intraperitoneal porém, existem poucos dados na literatura sobre o órgão (114,119,122). Além disso, podemos destacar que em relação à produção de IL-2, observamos que linfócitos T provenientes de LSC de animais infectados possuem plena capacidade de produção dessa citocina, contrastando com esplenócitos apresentam menor capacidade de síntese de IL-2 (129). Os resultados observados no timo, LSC, LM e baço foram revistos por De Meis (2009) conforme observado na figura 3 (122).

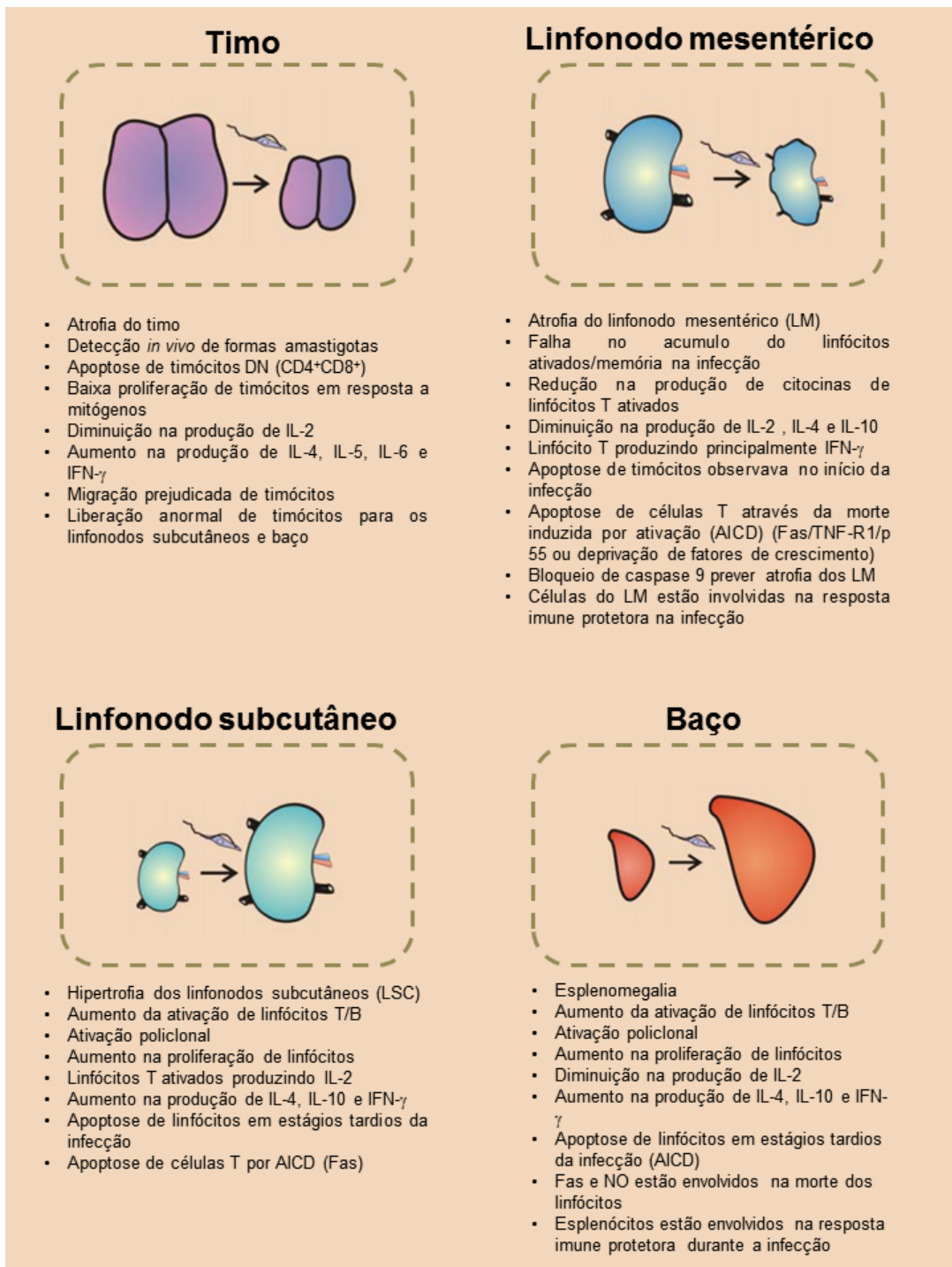


Figura 3 Dinâmica da resposta imune regional em órgãos linfoides após à infecção aguda experimental do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: De Meis *et al*, 2009 (122)

1.7 Justificativa

O presente trabalho justifica-se uma vez que diversos estudos já mostraram que infecção por *T. cruzi* possui um comportamento diferente de acordo com a porta de entrada do parasito. Sabe-se que animais infectados com *T. cruzi* por via sistêmica (intraperitoneal, intravenosa e subcutânea) possuem taxa de infecção (67-100%) e mortalidade maior do que os infectados por via de mucosa (oral, intragástrica, intrarectal, genital e congítival) (17-67%). As diferenças entre as vias subcutâneas e intranasal também foram observadas e os resultados apontam maior gravidade na infecção subcutânea (25,122,131). Além disso, nosso grupo mostrou que existem diferenças que afetam a resposta imune do hospedeiro, inclusive entre as vias de mucosa. Foi demonstrado que a taxa de mortalidade, os níveis de INF- γ e TNF- α , danos hepáticos estão mais elevados em os animais infectados oralmente do que os infectados por gavagem (direto no estômago) (34). Em conjunto, já foi observado que durante a infecção experimental por *T. cruzi* pela via intraperitoneal ou subcutânea ocorrem alterações em células e tecidos do hospedeiro. Dentre as quais podemos observar atrofia do timo e diferenças no padrão de celularidade dos órgãos linfoides periféricos com esplenomegalia e hipertrofia dos linfonodos subcutâneos ou atrofia dos linfonodos mesentéricos e das placas de Peyer (116,122). Vale ressaltar que a via de transmissão pode impactar diretamente a resposta imune no controle da infecção, a resistência do hospedeiro e a patogênese da doença (132). Portanto, torna-se de grande importância estudos que relacionam a via de transmissão do parasito e a sua influencia na resposta imune regional dos órgãos linfoides.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento do timo e dos órgãos linfoides periféricos (linfonodos subcutâneos, linfonodos mesentéricos, baço e placas de Peyer) de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Comparar a parasitemia de animais infectados por cada via de inoculação (oral, subcutânea e intravenosa);
- II. Avaliar a celularidade do timo, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM), baço e placas de Peyer (PP) de animais controle e infectados pelas diferentes vias de inoculação;
- III. Avaliar a expressão das moléculas de superfície de linfócitos tais como: CD4, CD8, CD19, CD3, CD44 e CD62L em cada tecido (timo, LSC, LM, Baço e PP) de animais controle e infectados;
- IV. Determinar o perfil de citocinas como: IL-10, IFN- γ , e TNF no soro de animais em cada grupo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

Os experimentos foram realizados com camundongos *BALB/c* machos com idade entre 6 e 8 semanas obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). Os animais foram utilizados com licença aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ sob os números LW23-12 e L-028/2016.

3.2 Obtenção dos parasitos e infecção

Para os diferentes grupos de infecção foi utilizada cepa *Tulahuén* de *T. cruzi*. A infecção foi realizada utilizando tripomastigotas de cultura celular (obtida de macrófagos peritoneal ou de células de linhagem VERO) e com tripomastigotas metacíclicos (obtidas das dejeções de triatomíneo infectado).

Para a obtenção dos parasitos de cultura, foi realizado lavado peritoneal em camundongos infectados com *T. cruzi*, ou estabelecida à cultura celular de linhagem VERO, cuja infecção foi realizada após 24 horas com ~20 parasitos/células. As culturas foram mantidas em garrafas de plásticos de 25 cm² e armazenadas em estufa de CO₂ a 37°C. A manutenção foi realizada a cada 48h, utilizando o meio de cultura RPMI e Soro Fetal Bovino (SBF) a 10%. Os parasitos liberados foram recolhidos, lavados por centrifugação (800g por 10 minutos) e contados em câmara de Neubauer.

As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas de triatomíneos infectados da espécie *T. infestans* após o repasto sanguíneo diretamente em camundongos *BALB/c* controles. As dejeções ou excreta (fezes e urina) dos triatomíneos foram coletadas com a utilização de eppendorf e os parasitos presentes no material recolhido foram contados em câmara de Neubauer.

Para a infecção, os camundongos foram mantidos de por 3 a 4 horas em jejum de água e comida, e inoculados por via oral (IO), subcutânea (SC) ou intravenosa (IV) com 5×10^4 parasitos em 50 µL de meio de cultura (RPMI com SBF

10%) ou presente em 50 μ L das dejeções obtida de triatomíneo. A infecção dos animais por via oral foi realizada através de micropipetadores com ponteiros de plástico e o parasito foi depositado diretamente na boca do camundongo. Na infecção intravenosa a inoculação dos parasitos foi feita na veia marginal olho (sinus retro-orbital), e na infecção por via subcutânea, os parasitos foram inoculados no dorso do camundongo. Em ambas infecções (intravenosa e subcutânea) foram utilizadas seringas de 1mL.

Os animais ainda foram mantidos em jejum por aproximadamente 15 minutos depois do inóculo e os experimentos realizados na fase aguda após 3, 7, 14 e 21 dias após a infecção (dpi).

3.3 Parasitemia

A parasitemia foi realizada mediante a obtenção de 5 μ L de sangue periférico recolhido da cauda dos animais e o material colocado entre lâmina (Corning 25 X 75 mm) e lamínula (Corning 18 X 18 mm) para busca do parasito ao microscópio. A procura foi realizada em microscópio óptico de campo claro (marca Zeiss) com aumento de 400 vezes (ocular de 10X e objetiva de 40X) e com pesquisa realizada em 50 campos microscópicos de acordo com o método de Pizzi-Brener (133).

3.4 Obtenção de células e tecidos de animais normais e infectados

No presente estudo, foram obtidos: timo, baço, linfonodos subcutâneos (dois axilares, dois braquiais e dois inguinais = seis linfonodos) e mesentéricos (cadeia mesentérica = quatro linfonodos) e placas de Peyer (n= quatro placas).

No processo de obtenção das células de cada grupo, os órgãos foram colocados em tubos de 15 ml contendo RPMI/SBF a 10% (Cultilab, Campinas, Brasil; pH 7,2), e delicadamente pressionados em potter para separação celular. As células desprendidas foram recolhidas em tubos de 15ml e centrifugadas a 450g, por 5 minutos.

As amostras de baço foram tratadas em solução hemolisante “Red Blood Cell Lysing Buffer” (Sigma Co. USA) por 5 minutos, temperatura ambiente, para retirada de hemácias. Posteriormente, o precipitado celular foi suspenso em 1ml de RPMI/soro, e a celularidade foi analisada utilizando contador de células (Particle counter, Beckman) de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 Estudos citofluorimétricos

A análise de moléculas de superfície celular de animais infectados em fase aguda foi realizada por citometria de fluxo, utilizando os mAb anti-CD44 FITC (clone IM7.8), anti-CD4 ALEXA 750, anti-CD8 PercP Cy 5.5, APC, anti-CD62L PE, anti-CD3 APC, anti-CD19 PE Cy 7; com suas respectivas Igs controles, fornecidos pela Pharmingen, San Francisco, USA.

Marcações de seis cores de imunofluorescência em suspensão com os anticorpos descritos foram realizadas após incubação das células com soro de camundongos, para bloqueio de receptores da porção Fc do anticorpo, por 20 minutos a 4°C. Depois de lavadas, as células foram fixadas e posteriormente analisadas no citômetro de fluxo. A região de linfócitos foi á determinada a partir dos parâmetros de luz, tamanho x granulosidade. As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCantoll utilizando-se o “software” FlowJo Flow Cytometry Software versão 7.5.5 (Tree Star, Inc; EUA).

3.6 Análise de citocinas

Para a análise das citocinas foram realizadas punções cardíacas em camundongos infectados e controles e o soro de cada grupo separado por centrifugação (1000g por 5 minutos). As amostras foram armazenadas a 70°C até o momento da análise. As citocinas IL-10, TNF e IFN- γ do kit CBA Th1, Th2 e Th17 (BD) foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com as orientações do fabricante.

3.7 Análise estatística

Para análises estatísticas dos resultados foram utilizados os testes Shapiro-Wilk (teste de normalidade), Mann-Whitney (One-tailed) e o One-way ANOVA (teste não paramétrico) (Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn) e os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Todos os testes e gráficos foram realizados no programa Graphpad Prisma 5.

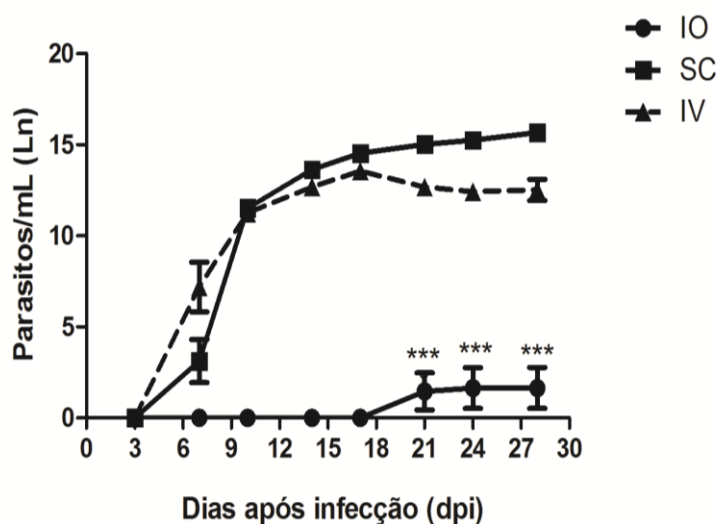
4 RESULTADOS

4.1 Teste de inóculo

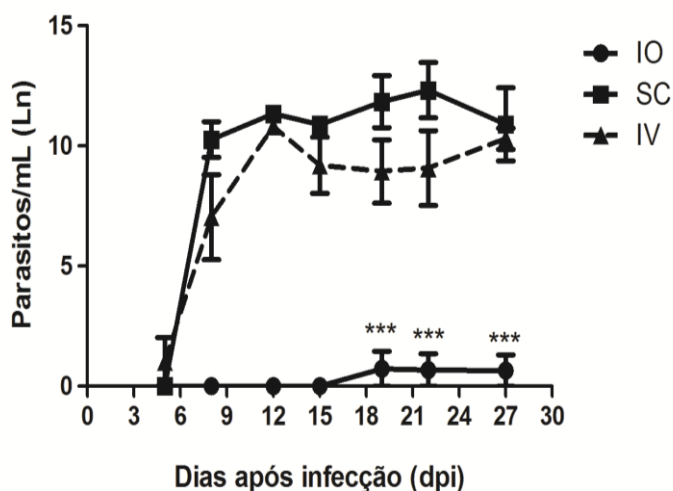
Inicialmente, realizamos um teste de inóculo cujo objetivo foi estabelecer a quantidade mínima de parasitos capaz de melhor infectar camundongos BALB/c por diferentes vias de inoculação. Os animais foram submetidos ao teste com 10^2 , 10^3 e 5×10^4 parasitos obtidos de cultura em 50 μ L de RPMI, sendo infectados pelas vias oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV), para mimetizarmos as principais vias de infecção com *T. cruzi* em humanos.

Os resultados demonstram que em média 20% a 60% dos animais positivaram no grupo IO, independentemente do inóculo, enquanto 100% dos animais infectados pelas vias SC e IV estavam positivos. Além disso, observamos um perfil semelhante de parasitemia entre os grupos (IO, SC e IV) com intensa parasitemia por infecção SC e sucessivamente menor nas vias IV e IO, independentemente do inóculo conforme mostra a figura abaixo (Figura 4A, B e C).

A) 10^2 Parasitos



B) 10^4 Parasitos



C) 5×10^4 Parasitos

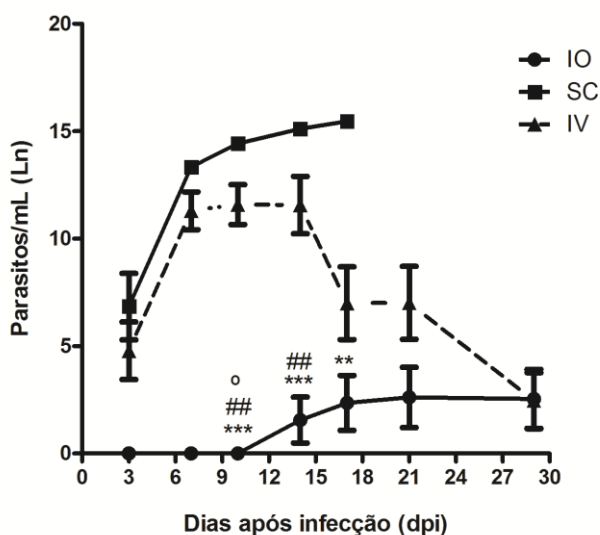


Figura 4 Teste de inóculo em camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de cultura por diferentes vias. Camundongos macho BALB/C (6 semanas de idade) foram infectados através das vias oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV) com: A) 10^2 parasitas, B) 10^3 parasitas e C) 5×10^4 parasitas em $50\mu\text{L}$ de RPMI. Os parasitas foram contados utilizando microscopia de luz, e a parasitemia calculada pelo método Brener. n: IO = 15; SC = 15; IV = 9 (10^2 e 10^3); IV = 14 (5×10^4). As avaliações foram realizadas em diferentes dias pós-infecção (dpi) e os resultados foram representativos de três experimentos independentes. Os valores representam logaritmo natural (Ln) de parasitos/mL. Análise estatística: One-way ANOVA (teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn). * Representam diferenças significativas entre IO e SC, # entre IO e IV e ° entre SC e IV. $p < 0,05$. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ: LW-23/12 e L-028/2016.

Sendo assim, padronizamos os experimentos com infecção dos animais com 5×10^4 parasitos cujo inóculo já foi padronizado pelo nosso grupo na infecção oral.

4.2 Parasitemia de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* obtido da excreta de triatomíneo da espécie *Triatoma infestans*

Sabendo que, na natureza as infecções orais e subcutâneas ocorrem com tripomastigotas metacíclicas proveniente da excreta (fezes e urina) de triatomíneo (*Triatoma infestans*) infectado, procuramos avaliar se perfil de parasitos circulantes nos grupos IO e SC infectados com *T. cruzi* da excreta do triatomíneo, se assemelha ao observado em animais infectados com parasitos de cultura.

Diferentemente dos resultados anteriores, os grupos avaliados (IO e SC), infectados com *T. cruzi* da excreta do triatomíneo, apresentaram parasitemias semelhantes, principalmente com 14dpi, mostrando que as formas tripomastigotas metacíclicas induzem uma parasitemia mais evidente no grupo oral (Figura 5).

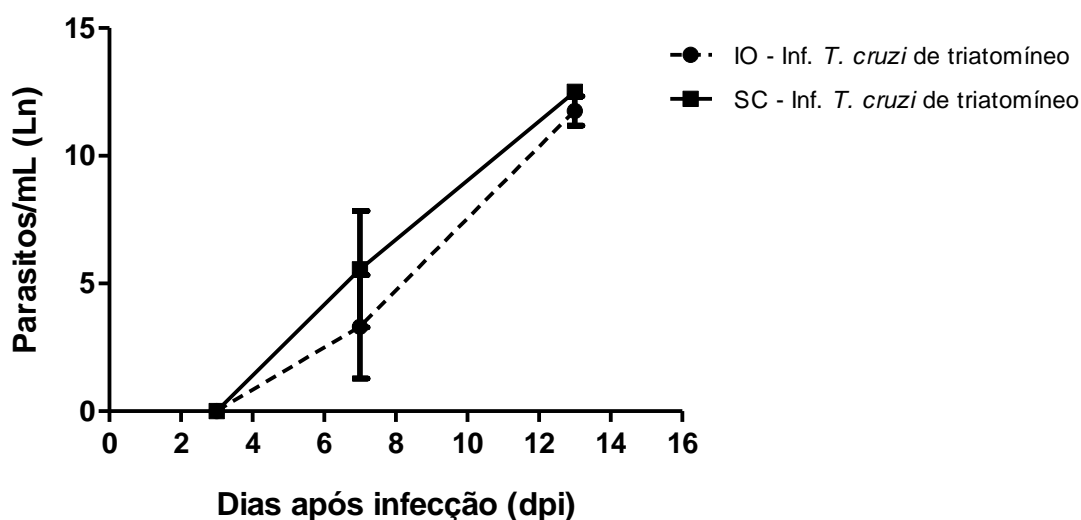


Figura 5 Parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de excreta de triatomíneo infectado. Camundongos macho BALB/C (6 semanas de idade) foram infectados através das vias oral (IO) e subcutânea (SC) com 5×10^4 parasitos em excreta de triatomíneo. Os parasitos foram contados utilizando microscopia de luz, e a parasitemia calculada pelo método Brener. n: IO = 5 e SC = 5. As avaliações foram realizadas em 7 e 13 dias pós-infecção (dpi) e os resultados representativos de um experimento. Os valores representam logaritmo natural (ln) de parasitos/mL. Análise estatística foi realizada utilizando o teste: Mann-Whitney (One-tailed). Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ: LW-23/12

Vale ressaltar que neste período (14dpi), os dois grupos (IO e SC) possuem parasitos circulantes quando inoculados com 5×10^4 parasitos, independente da origem do inóculo (Figura 4 e 5).

Com esses resultados, concluímos que a origem do inóculo altera o curso da parasitemia dos animais infectados por vias IO e SC. E de forma evidente observamos que os animais infectados com parasitos de cultura possuem parasitemia mais elevada na via SC e IV, porém, animais inoculados com *T. cruzi* obtido da excreta de triatomíneo (IO e SC), não apresentam diferenças de parasitemia entre as vias de infecção.

4.3 Influência da porta de entrada do *T. cruzi* na celularidade do Timo dos animais infectados com parasitos de cultura

Uma vez que foram observadas diferenças de parasitemia entre os grupos infectados com parasitos de cultura, avaliamos a influência da via de infecção (IO, SC e IV) na celularidade do timo. O experimento foi realizado em 7, 14 e 21 dias após a infecção (dpi) que corresponde à fase aguda, mas, com 21dpi, só foi possível analisar os grupos IO e IV, uma vez que os animais infectados via subcutânea já haviam ido a óbito, devido a elevada parasitemia observada na figura 4 neste período.

Os resultados mostram atrofia tímica nas vias SC e IV em relação ao controle (Co) com 14 dpi. Foi observado diminuição da celularidade do timo do grupo IV com 21dpi em relação ao Co e ao longo da infecção, quando comparamos 7dpi com 14dpi e 21dpi. Além disso, foram observadas diferenças entre os grupos IO e IV em momentos mais tardios da infecção (21 dpi) (Figura 6).

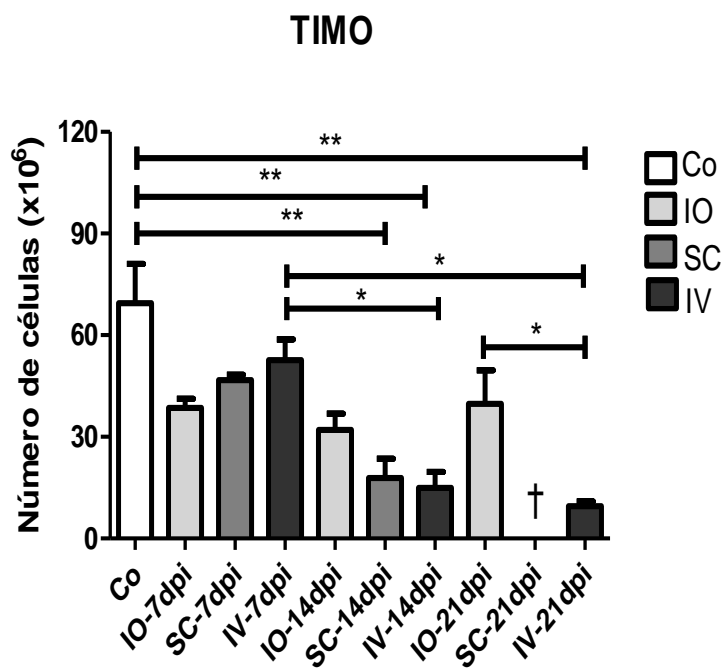
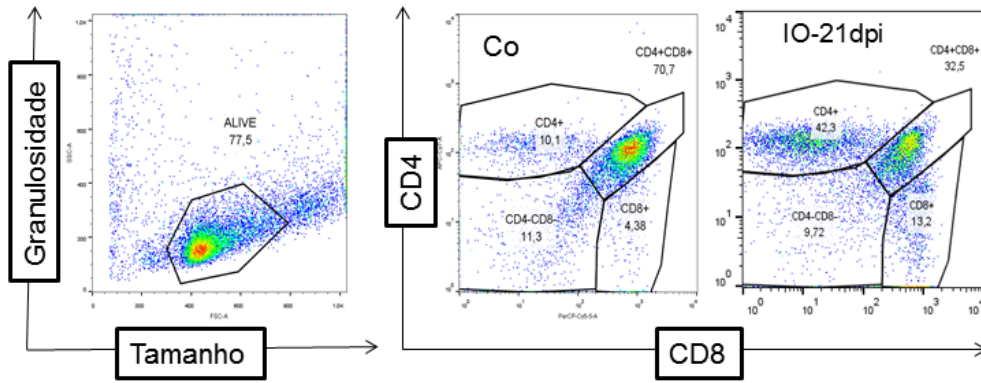


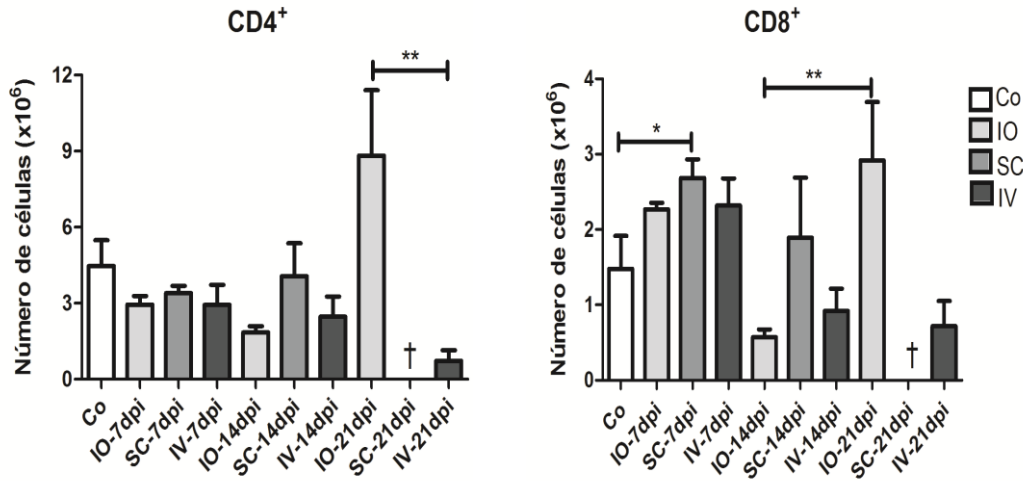
Figura 6 Celularidade do timo de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de cultura pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas vias oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV) com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de RPMI e comparações foram realizadas com 7, 14 e 21 dias pós-infecção (dpi). As células foram contadas utilizando contador de células (Particle counter, Beckman). Os resultados são representativos de seis experimentos totais independentes (1 com 7dpi, 3 com 14dpi e 2 com 21dpi). n: Co (controle) total = 14; IO (7 dpi) = 4, (14 dpi) = 10 e (21 dpi) = 8; SC (7 dpi) = 4 e (14 dpi) = 8; IV (7 dpi) = 4, (14 dpi) = 7 e (21 dpi) = 4. Análise estatística: Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ: LW23-12 e L-028/2016.

Os resultados observados evidenciam o impacto da infecção sobre o timo e sugerem que a via de inoculação pode influenciar na estrutura e população celular predominante no órgão. Sendo assim, nós avaliamos o número absoluto (10^6) de linfócitos T maduros ($CD4^+$ e $CD8^+$), considerando também as células imaturas duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$) ou duplo-negativas ($CD4^-CD8^+$) (Figura 7).

A)



B)



C)

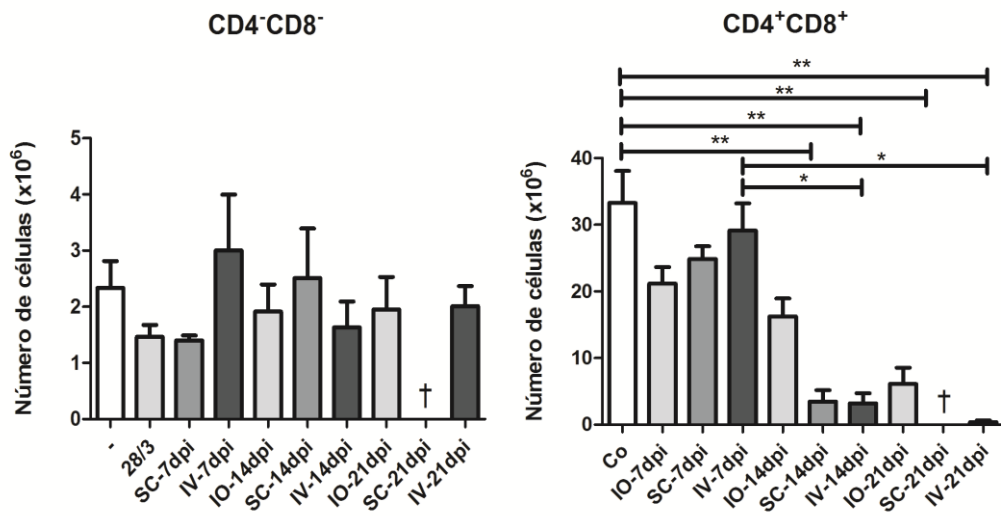


Figura 7 Número absoluto (10^6) de linfócitos T $CD4^+$ ou $CD8^+$, duplo-positivo ($CD4^+CD8^+$) ou duplo-negativo ($CD4^-CD8^-$) no timo de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de cultura pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção (IO, SC e IV) com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de RPMI e comparações foram realizadas com 7, 14 e 21 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações de linfócitos realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de seis experimentos totais independentes (1 com 7dpi, 3 com 14dpi e 2 com 21dpi). A figura representa: A) “Gate” de análise dos dados e “Dot plot” de separação das células no timo de animal controle e infectado; B) Células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e C) Células T $CD4^+CD8^+$ (DP) e $CD4^-CD8^-$ (DN). n: Co (controle) total = 12; IO (7 dpi) = 4, (14 dpi) = 10 e (21 dpi) = 8; SC (7 dpi) = 4 e (14 dpi) = 8; IV (7 e 21 dpi) = 4 e 7 (14 dpi) = 4. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

A figura 7A mostra como as subpopulações de timócitos foram definidas para análises. Os resultados observados, evidenciam que não existem diferenças de linfócitos T $CD4^+$ presentes no timo entre os grupos infectados com 7 e 14 dpi e o Co. Porém, com 21dpi existe um aumento de linfócitos T $CD4^+$ na via IO, destacando-se em relação ao grupo IV neste período. Aparentemente a presença de linfócitos T $CD8^+$ nos grupos infectados aumentam no início da infecção (7dpi), mas esse resultado fica mais evidente na via SC. O número de linfócitos T $CD8^+$ diminui na via IV com 14 e 21dpi em relação ao que foi observado com 7dpi. Curiosamente, observamos que na IO o número de linfócitos T $CD8^+$ diminui com 14dpi e aumenta aos 21dpi (Figura 7B).

As células duplo-negativas ($CD4^-CD8^-$) (DN) não mostraram diferenças entre os grupos. Em relação ao grupo controle as vias SC e IV com 14dpi e IO e IV com 21dpi apresentaram redução de células duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$) (DP). Além disso, é notório que a via IV reduz a população de células duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$) ao longo da infecção, quando comparamos animais infectados com 7dpi com os demais pontos analisados (14dpi e 21dpi) (Figura 7C). Os resultados apresentados foram sintetizados na tabela abaixo, tomando como referência o grupo Co (Quadro 2).

Quadro 2 - Subpopulações de Timócitos em camundongos infectados pelas via oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV)

Timócitos												
Dpi	T CD4 ⁺			T CD8 ⁺			T CD4 ⁻ CD8 ⁻			T CD4 ⁺ CD8 ⁺		
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV
7	-	-	-	↑	↑↑	↑	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	↓	↓
21	↑		↓	↑		-	-		-	↓		↓↓

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer
Dpi=Dias pós-infecção

- = Co ↑=Co<1x ↑↑ =Co< 2x ↑↑↑ =Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

Com esses resultados, sugerimos que atrofia tímica observada com 14dpi, nas vias SC e IV, está relacionada principalmente com a perda de linfócitos T DP (CD4⁺CD8⁺). Além disso, observamos que a via IO não apresenta alteração celular expressiva no órgão, mas induz o aumento T CD4 e a diminuição de células DP, sugerindo um balanço celular no micro ambiente tímico durante a infecção.

4.4 Celularidade dos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com *T. cruzi* de cultura

Estudos anteriores publicados por De Meis e colaboradores mostram que a infecção por *T. cruzi* por via intraperitoneal (IP), promove atrofia do timo com escape de células imaturas DP para periferia (105). Além disso, conforme citado anteriormente, dados do grupo evidenciam que durante a infecção são observadas alterações no padrão de celularidade dos órgãos linfoides periféricos com esplenomegalia, hipertrofia dos linfonodos subcutâneo (LSC), atrofia dos LM (linfonodo mesentérico) e das PP (placas de Peyer) (122,127,129). Com isso, avaliamos a influência da via de infecção na celularidade dos órgãos linfoides periféricos como: baço, LSC, PP e LM.

Os resultados demonstram que os órgãos linfoides periféricos apresentaram celularidades diferentes de acordo com a via de infecção. Os animais infectados pela via oral apresentaram esplenomegalia e hipertrofia dos linfonodos subcutâneos,

conforme já observado pelo nosso grupo (dados não publicados). Ao compararmos as diferentes vias, observamos que de fato o baço e os LSC aumentam na IO com 21 dpi em relação ao grupo controle e ao início da infecção (7 e 14dpi) (Figura 8A e B).

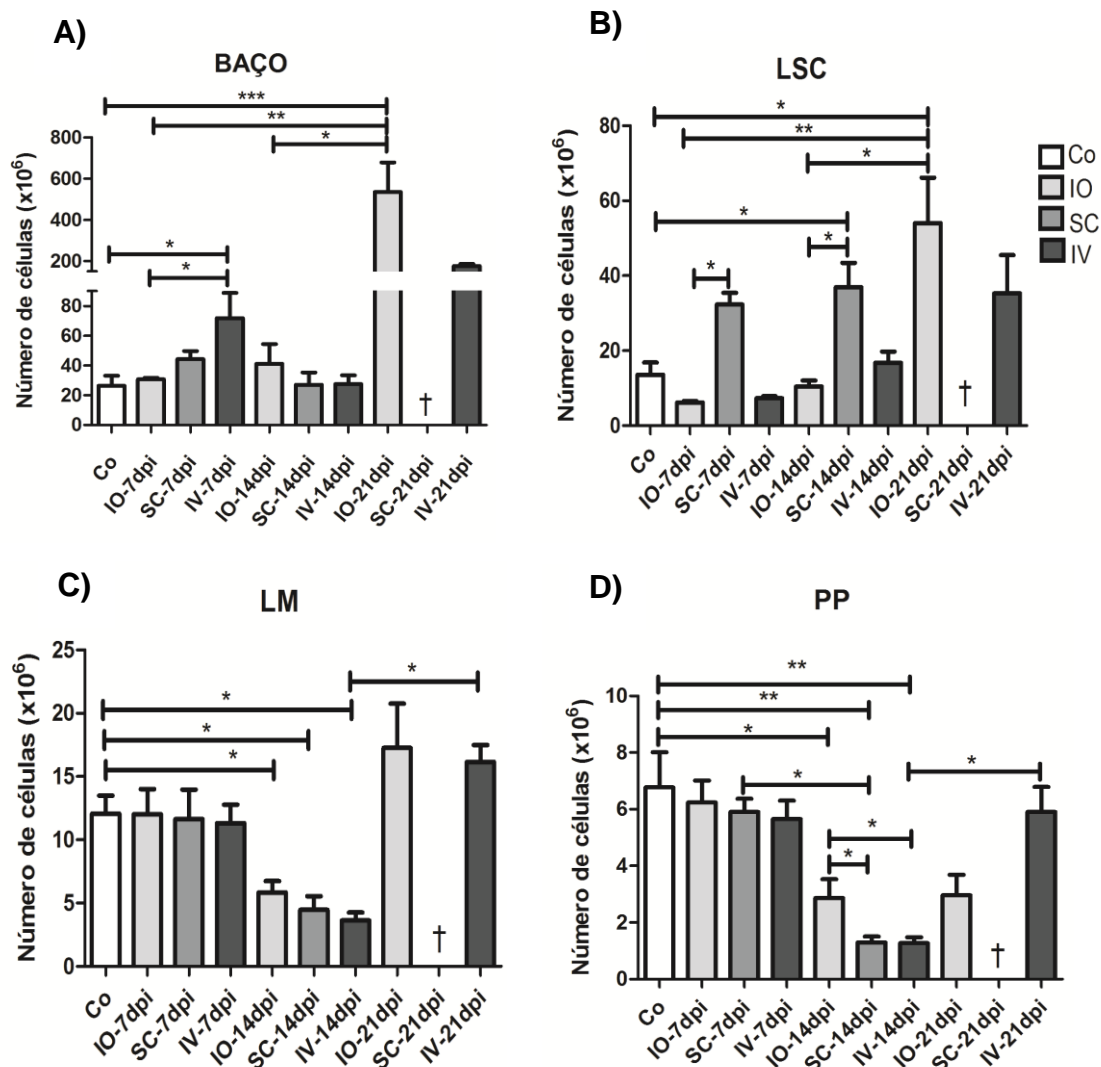


Figura 8 Celularidade do baço, linfonodos subcutâneos, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de cultura celular pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção (IO, SC e IV) com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de RPMI e comparações foram realizadas com 7, 14 e 21 dias pós-infecção (dpi). A figura representa: A) Baço; B) Linfonodo Subcutâneo (LSC); C) Linfonodo Mesentérico (LM) e D) Placas de Peyer (PP). As células foram contadas utilizando contador de células (Particle counter, Beckman) e os resultados representativos de seis experimentos totais independentes (1 com 7dpi, 3 com 14dpi e 2 com 21dpi). n: Co (controle) = 14; IO (7 dpi) = 4, (14 dpi) = 6 e (21 dpi) = 8; SC (7 dpi) = 4 e (14 dpi) = 8; IV (7 dpi) = 4, (14 dpi) = 7 e (21 dpi) = 4. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

Na infecção SC não observamos alteração no baço, porém houve hipertrofia dos LSC com 7 e 14dpi, destacando-se dos demais grupos (controle e infectado). Os LSC aumentaram significativamente na via SC, quando comparados a IO e ao Co. Nota-se que ao longo da infecção (7,14 e 21) os LSC aumentam nas vias IO e IV (Figura 8A e B).

Observamos que os grupos infectados possuem a celularidade dos LM semelhante ao Co com 7dpi (IO, SC e IV) e com 21dpi (IO e IV), mas reduzida em todos os grupos com 14dpi (Figura 8C).

Quanto as PP, os três grupos infectados diminuíram a celularidade com 14dpi em relação ao controle e observamos também que as vias SC e IV com 14dpi possuem menos células do que grupo IO. Além disso, com 21dpi aparentemente o as PP do grupo IV possuem mais células do que a IO, mostrando-se semelhante ao Co e ao que foi observado na via com 7dpi. Curiosamente a via IV diminui a celularidade das PP com 14 dpi, mas aumenta com 21dpi tornando-se semelhante ao controle (Figura 8D).

Durante os nossos experimentos observamos também que o número de PP foi reduzido em todos os grupos infectados em comparação ao grupo Co, variando entre 8 e 10 no grupo Co e 4 e 6 nos animais infectados (Quadro 3). A análise dos dados deste trabalho limitou-se a apenas 4 PP por grupo.

Contudo, os resultados apresentados reforçam que a infecção dos animais inoculados com *T. cruzi* de cultura promove alteração celular nos órgãos linfoides periféricos. Além disso, esses órgãos podem aumentar ou diminuir dependendo da porta de entrada do parasito, sugerindo a influência da via na celularidade dos órgãos. Tais resultados foram representados no quadro abaixo.

Quadro 3 Avaliação da celularidade dos órgãos linfoides periféricos

Órgãos linfoides periféricos	Celularidade								
	Co	7dpi			14dpi			21dpi	
		IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV
Baço	-	-	-	↑	-	-	↑	↑↑↑	↑↑
LSC	-	-	↑	-	-	↑	-	↑↑	↑
LM	-	-	-	-	↓	↓	↓	-	-
PP	-	-	-	-	↓	↓↓	↓↓	↓	-
Nº de PP	8 a 9	4 e 6							

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa

LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer

Dpi=Dias pós-infecção

- = Co ↑=Co<1x ↑↑ =Co< 2x ↑↑↑ =Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

4.5 Órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com *T. cruzi* de cultura e com excreta de triatomíneo com 14dpi

A partir dos resultados acima, que demonstram expansão ou retração dos tecidos linfoides, decidimos avaliar se a dinâmica na celularidade dos órgãos analisados (baço, LSC, PP e LM) também se altera de acordo com a origem do parasito. As análises foram realizadas com 14dpi, cuja parasitemia é patente independentemente na via de infecção como observado nas figuras 4 e 5. Foram comparados os órgãos dos animais infectados por vias IO e SC com *T. cruzi* obtidos da excreta de triatomíneo e obtidos de cultura.

Aparentemente a infecção com parasitos da excreta de triatomíneo (demostrada no gráfico à esquerda) induz o aumento do baço quando comparados ao grupo controle (Figura 9A).

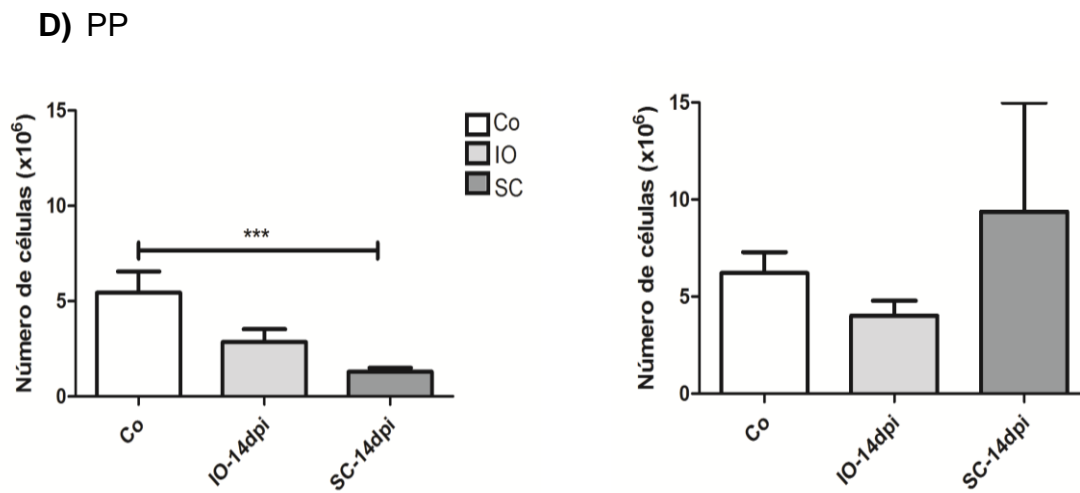
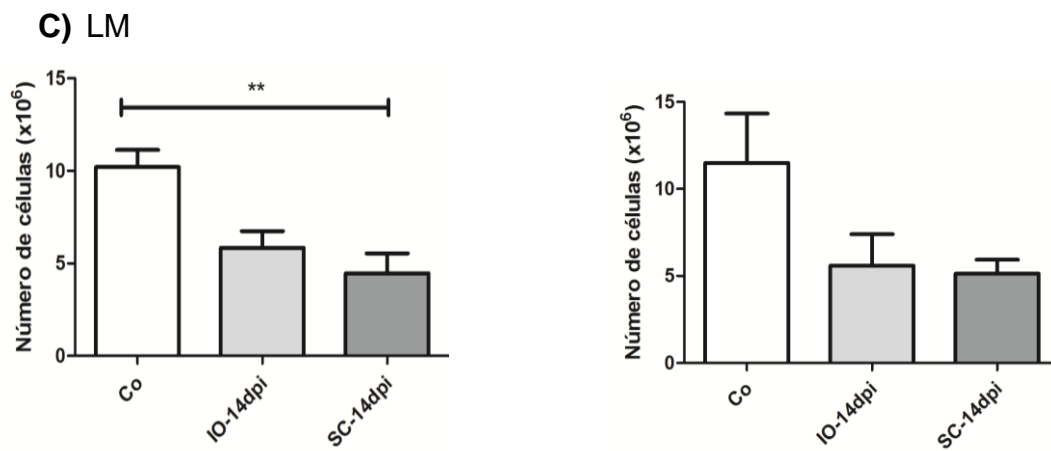
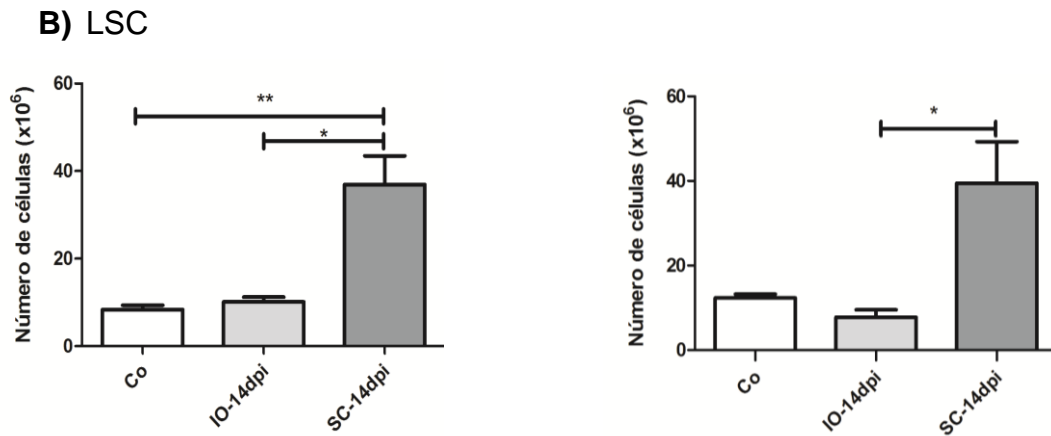
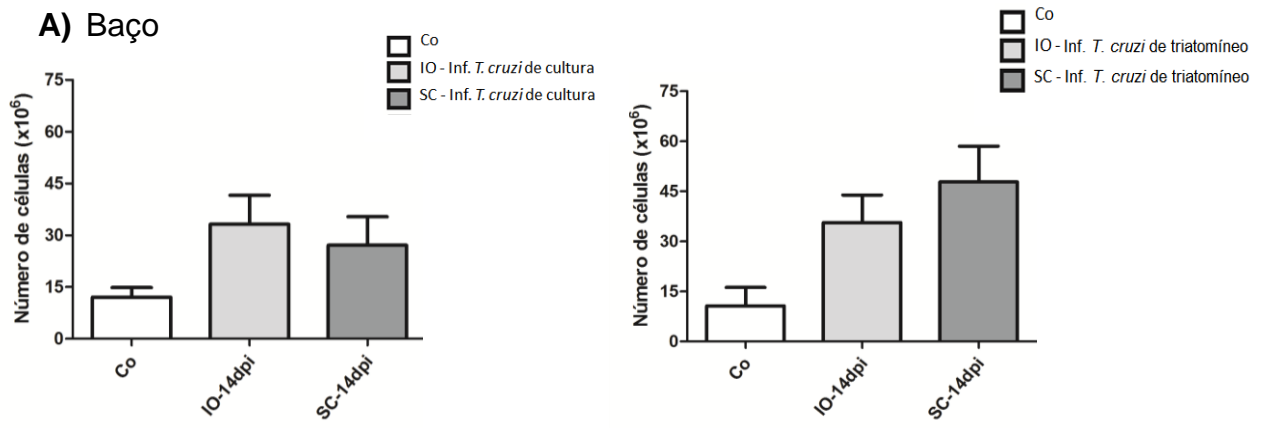


Figura 9 Comparação entre a celularidade do baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido da excreta de triatomíneo infectado (à direita) e de cultura celular (à esquerda) pelas vias oral e subcutânea. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC) com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de meio de cultura RPMI e excreta de triatomíneo. As comparações foram realizadas com 14 dias pós-infecção (dpi) e os resultados foram representativos de três experimentos com *T. cruzi* de cultura e um com os parasitos de excreta. As células foram contadas utilizando contador de células (Particle counter, Beckman). n = grupo infectado com *T. cruzi* de excreta: Co (controle) = 3, IO = 4 e SC = 4 e grupo infectado com *T. cruzi* de cultura: n= Co (controle) = 8, IO = 10 e SC = 8. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

Aparentemente, não existem diferenças no perfil de celularidade dos LSC e LM nos grupos infectados com parasitos de cultura e de excreta. Porém, as alterações encontradas nos LM e nas PP entre a via SC e o Co, foram mais evidentes nos animais infectados com parasitos de cultura (Figura 9B e C). A celularidade das PP mostrou-se alterada no grupo infectado com *T. cruzi* de cultura, principalmente nas vias SC e IV em relação ao Co (Figura 9D). E animais infectados com parasito da excreta de triatomíneo não mostraram diferenças na celularidade das PP independentemente do grupo infectado conforme observado na figura 9D.

Além disso, o número de PP encontrado não alterou entre os grupos infectados independentemente da origem do parasito (Quadro 4).

Esses resultados sugerem que a origem do parasito é importante neste período da infecção (14dpi), podendo influenciar no tamanho do baço, LM e PP dos grupos infectados (IO e SC). Entretanto, mostra hipertrofia dos LSC na via SC, independentemente da origem do parasito.

Os resultados obtidos das comparações entre os grupos Co e infectados com tripomastigotas de origens distintas, descritos acima, foram ilustrados no quadro 4 para melhor compreensão dos dados.

Quadro 4 Celularidade dos órgãos linfoides periféricos de animais infectados com cultura e excreta de triatomíneo

Órgãos linfoides periféricos	Celularidade – 14dpi				
	Co	<i>T. cruzi</i> de cultura		<i>T. cruzi</i> de excreta	
		IO	SC	IO	SC
Baço	-	↑	↑	↑	↑↑
LSC	-	-	↑↑	-	↑↑
LM	-	↓	↓	↓	↓
PP	-	↓	↓	-	-
Nº de PP	8 a 9	4 a 6			

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer
- = Co ↑=Co<1x ↑↑ =Co< 2x ↑↑↑ =Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

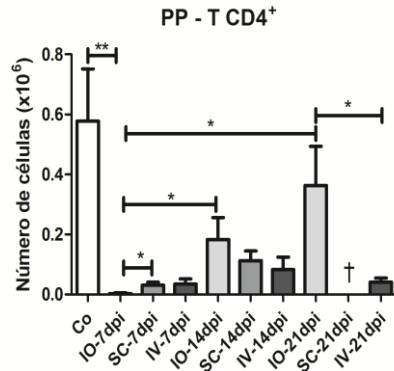
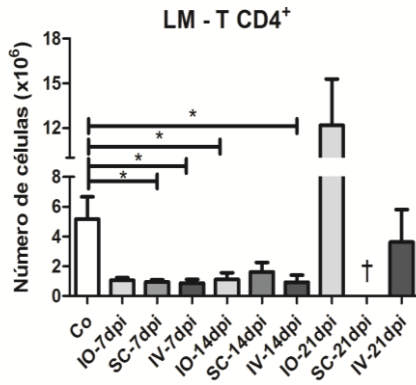
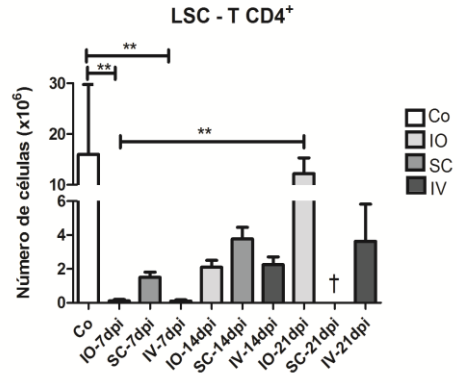
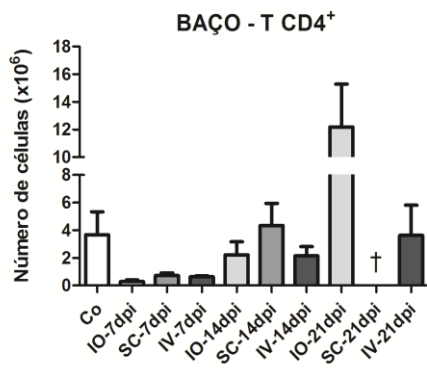
4.6 Linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B (CD19⁺) em animais inoculados parasitos de cultura

O perfil fenotípico das células presentes nos órgãos linfoides periféricos dos grupos de IO, SC e IV também foi avaliado e os resultados mostram diferenças relevantes quanto ao número de linfócitos T CD4⁺ (Figura 10), CD8⁺ (Figura 10B) e linfócitos B (CD19⁺) (Figura 10C).

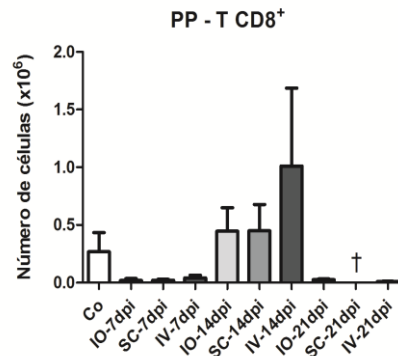
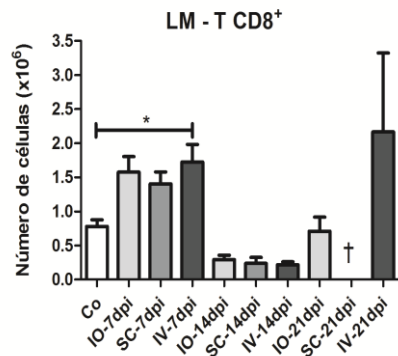
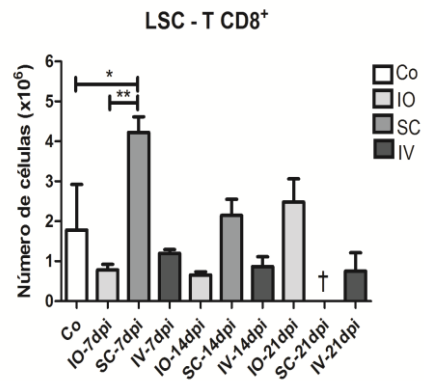
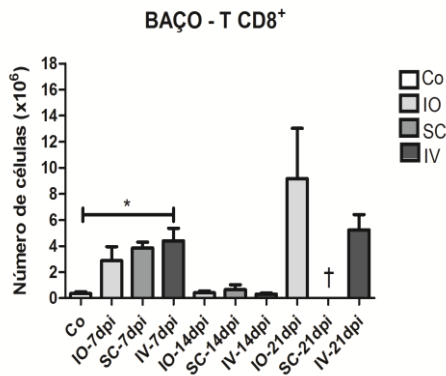
Verificamos que os linfócitos T CD4⁺ no baço diminuem inicialmente (7dpi) em todas as vias de infecção, mas aumentam ao longo da fase aguda principalmente na IO (Figura 10A). O grupo SC apresentou mais linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B nos LSC do que a IO e IV com 7dpi, cuja presença de T CD4⁺ foi significativamente menor que o controle (Figura 10A, B e C). Entretanto, a IO mostrou aumento de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B ao longo da infecção (7, 14 e 21dpi respectivamente) (Figura 10A e C).

Os grupos infectados também mostraram menos linfócitos T CD4⁺ nos LM com 7dpi, se comparados ao Co. No mesmo período, os linfócitos T CD8⁺ aumentam, porém, diminuem com 14dpi (Figura 10A e B). Para os linfócitos B não encontramos diferenças significativas no órgão entre os grupos (Figura 10C).

A)



B)



C)

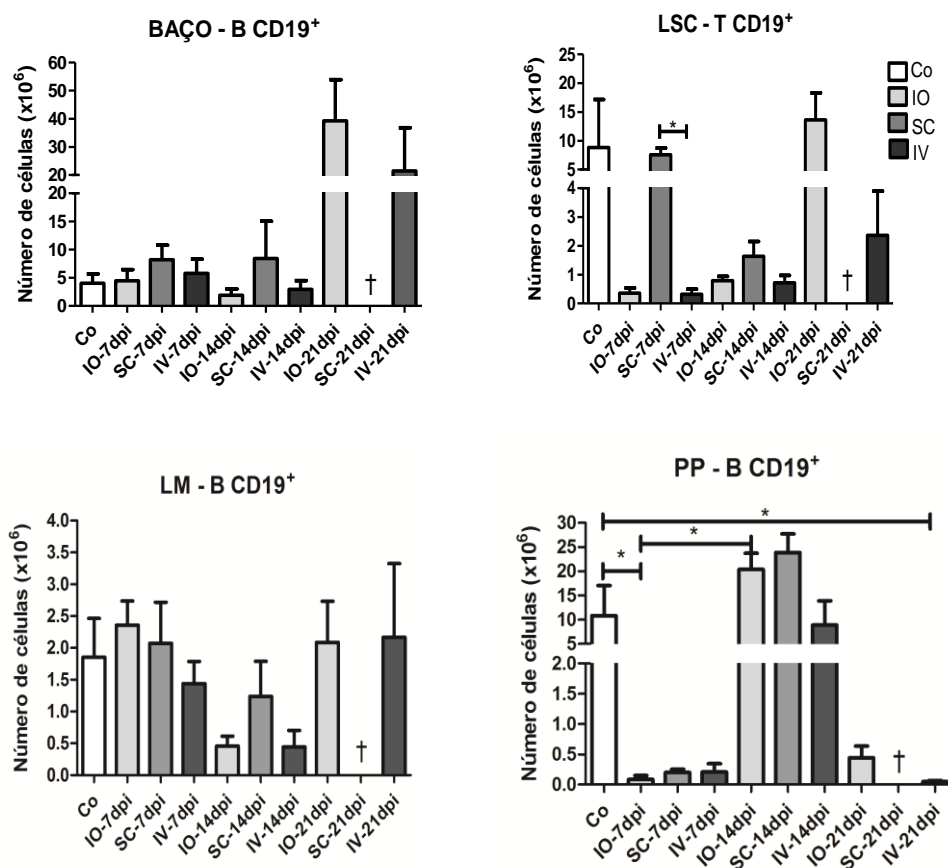


Figura 10 Número absoluto (10^6) de linfócitos T ($CD4^+$ ou $CD8^+$), e B ($CD19^+$) em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas vias vias oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV) com 5×10^4 parasitas em $50\mu\text{L}$ de meio de cultura RPMI e as comparações foram realizadas em 7, 14 e 21 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de seis experimentos totais independentes (1 com 7dpi, 3 com 14dpi e 2 com 21dpi). n: Co (controle) = 12; IO (7 dpi) = 4, (14 dpi) = 10 e (21 dpi) = 8; SC (7 dpi) = 4 e (14 dpi) = 8; IV (7 dpi) = 4 e (21 dpi) = 4. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * $P < 0,05$. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

Ainda conforme mostra a figura 10, nas PP, a via oral também apresenta menos os linfócitos T $CD4^+$ com 7dpi do que o encontrado nos demais grupos, destacando-se principalmente da via SC. Com 14dpi todos os grupos infectados possuem semelhanças quanto ao número de T $CD4^+$ neste órgão, mas apresenta diferenças significativas entre 7 e 14dpi na via oral (Figura 10A). Aparentemente os

grupos infectados possuem, uma diminuição de linfócitos T CD8⁺ com 7 e 21dpi quando comparados a infecção com 14dpi (Figura 10B). Esse resultado foi claramente observado quanto à presença de linfócitos B nas PP (Figura 10C).

A presença de linfócitos T/B nos órgãos linfoides periféricos de animais infectados com parasitos de cultura pelas diferentes vias também foram representadas nos quadros 5 (T CD4⁺), 6 (T CD8⁺) e 7 (B CD19⁺) abaixo.

Quadro 5 Linfócitos T CD4⁺ nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados por *T. cruzi* obtido de cultura

Órgãos linfoides periféricos	T CD4 ⁺							
	7dpi			14dpi			21dpi	
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV
Baço	↓	↓	↓	-	-	-	↑↑↑	-
LSC	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	↓	↓	↓	-	↓
LM	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↑↑↑	-
PP	↓↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	-	↓↓

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
 LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer
 Dpi=Dias pós-infecção
 - = Co ↑=Co<1x ↑↑=Co< 2x ↑↑↑=Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

Quadro 6 Linfócitos T CD8⁺ nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados por *T. cruzi* obtido de cultura

Órgãos linfoides periféricos	T CD8 ⁺							
	7dpi			14dpi			21dpi	
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV
Baço	↑	↑	↑	-	-	-	↑	↑
LSC	-	↑↑	-	-	-	-	-	-
LM	↑↑	↑↑	↑↑	-	-	-	-	-
PP				-	-	-		

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
 LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer
 Dpi=Dias pós-infecção
 - = Co ↑=Co<1x ↑↑=Co< 2x ↑↑↑=Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

Quadro 7 Linfócitos B (CD19⁺) nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados por *T. cruzi* obtido de cultura

Órgãos linfoides periféricos	B CD19 ⁺							
	7dpi			14dpi			21dpi	
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV
Baço	-	-	-	-	-	-	↑↑↑	↑↑↑
LSC	↓↓↓	-	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	-	↓↓
LM	-	-	-	↓	↓	↓	-	-
PP	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑	↑	-	↓↓↓	

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer
Dpi=Dias pós-infecção
- = Co ↑=Co<1x ↑↑=Co< 2x ↑↑↑=Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

Nota-se então que a infecção por *T. cruzi* (obtido de cultura) pelas vias IO, SC e IV induz a modulação na frequência das populações linfocitária dos órgãos analisados. E que essa frequência pode ocorrer de maneira distinta dependendo da via de inoculação do parasito. Além disso, o tempo de infecção pode favorecer a presença ou ausência desses linfócitos no órgão.

4.7 Linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B (CD19⁺) em animais inoculados com parasitos de cultura e excreta de triatomíneo

Para avaliar se a origem do inóculo influencia na frequência das populações linfocitárias dos órgãos linfoides comparamos a presença dos linfócitos T CD4⁺ (Figura 11), T CD8⁺ (Figura 12) e B (Figura 13) dos órgãos dos animais infectados com *T. cruzi* obtido de cultura com o grupo infectado com *T. cruzi* da excreta de triatomíneo em 14dpi.

Conforme demonstrado na figura 11, a frequência de linfócitos T CD4⁺ não se altera (entre os grupos infectados e Co) no baço, independente da origem do inóculo. Porém, aparentemente a IO nos animais infectados com parasitos da excreta possui menos linfócitos T CD4⁺ nos LSC do que os demais grupos neste período. Os grupos infectados com parasitos de cultura mostraram menos T CD4⁺ (principalmente o grupo SC) do que Co nos LM.

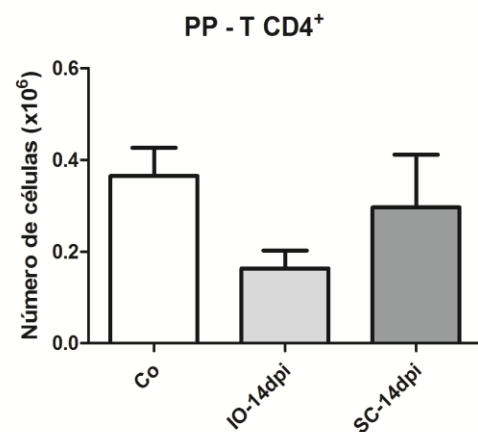
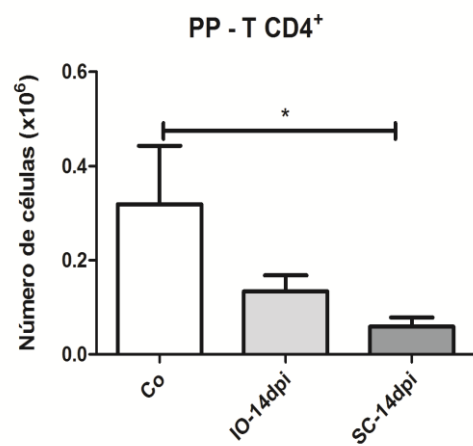
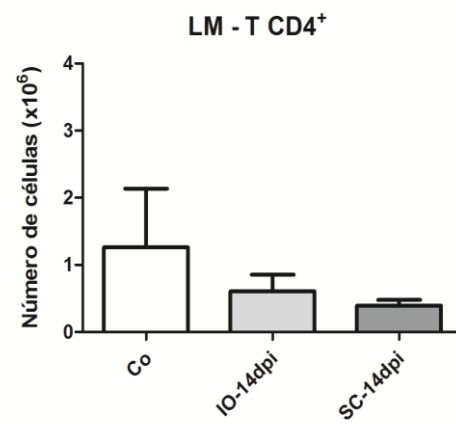
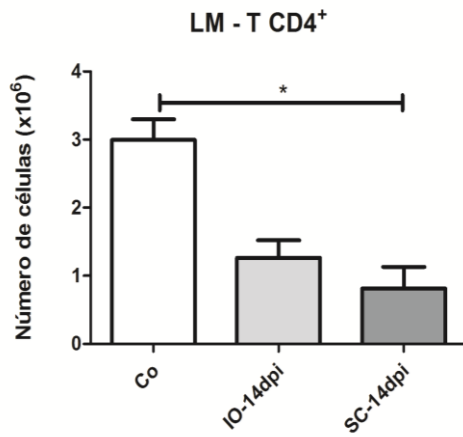
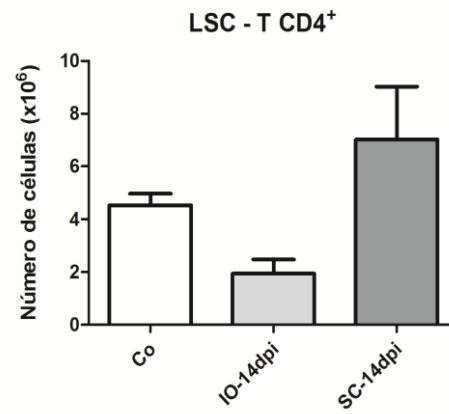
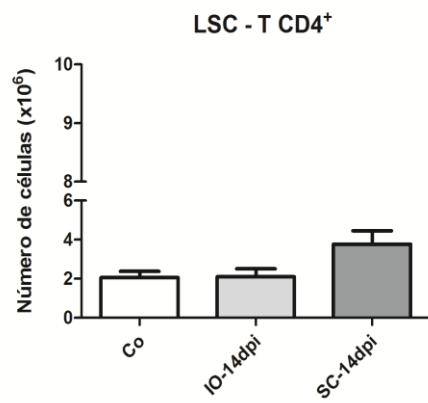
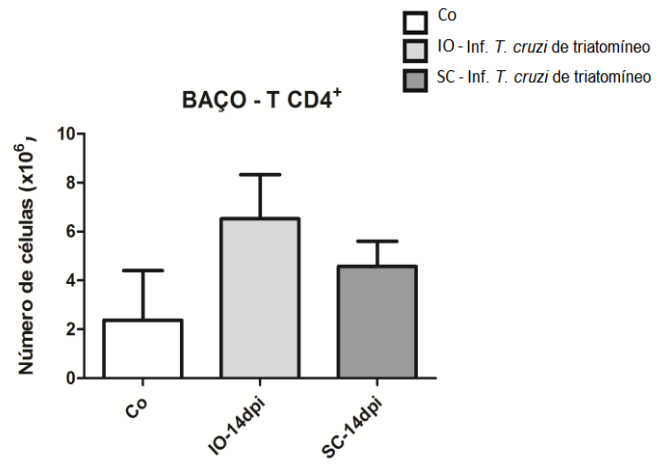
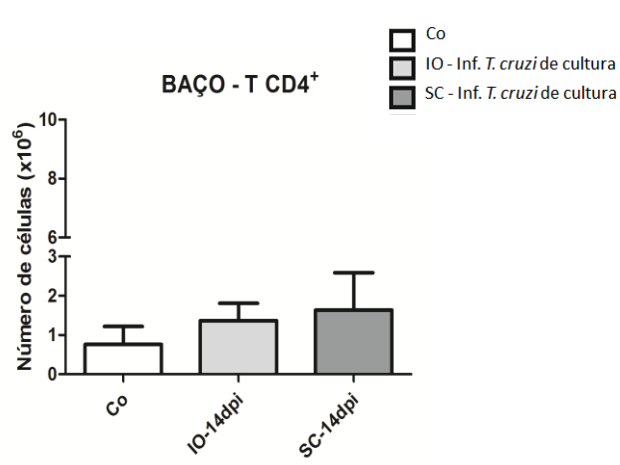


Figura 11 Número absoluto (10^6) de linfócitos T CD4⁺ presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de excreta de triatomíneo infectado (à direita) e de cultura celular (à esquerda) pelas vias oral e subcutânea. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de meio de cultura RPMI e excreta de triatomíneo pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC). As comparações foram realizadas com 14 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de três experimentos com parasitos de cultura e um com os parasitos de excreta. n = Grupo infectado com *T. cruzi* de excreta: Co (controle) = 3, IO = 4 e SC = 4 e Grupo infectado com *T. cruzi* de cultura: n= Co (controle) = 8, IO = 10 e SC = 8. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

Ainda observamos que as PP dos animais infectados com parasitos de cultura reduziram a frequência de T CD4⁺ nos grupos SC em relação ao Co. Porém, não foi verificada alterações na presença de linfócitos T CD4⁺ nas PP dos animais infectados com parasitos da excreta por via SC também em comparação ao Co (Figura 11).

Além disso, observamos a presença de linfócitos T CD8⁺ e nossos resultados mostram que no baço não difere entre os grupos, porém nos LSC a diferença entre o número de T CD8⁺, entre o grupo IO e SC fica mais evidente nos animais infectados com parasitos da excreta. Aparentemente, os LM dos grupos infectados se diferem do grupo Co, reduzindo as células T CD8⁺, sendo esses resultados significativos no grupo infectado com *T. cruzi* de cultura. Verificamos que no grupo infectado com *T. cruzi* de triatomíneo, a presença de T CD8⁺ nas PP é menor do que no grupo controle. Diferentemente, as PP dos animais infectados com *T. cruzi* de cultura, não apresentaram diferenças entre as vias de inoculação (Figura 12).

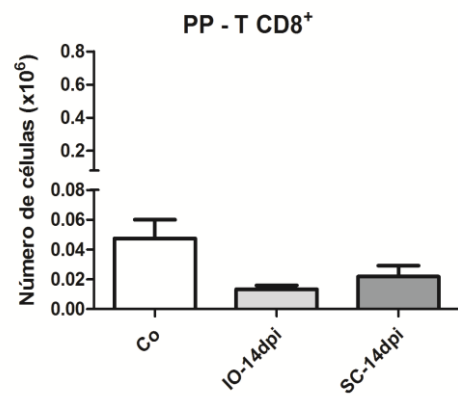
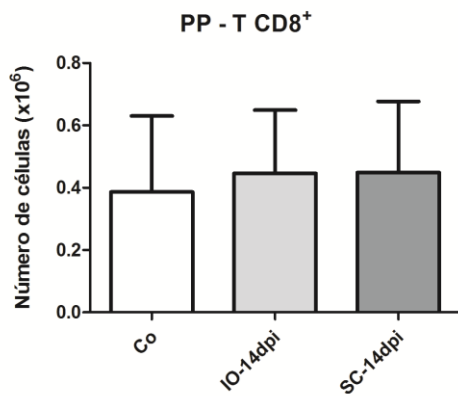
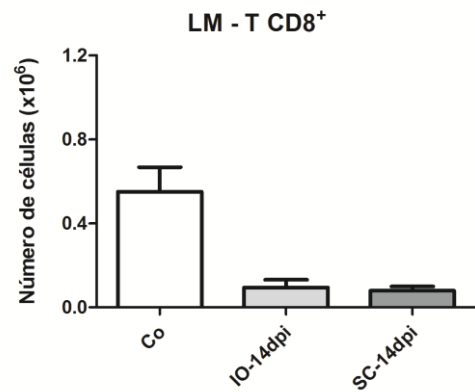
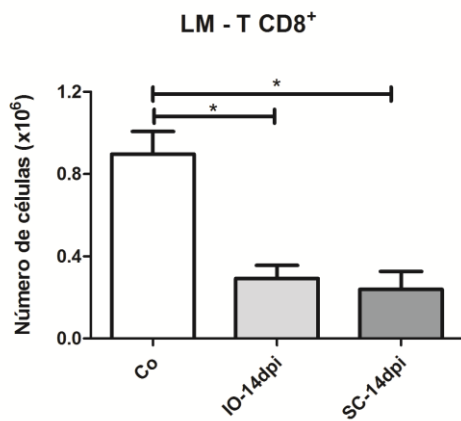
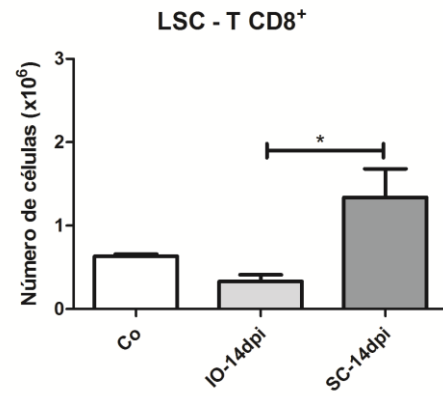
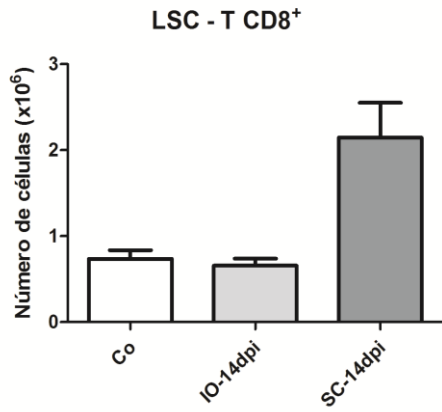
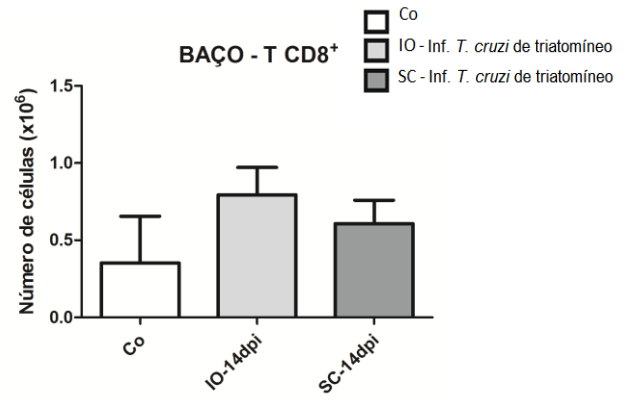
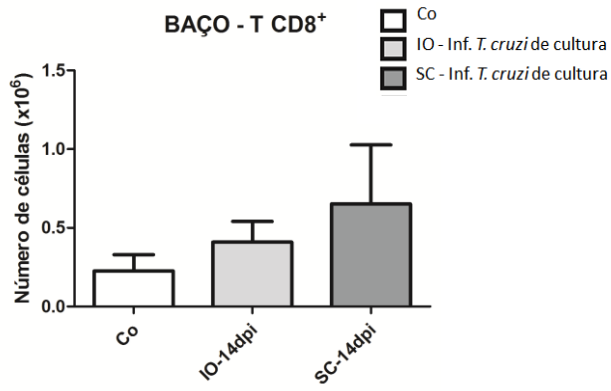


Figura 12 Número absoluto (10^6) de linfócitos T CD8⁺ presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de excreta de triatomíneo infectado (á direita) e de cultura celular (á esquerda) pelas vias oral e subcutânea. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de meio de cultura RPMI e excreta de triatomíneo pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC). As comparações foram realizadas com 14 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de três experimentos com parasitos de cultura e um com os parasitos de excreta. n = Grupo infectado com *T. cruzi* de excreta: Co (controle) = 3, IO = 4 e SC = 4 e Grupo infectado com *T. cruzi* de cultura: n= Co (controle) = 8, IO = 10 e SC = 8. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

Quanto aos linfócitos B, os resultados observados na figura 13 mostram que aparentemente apenas o baço do grupo IO infectado com parasito de triatomíneo, aumenta o número desses linfócitos (linfócitos B).

Verificamos também que os LSC apresentam elevado número de linfócitos B na via SC nos dois grupos (infectado com *T. cruzi* de cultura e de excreta do triatomíneo), sendo significativamente maior do que o Co no grupo de cultura e na via IO do grupo de excreta.

Nos LM, a presença de linfócitos B não difere entre os grupos quando avaliado nos animais infectados com excreta de triatomíneo. Porém, diminuem em todas as vias, com relação ao Co, nos animais infectados com parasitos de cultura. Além disso, as PP dos animais infectado com *T. cruzi* de triatomíneo, apresentam alterações entre o Co e a via IO. Observamos que aparentemente existe uma diminuição de linfócitos B na via oral no órgão (Figura 13).

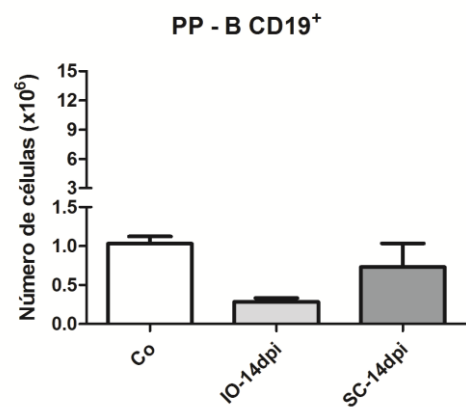
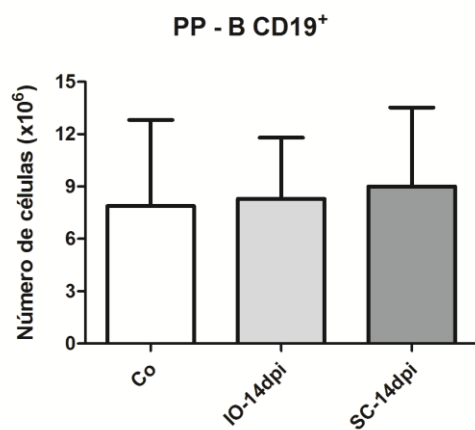
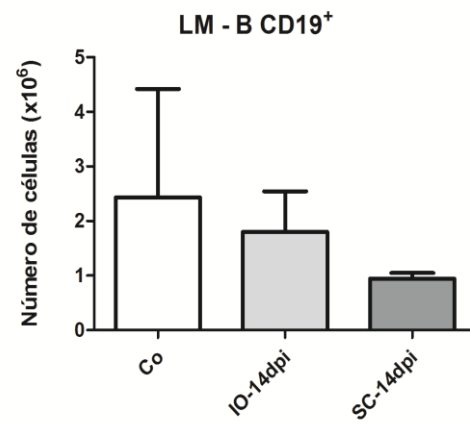
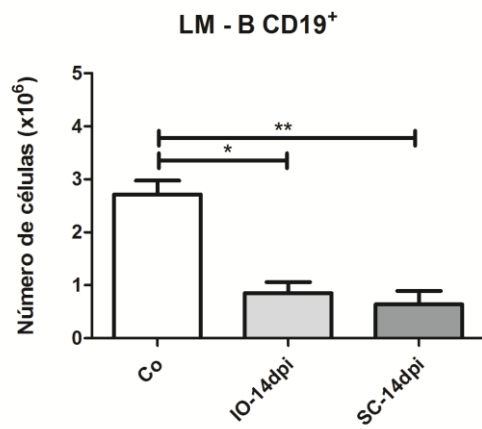
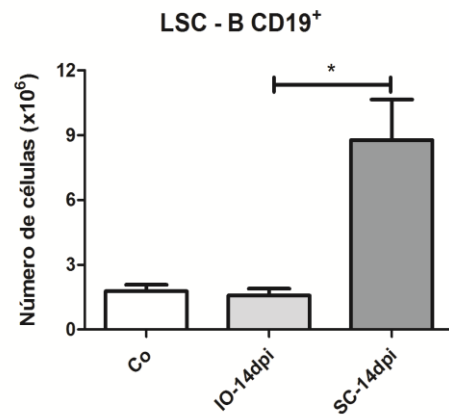
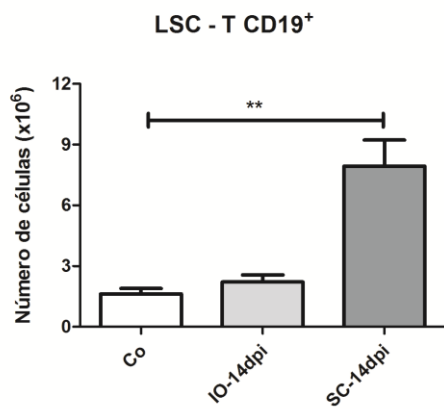
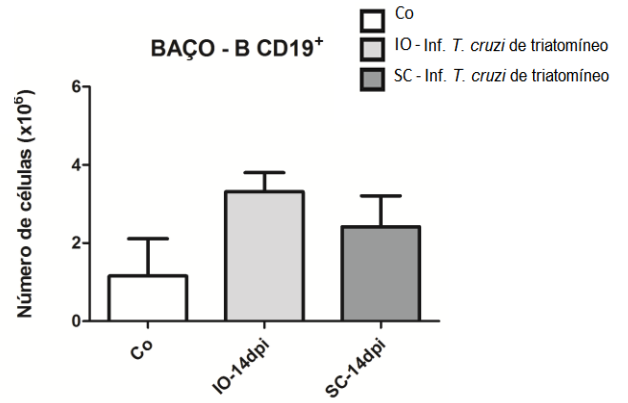
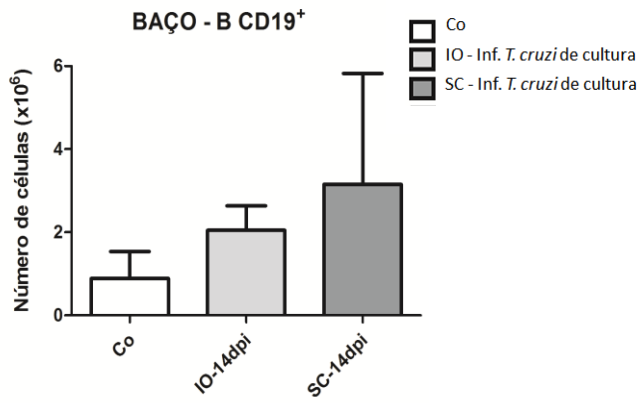


Figura 13 Número absoluto (10^6) de linfócitos B ($CD19^+$) presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido de excreta de triatomíneo infectado (à direita) e de cultura celular (à esquerda) pelas vias oral e subcutânea. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de meio de cultura RPMI e excreta de triatomíneo pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC). As comparações foram realizadas com 14 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de três experimentos com parasitos de cultura e um com os parasitos de excreta. n = Grupo infectado com *T. cruzi* de excreta: Co (controle) = 3, IO = 4 e SC = 4 e Grupo infectado com *T. cruzi* de cultura: n= Co (controle) = 8, IO = 10 e SC = 8. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

Os resultados descritos anteriormente, nas figuras 11, 12 e 13 também são representados nos quadros 8 (linfócitos T $CD4^+$), 9 (T $CD8^+$) e 10 (linfócito B $CD19^+$).

Quadro 8 Linfócitos T $CD4^+$ presente nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido da excreta de triatomíneo e de cultura celular pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC)

Órgãos linfoides periféricos	T $CD4^+$			
	<i>T. cruzi</i> de cultura		<i>T. cruzi</i> de excreta	
	IO	SC	IO	SC
Baço	-	-	↑	-
LSC	-	-	↓	-
LM	↓	↓	-	-
PP	↓	↓	↓	-

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer
- = Co ↑=Co<1x ↑↑ =Co< 2x ↑↑↑ =Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

Quadro 9 Linfócitos T CD8⁺ presente nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido da excreta de triatomíneo e de cultura celular pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC)

Órgãos linfoides periféricos	T CD8 ⁺			
	<i>T. cruzi</i> de cultura		<i>T. cruzi</i> de excreta	
	IO	SC	IO	SC
Baço	-	-	-	-
LSC	-	↑	-	↑
LM	↓	↓	↓	↓
PP	-	-	↓	-

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer
- = Co ↑=Co<1x ↑↑ =Co< 2x ↑↑↑ =Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

Quadro 10 Linfócitos (B CD19⁺) presente nos órgãos linfoides periféricos de camundongos infectados com *T. cruzi* obtido da excreta de triatomíneo e de cultura celular pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC)

Órgãos linfoides periféricos	Linfócitos B (CD19 ⁺)			
	<i>T. cruzi</i> de cultura		<i>T. cruzi</i> de excreta	
	IO	SC	IO	SC
Baço	-	-	↑	-
LSC	-	↑↑↑	-	↑↑↑
LM	↓↓	↓↓	-	-
PP	-	-	↓↓	-

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer
- = Co ↑=Co<1x ↑↑ =Co< 2x ↑↑↑ =Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

4.8 Perfil ativação linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B (CD19⁺) órgãos linfoides periféricos

Neste trabalho, foi avaliado ainda o estado de ativação linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B (CD19⁺), expressando CD44⁻CD62L⁺ com perfil de células *naive*, CD44⁺CD62L⁺ perfil de células de memória central ou CD44⁺CD62L⁻ perfil de células efetoras. Inicialmente analisamos o perfil de ativação dos órgãos dos animais infectados com parasitos de cultura.

4.8.1 Células com perfil *naive* (CD44⁻CD62L⁺)

Os resultados representados na figura 14 mostram que no Baço não existem diferenças significativas entre os grupos, mas apresenta um discreto aumento de células T CD4⁺ *naive* nos grupos SC e IV com 7dpi, quando comparados à via IO e ao Co. Entretanto, observamos que esses linfócitos parecem aumentar na IO com 21 dpi principalmente em relação à via IV (Figura 14A). Ao avaliarmos T CD8⁺ no baço com 7 e 21 dpi, verificamos que todos os grupos possuem números mais elevados que Co. E nota-se aumento de CD8⁺ *naive* entre os grupos IO, SC e IV respectivamente no órgão (Figura 13B). Os linfócitos B também parecem estar mais presente nos grupos infectados com 7 dpi do que o Co. Porém destaca-se a via IV com 21dpi em relação aos Co e IO neste período (Figura 14C).

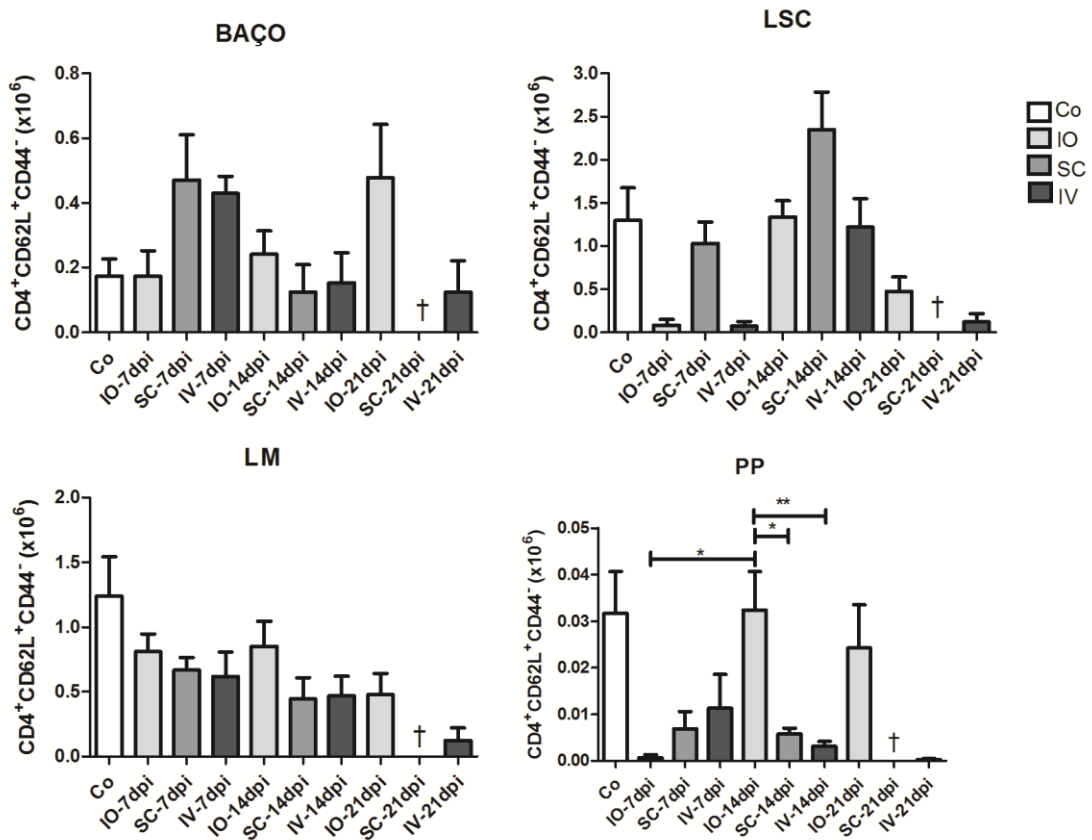
Nos LSC, a presença de T (CD4⁺ e CD8⁺) e B *naive* com 7 dpi foi maior na infecção SC do que nos grupos IO e IV que diminuem inclusive em relação ao Co neste período (a exceção de T CD8⁺ no grupo IV). Nota-se que o grupo IO e IV aumenta entre 7 e 14dpi células *naive* T CD4⁺ e depois diminuem (Figura 14A,B e C).

Em nossos experimentos, os linfócitos T CD4⁺ presentes nos LM reduzem com 21dpi na via IV (Figura 14A). Observamos que os LM perdem linfócitos T CD8⁺ e B com 14 dpi, independentemente da via, mas diminui T CD8⁺ e B na via IO com 21 dpi (Figura 14B e C).

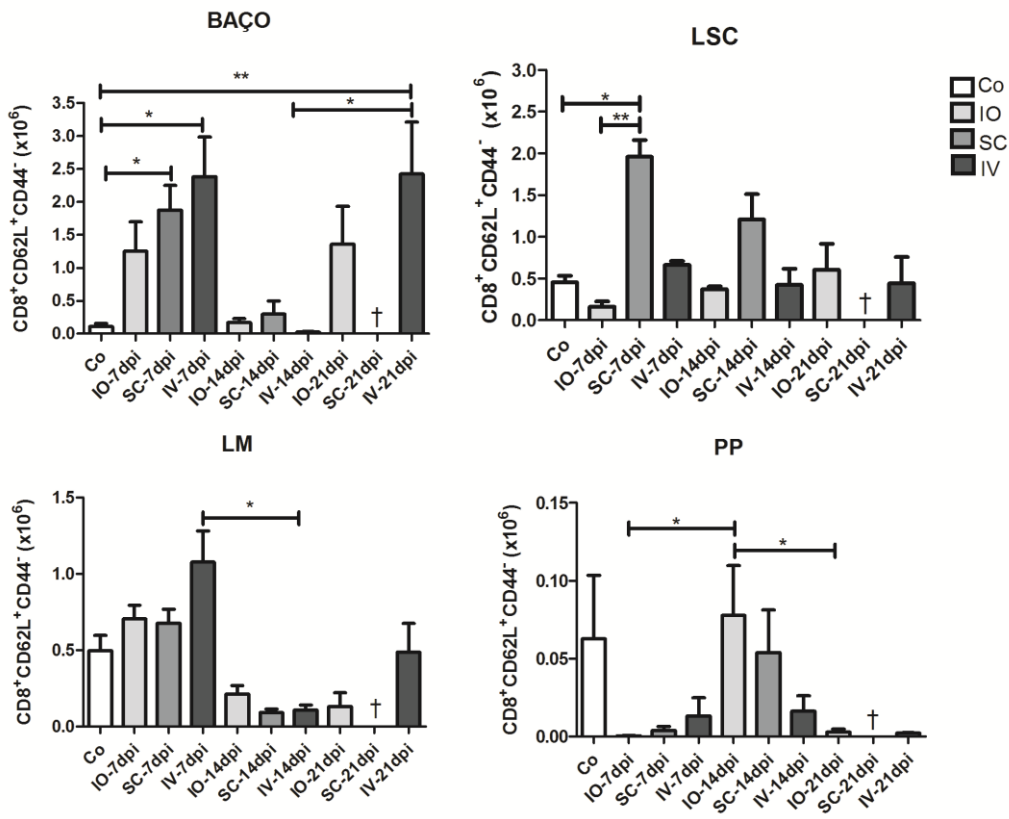
Claramente foi observada a diminuição de linfócitos T CD4⁺ *naive* nas PP dos grupos infectados, principalmente na via IO com 7dpi. Interessantemente apenas a via IO torna-se semelhante ao Co ao longo da infecção (14 e 21dpi). Quanto aos

linfócitos T CD8⁺ observamos que o grupo IO também perde T CD8⁺ com 7 dpi, repõe aos 14dpi mas perde novamente com 21dpi (Figura 14A e B). Os linfócitos B das PP parecem reduzir com 7dpi nas três vias em relação ao controle e não estão presente com 21dpi nos grupos infectados (Figura14).

A) Linfócito T CD4⁺ CD44⁻CD62L⁺



B) Linfócito T CD8⁺ CD44⁻CD62L⁺



C) Linfócito B CD19⁺ CD44⁻CD62L⁺

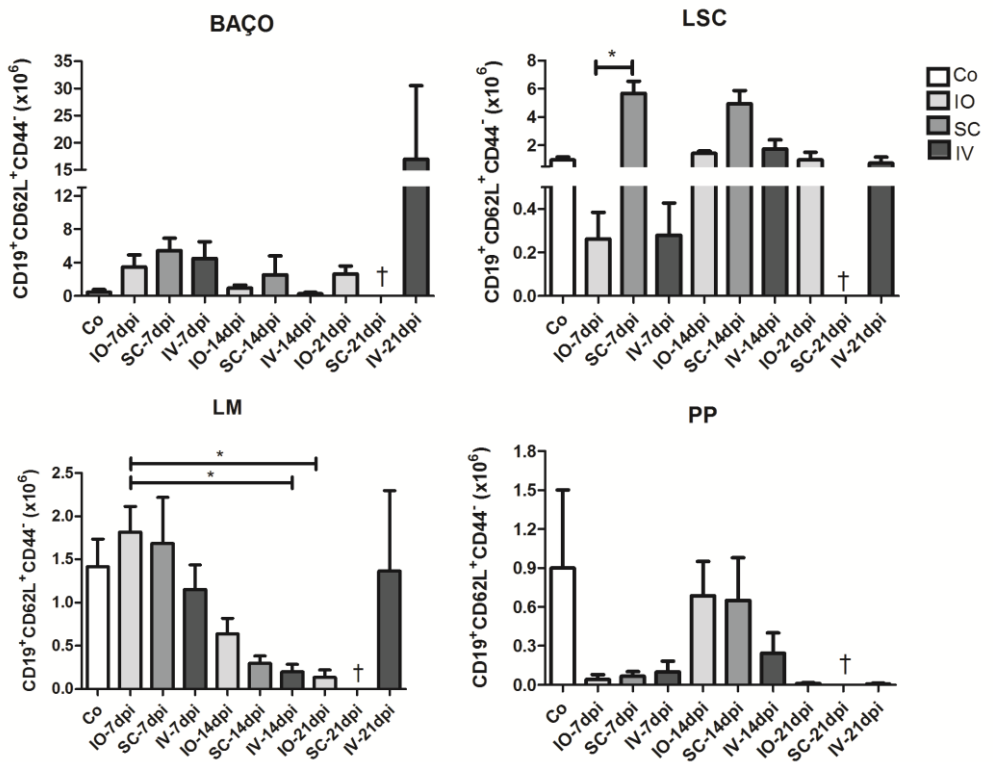
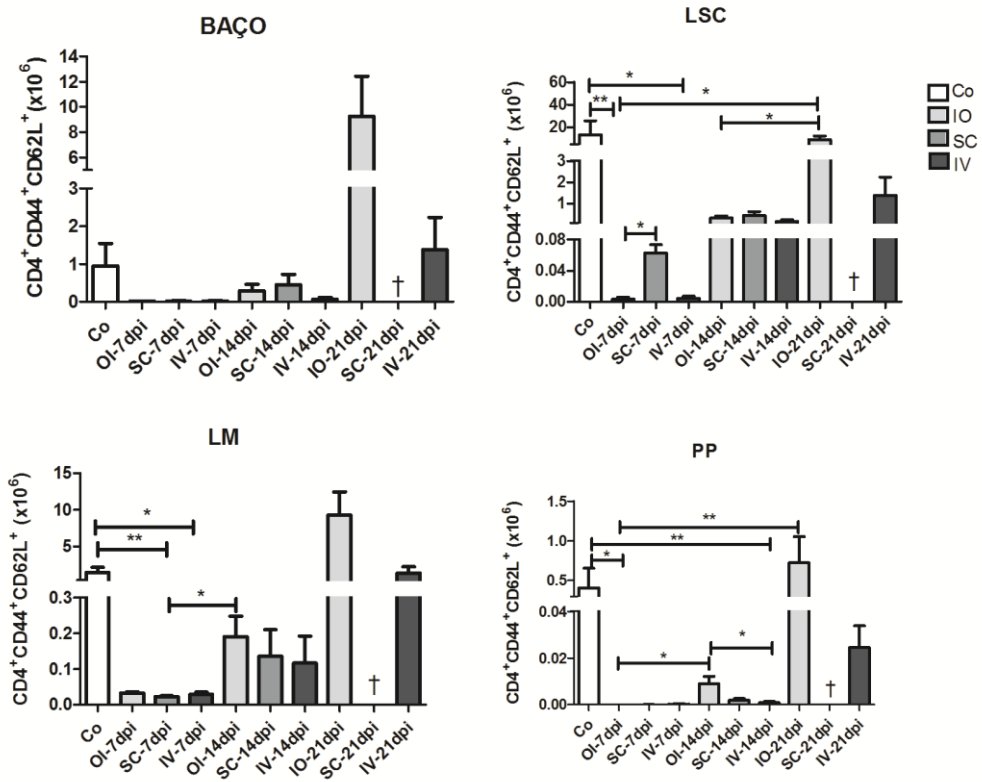


Figura 14 Número absoluto (10^6) de linfócitos ativados de perfil naive ($CD44^+CD62L^+$) nos fenótipos $CD4^+$ (A), $CD8^+$ (B) e $CD19^+$ (C) presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção (IO, SC e IV) com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de meio de cultura RPMI e as comparações foram realizadas com 7, 14 e 21 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de seis experimentos totais independentes (1 com 7dpi, 3 com 14dpi e 2 com 21dpi). n: Co (controle) = 8; IO (7 dpi) = 4 , (14 dpi) = 6 e (21 dpi) = 8; SC (7 dpi) = 4 e (14 dpi) = 8; IV (7 dpi) = 4 e (21 dpi) = 4.. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

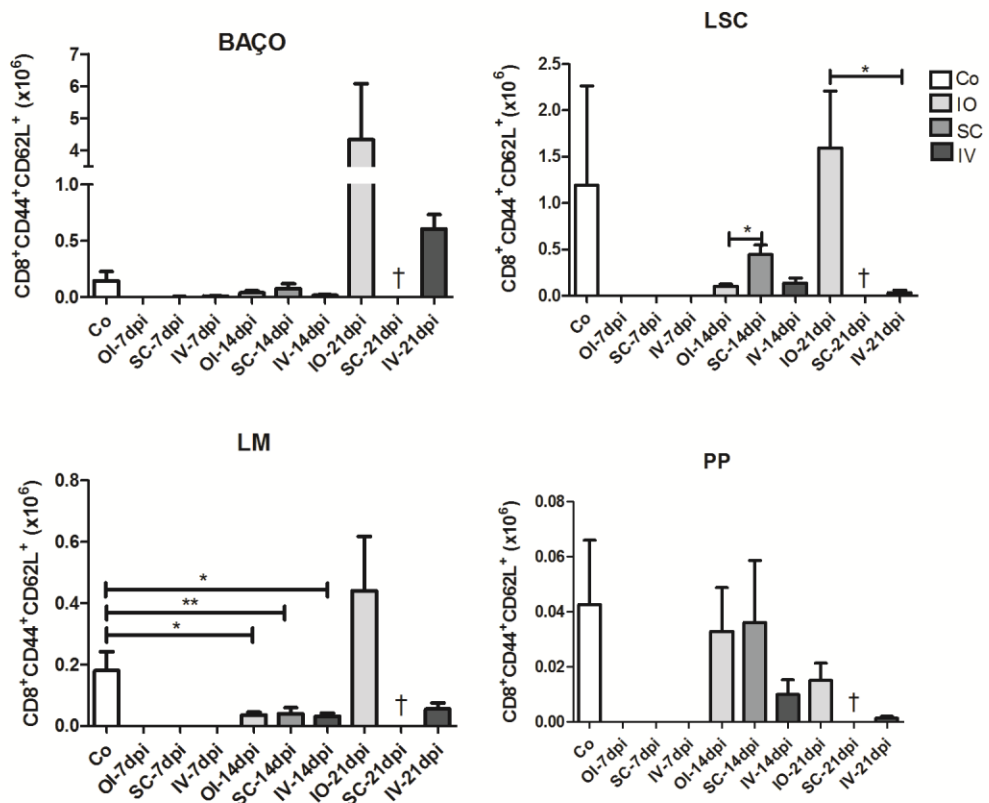
4.8.2 Células de perfil memória central ($CD44^+CD62L^+$) em órgãos linfoides periféricos

As avaliações nos baços dos grupos experimentais mostram diminuição de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ de memória central em todas as vias de infecção com 7dpi em relação ao controle. No entanto, a IO apresenta um aumento de T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B com 21 dpi quando comparados ao Co e a IV. Os resultados demonstram que em todas as vias de infecção pelo *T. cruzi* (IO, SC e IV) aumentam o número T $CD4^+$ e $CD8^+$ e B de memória central entre 14 e 21 dpi (Figura 15A,B e C).

A) Linfócito T CD4⁺ CD44⁺CD62L⁺



B) Linfócito T CD8⁺ CD44⁺CD62L⁺



C) Linfócito B CD19⁺ CD44⁺CD62L⁺

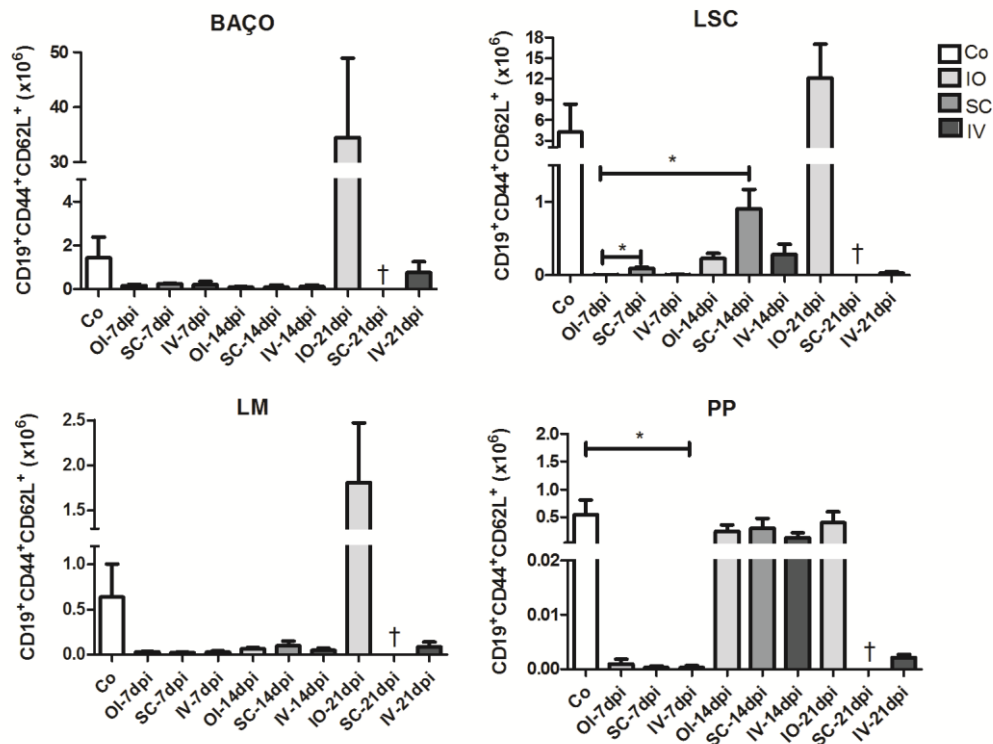


Figura 15 Número absoluto (10^6) de linfócitos ativados de perfil de memória central (CD44⁺CD62L⁺) nos fenótipos CD4⁺(A), CD8⁺(B) e CD19⁺ (C) presente em órgãos linfoides periféricos como baço linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV). Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção (IO, SC e IV) com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de meio de cultura RPMI e as comparações foram realizadas com 7,14 e 21 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de seis experimentos totais independentes (1 com 7dpi, 3 com 14dpi e 2 com 21dpi). n: Co (controle) = 8; IO (7 dpi) = 4, (14 dpi) = 6 e (21 dpi) = 8; SC (7 dpi) = 4 e (14 dpi) = 8; IV (7 dpi) = 4 e (21 dpi) = 4. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016

Os LSC possuem o número aumentado de linfócitos T CD4⁺ e B de memória central, na infecção SC em comparação com IO e IV com 7dpi, embora tenha menos CD4⁺, CD8⁺ e B em todas as vias de infecção com relação ao Co (Figura 15A, B e C). Na IV a presença de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e B de memória central é menor que o Co e IO com 21 dpi. Além disso, nota-se que a IO aumenta T CD4⁺, CD8⁺ e B

ao longo do curso da infecção (7, 14 21 dpi) e IV apenas CD4⁺ entre 7 e 14dpi (Figura 15A, B e C).

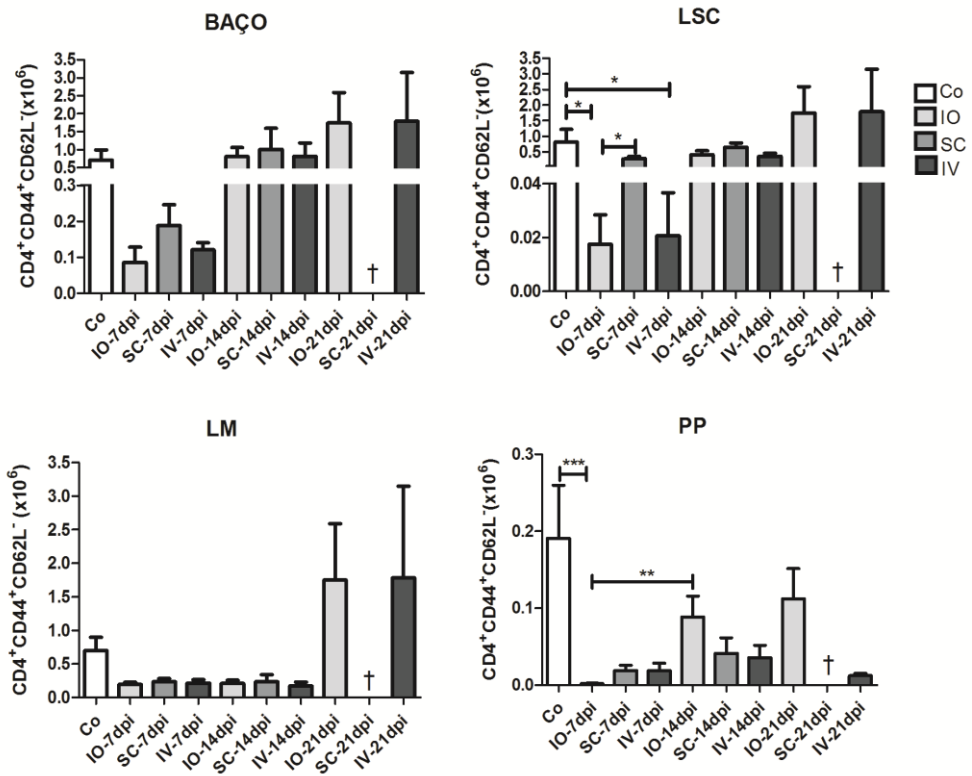
Nos LM dos grupos infectados tem menos linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) de memória central que o controle, e não apresenta CD8⁺ com 7 dpi (Figura 15A, B e C). Aparentemente, com 21 dpi a via IO possui a presença de T CD4⁺ e B semelhante ao controle (Figura 15A, B e C).

Quanto as PP, os grupos infectados não demonstraram T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória central com 7dpi, B está bem reduzido entre os eles neste período. Observa-se que a via IO tem os números de células T (CD4⁺ e CD8⁺) e B de memória central aumentado com 21 dpi, diferentemente do que foi visto na IV (Figura 15A, B e C).

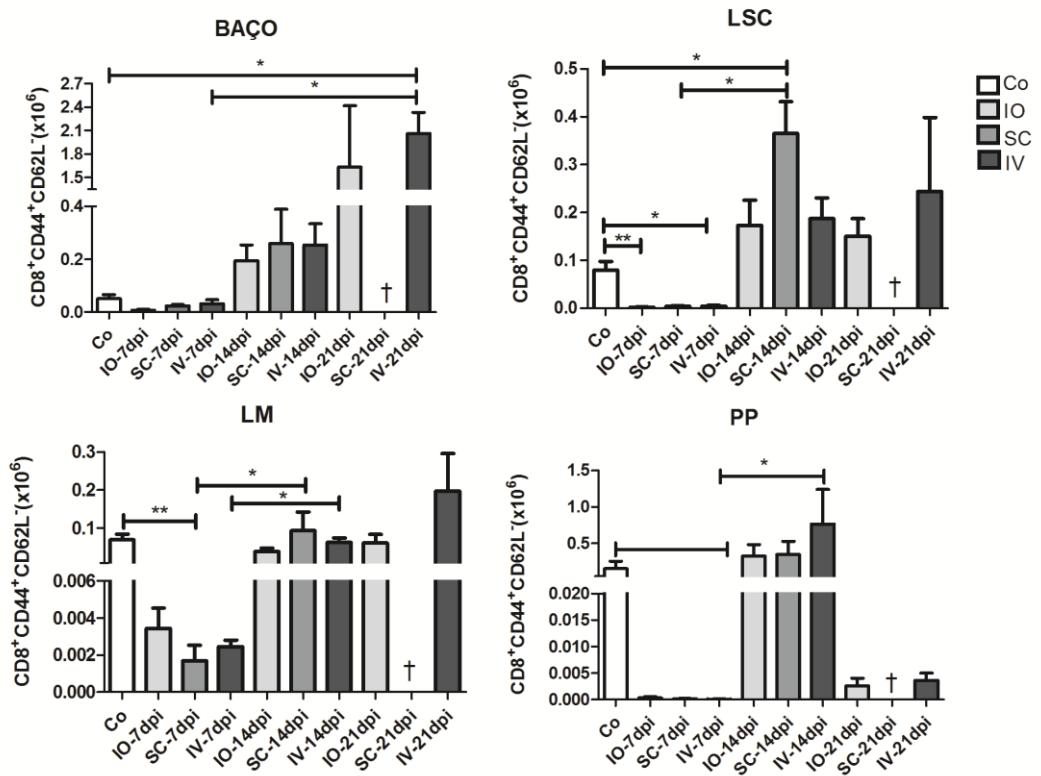
4.8.3 Células com perfil efetor (CD44⁺CD62L⁻) em órgãos linfoides periféricos

Os baços de animais infectados pelas vias IO, SC e IV com 7 dpi tem menos células CD4⁺ com perfil efetor que o Co. Observamos que as vias IO e IV aumentam os linfócitos T CD4⁺ com 21dpi em comparação ao início da infecção (7dpi). Os linfócitos T CD8⁺ também aumentam no grupo IV com 21dpi em relação ao Co e ao grupo com 7dpi. Quanto aos linfócitos B, encontramos também um aumento na IV 21 dpi, em relação ao controle. Os LSC tem números de linfócitos T CD4⁺ efetor menores nas vias IO e IV do que a via SC, sendo a IO menor significativamente que o grupo SC e ao Co em 7dpi. Quanto aos linfócitos T CD8⁺ em todos os grupos infectados, observa-se uma intensa diminuição com 7dpi, destacando-se a via IO e IV. Nota-se que as células T CD8⁺ na via SC aumentam durante a fase aguda em relação ao controle e a 7dpi. Assim como foi observado com T CD8⁺, os linfócitos B mostram-se mais presente na infecção SC do que nos demais grupos, principalmente IO e IV. Aparentemente, a expressão de linfócitos B, T CD4⁺ e CD8⁺ efetores com 21dpi é semelhante entre os grupos (Figura 16A, B e C).

A) Linfócito T CD4⁺ CD44⁺CD62L⁻



B) Linfócito T CD8⁺ CD44⁺CD62L⁻



C) Linfócito B CD19⁺ CD44⁺ CD62L⁻

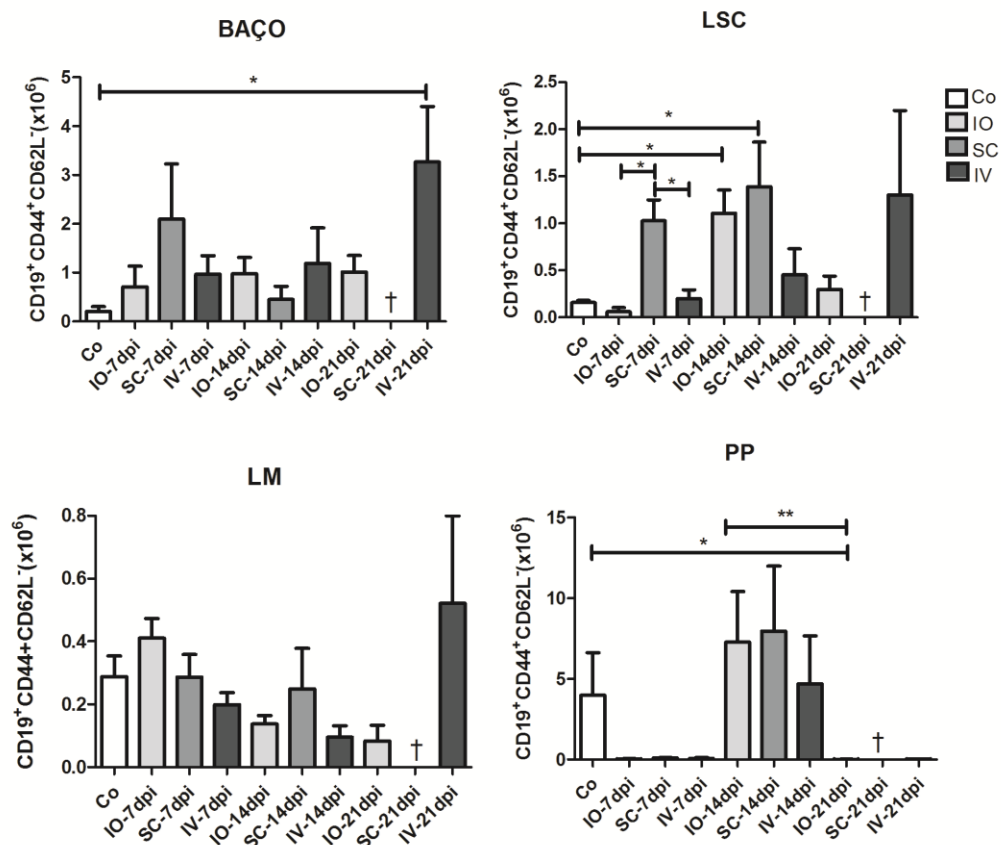


Figura 16 Número absoluto (10^6) de linfócitos ativados de perfil efetor ($CD44^+CD62L^-$) nos fenótipos $CD4^+$ (A), $CD8^+$ (B) e $CD19^+$ (C) presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção (IO, SC e IV) com 5×10^4 parasitas em $50\mu\text{L}$ de RPMI e as comparações foram realizadas com 7, 14 e 21 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de seis experimentos totais independentes (1 com 7dpi, 3 com 14dpi e 2 com 21dpi). n: Co (controle) = 8; IO (7 dpi) = 4, (14 dpi) = 6 e (21 dpi) = 8; SC (7 dpi) = 4 e (14 dpi) = 8; IV (7 dpi) = 4 e (21 dpi) = 4. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * $P < 0,05$. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

Nos **LM** não observamos diferenças entre os grupos quanto aos linfócitos T $CD4^+$ e B mas, T $CD8^+$ efetor na via SC com 7dpi está menos presente do que SC com 14dpi e o grupo Co. A presença de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B diminuem com 7dpi em todos os grupos porém aumentam após 14 e 21 dpi, tornando-se semelhante ao Co (Figura 16A, B e C). E embora seja notório menos T $CD4^+$ efetor

nas **PP** do grupo IO com 7dpi do que os demais grupos, a diminuição destaca-se em relação ao Co. Os linfócitos T CD8⁺ e B também reduziram nos grupos infectados com 7dpi e 21. Entretanto, linfócitos T CD8⁺ com perfil efetor aumentam significativamente na IV com 14dpi em relação à quantidade observada inicialmente (7dpi) (Figura 16A, B e C).

A fim de contribuir para o entendimento melhor dos resultados apresentados nas figuras 14, 15 e 16, os dados foram ilustrados no quadro 11 (linfócitos com perfil *naive*) , 12 ((linfócitos com perfil de memória central) e (linfócitos com perfil efetor).

Quadro 11 Linfócitos ativados de perfil *naive* (CD44⁺CD62L⁺) nos fenótipos T CD4⁺, T CD8⁺e B (CD19⁺)

Órgãos linfoides periféricos	Perfil <i>naive</i>																								
	T CD4 ⁺									T CD8 ⁺									B (CD19 ⁺)						
	7 dpi			14 dpi			21 dpi			7dpi			14 dpi			21 dpi			7 dpi		14 dpi		21 dpi		
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	-	-	-	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	↑↑
LSC	↓↓↓	-	↓↓↓	-	↑	-	↓	↓↓↓	-	↑↑↑	-	-	↑↑	-	-	-	↓	↑↑	↓	-	↑	-	-	-	-
LM	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	↑	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	-
PP	↓↓↓	↓↓	↓↓	-	↓↓	↓↓	-	↓↓↓		↓↓	↓↓	-	-	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	-	-	↓			

Quadro 12 Linfócitos ativados de perfil memória central (CD44⁺CD62L⁺) nos fenótipos T CD4⁺, T CD8⁺e B (CD19⁺)

Órgãos linfoides periféricos	Perfil memória central																								
	T CD4 ⁺									T CD8 ⁺									B (CD19 ⁺)						
	7 dpi			14 dpi			21 dpi			7dpi			14 dpi			21 dpi			7 dpi		14 dpi		21 dpi		
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	
Baço				-	-	-	↑↑↑	-				-	-	-	↑↑↑	↑↑	-	-	-	-	-	-	-	-	↑↑
LSC		↓↓↓		↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	-	↓↓↓				↓	-	↓	-	↓		↓↓↓		↓↓↓	↓	↓↓↓	-	↓↓↓	
LM	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓	↓	↑	-				↓	↓	↓	↑	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	-	↓↓↓	
PP				↓↓			-	↓				-	-	-	-	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	-	-	-	-	↓	

Quadro 13 Linfócitos ativados de perfil efetor (CD44⁺CD62L⁻) nos fenótipos T CD4⁺, T CD8⁺e B (CD19⁺)

Órgãos linfoides periféricos	Perfil efetor																								
	T CD4 ⁺									T CD8 ⁺									B (CD19 ⁺)						
	7 dpi			14 dpi			21 dpi			7dpi			14 dpi			21 dpi			7 dpi		14 dpi		21 dpi		
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	IV	
Baço	↓↓	↓↓	↓↓	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑↑	-	-	-	-	-	-	-	-	↑
LSC	↓↓	-	↓↓	-	-	-	-	-				-	↑↑	-	-	-	-	↑↑	-	↑↑	↑↑	-	-	-	↑
LM	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓
PP	↓↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓↓				-	-	-	↓↓	↓↓				-	-	-			

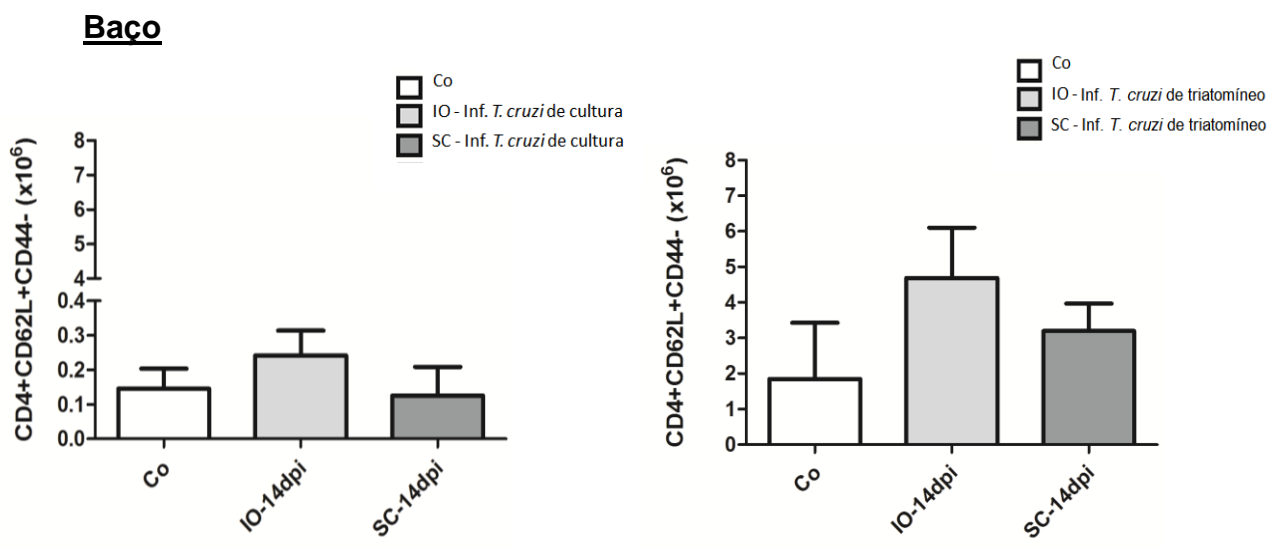
Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa
 LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer; Dpi=Dias pós-infecção
 - = Co ↑=Co<1x ↑↑ =Co< 2x ↑↑↑ =Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

4.9 Comparação entre estado de ativação dos linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B (CD19⁺) presente nos órgãos linfoides periféricos de animais infectados com parasito de triatomíneo (IO e SC) e de cultura celular (IV).

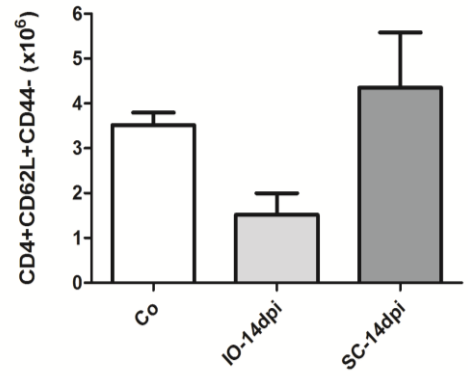
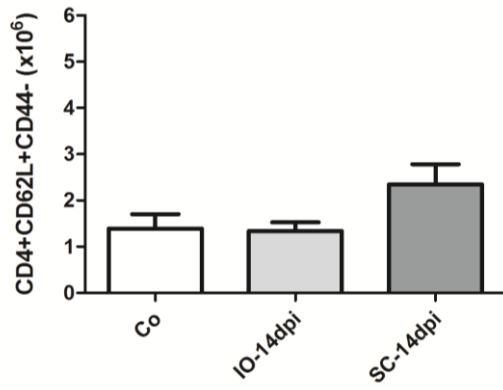
4.9.1 Células com perfil naive (CD44⁻CD62L⁺)

Os resultados da Figura 17 evidenciam que dependendo do parasito utilizado (de cultura ou excreta) somente a via SC pode modular a presença de células T CD4⁺ naive nas PP (Figura 17A). Não observamos diferenças quanto aos linfócitos T CD8⁺ naive, mas sugerimos que a origem do parasito é importante para a presença das células B no baço dos animais infectado por IO cujo inóculo foi com parasitos de excreta de triatomíneo (Figura 17B e C respectivamente). Embora não seja observada diferença nas PP, os linfócitos B naive nos LM diminuem significativamente nos grupos infectados com parasitos de cultura, principalmente nas vias SC (Figura 17C).

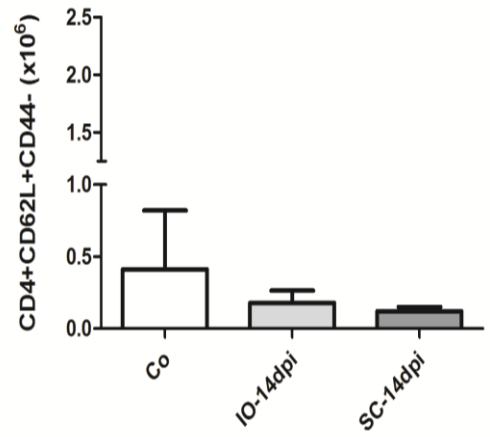
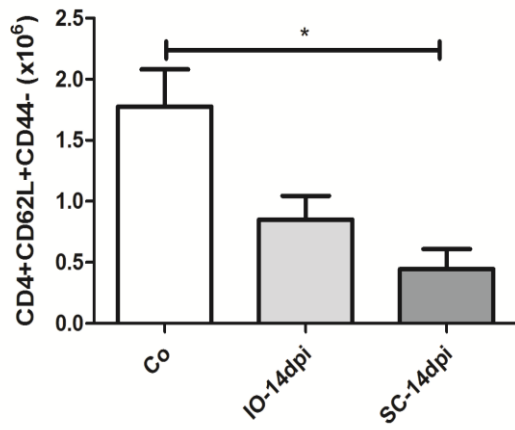
A) Linfócitos T CD4⁺ CD44⁻CD62L⁺



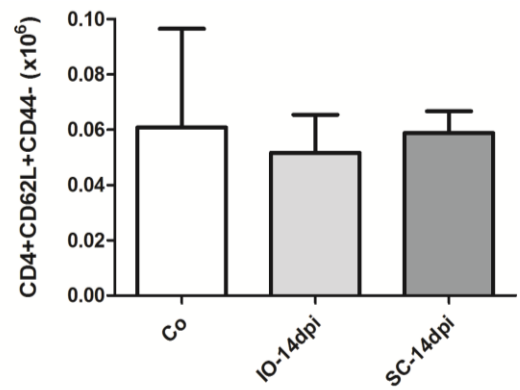
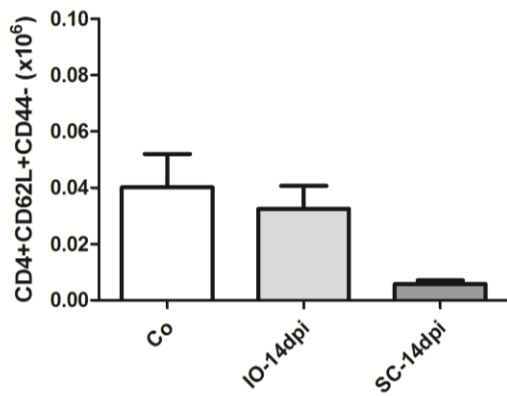
LSC



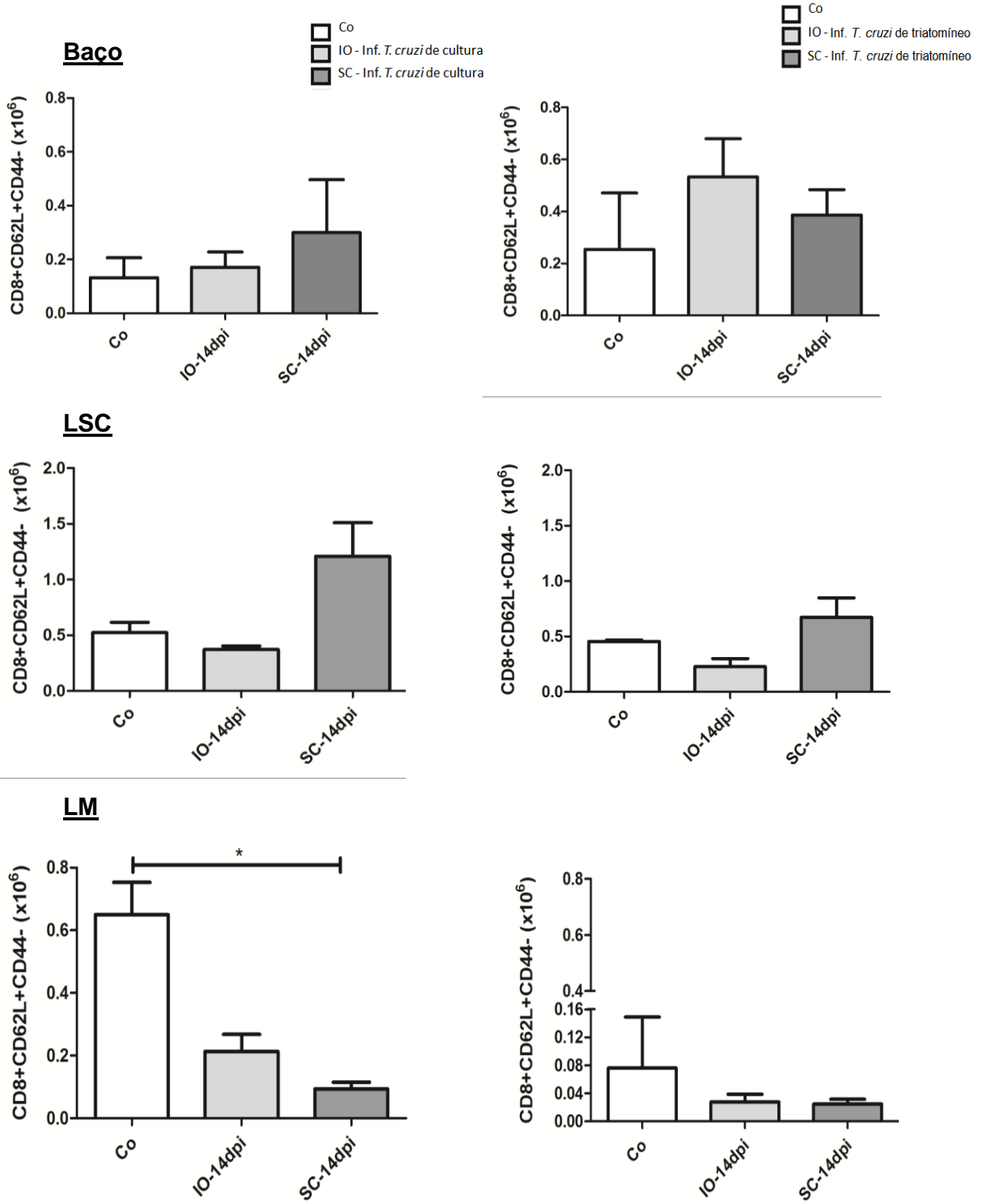
LM



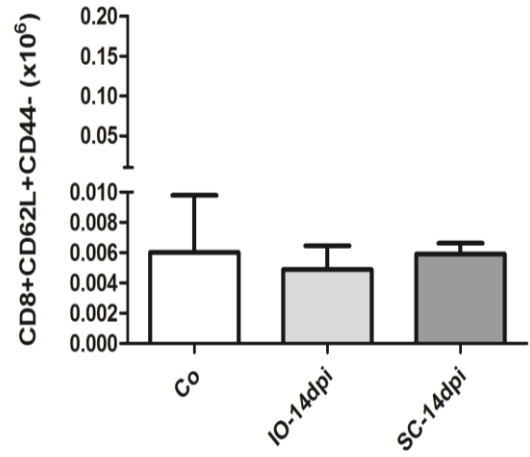
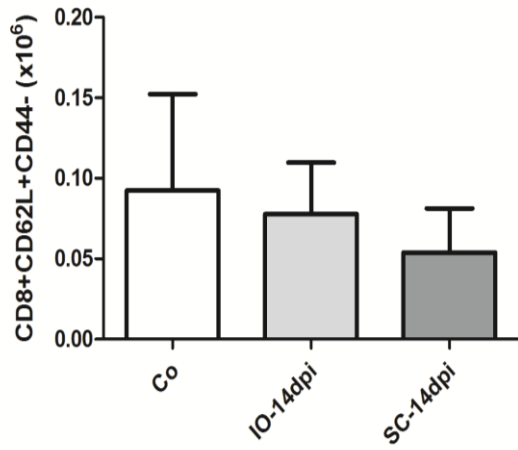
PP



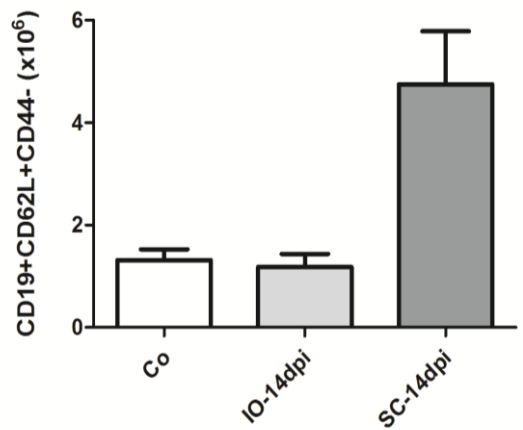
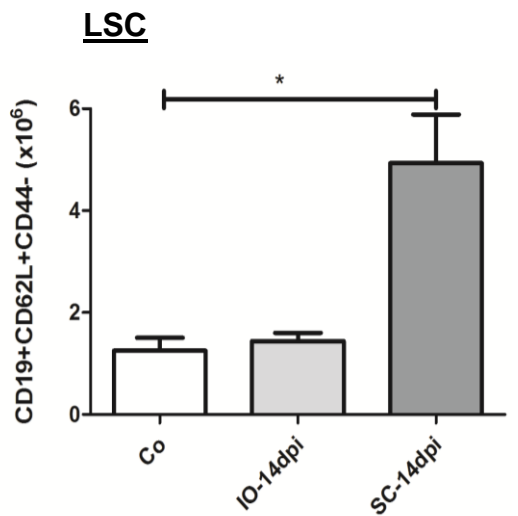
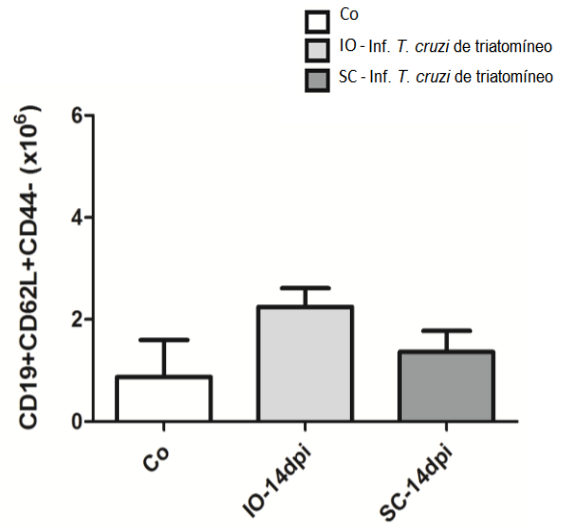
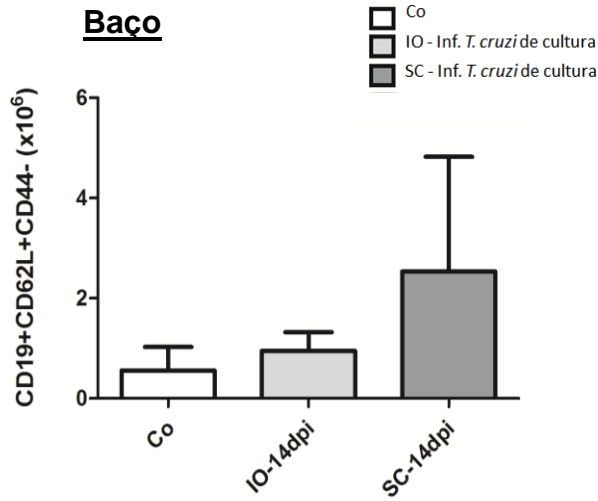
B) Linfócito T CD8⁺ CD44⁻CD62L⁺



PP



C) Linfócito B CD19⁺ CD44⁻CD62L⁺



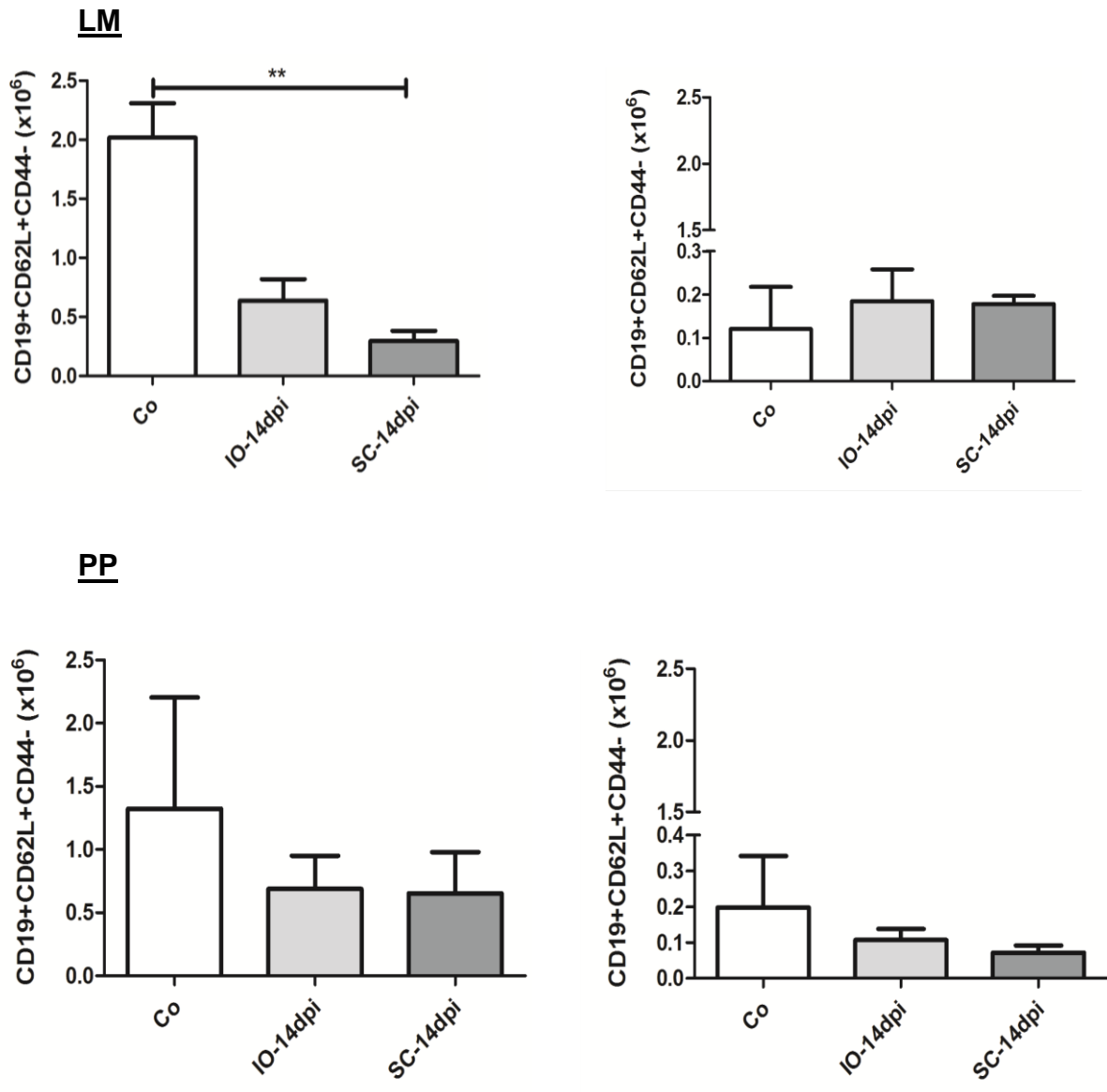
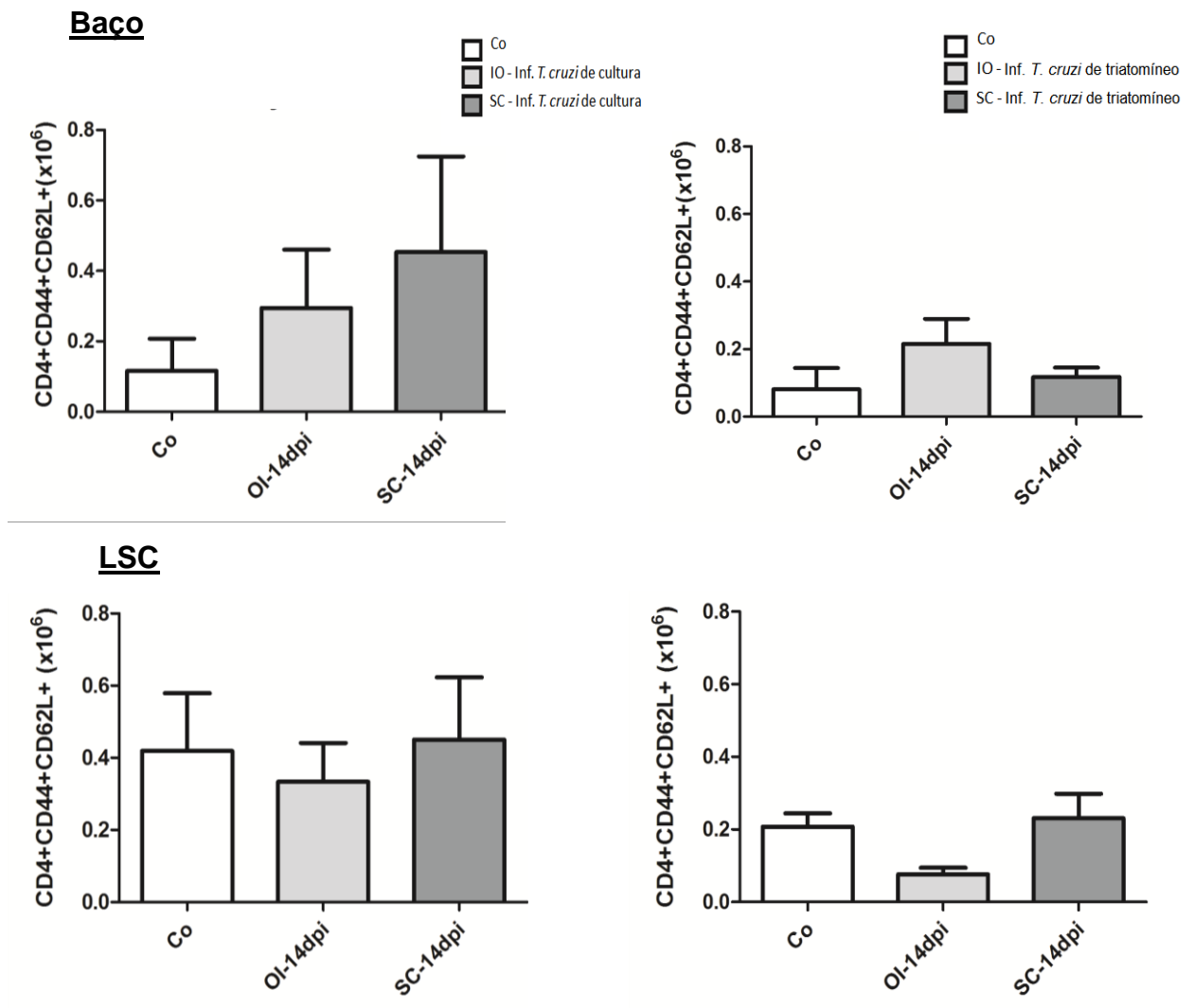


Figura 17 Número absoluto (10^6) de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B ($CD19^+$) ativados de perfil naive ($CD44^-CD62L^+$) presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* de origem distintas pelas vias oral e subcutânea. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção com 5×10^4 parasitas em $50\mu\text{L}$ de meio de cultura RPMI (à esquerda) e excreta de triatomíneo pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC) (à direita). As comparações foram realizadas com 14 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de três experimentos com parasitos de cultura e um com os parasitos de excreta. As figuras representam: A) linfócitos T $CD4^+$, B) $CD8^+$ e C) linfócitos B ($CD19^+$). n = Grupo infectado com *T. cruzi* de excreta: Co (controle) = 3, IO = 4 e SC = 4 e Grupo infectado com *T. cruzi* de cultura: n= Co (controle) = 8, IO = 10 e SC = 8. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * $P < 0,05$. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12 e L-028/2016.

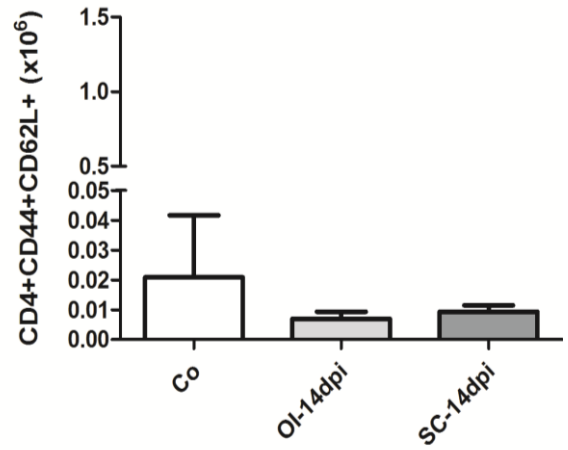
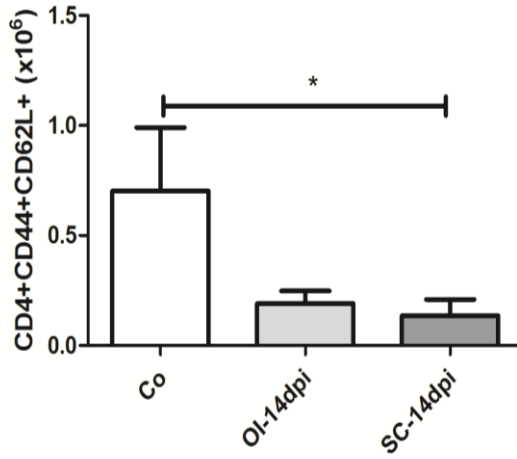
4.9.2 Células com perfil de memória central (CD4⁺CD62L⁺)

A presença de células de **memória central** nos órgãos linfoides periféricos parece ser semelhantes às células *naive* influenciando, principalmente, os linfócitos T CD4⁺ de memória central nas PP do grupo SC infectado com *T. cruzi* de triatomíneo. Os resultados não diferem entre as vias em relação aos linfócitos T CD8⁺ independentemente da origem do inóculo, conforme observado na figura anterior. A origem do parasito também parece ser importante nos LM, apresentando menos linfócitos B com perfil de memória central nos animais infectados com parasitos de cultura quando comparados ao grupo Co, diferentemente do que foi visto com parasitos provenientes da excreta do triatomíneo (Figura 18).

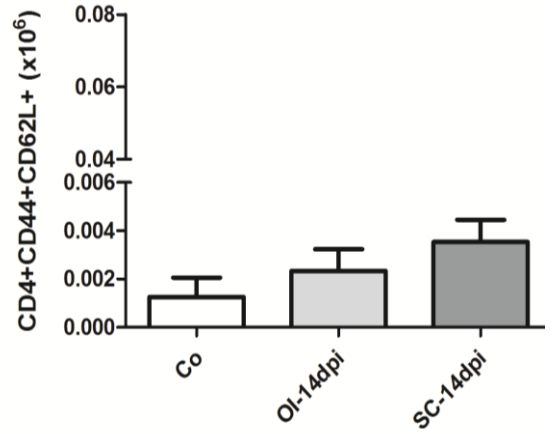
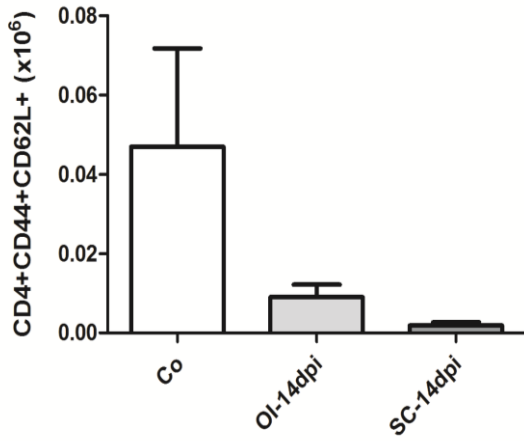
A) Linfócitos T CD4⁺ CD4⁺CD62L⁺



LM

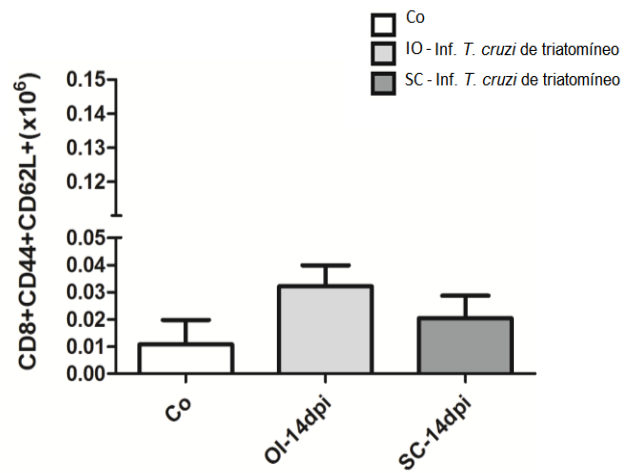
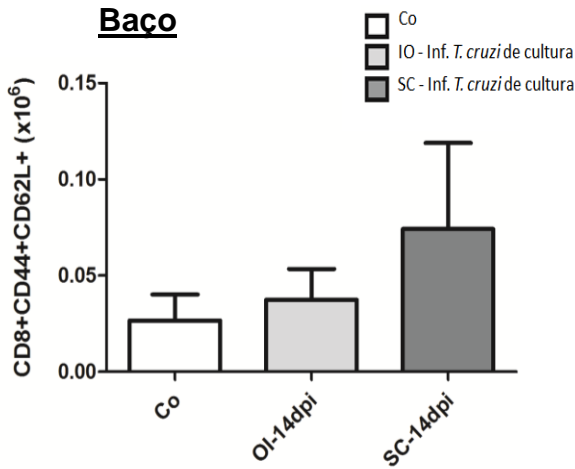


PP

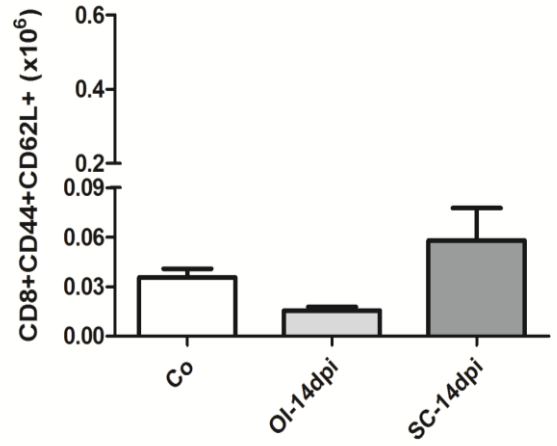
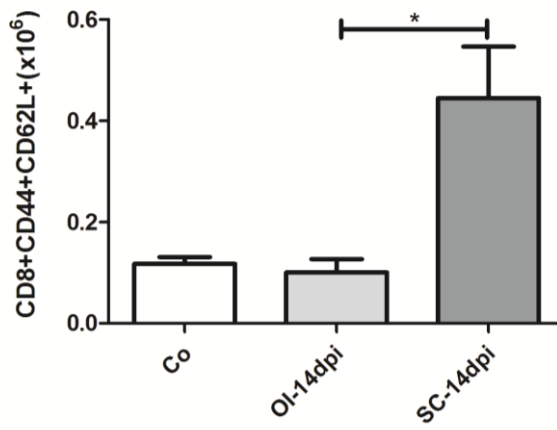


B) Linfócito T CD8⁺ CD4⁺ CD62L⁺

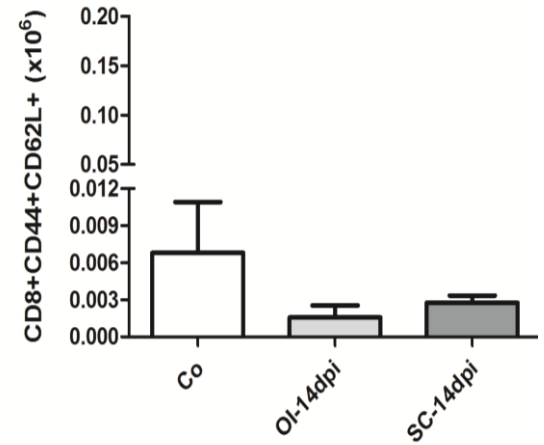
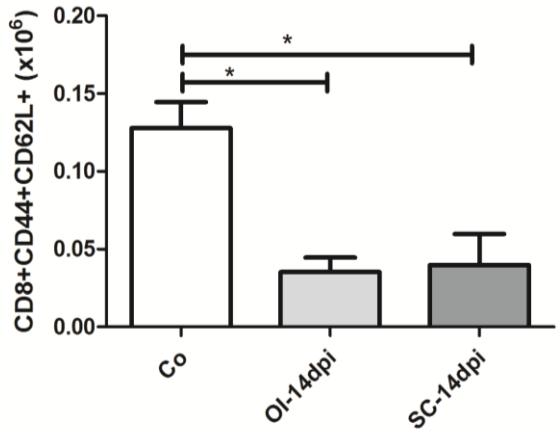
Baço



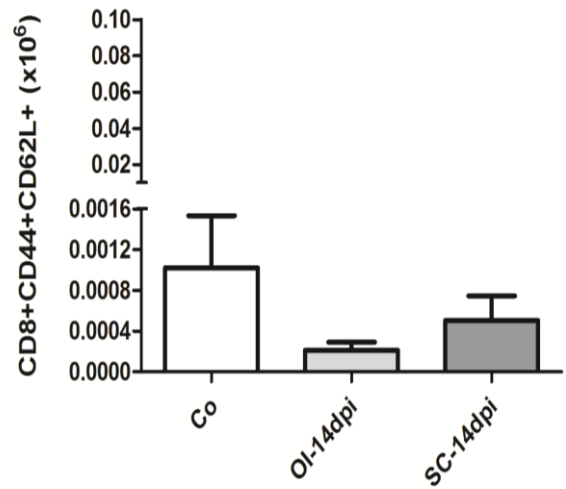
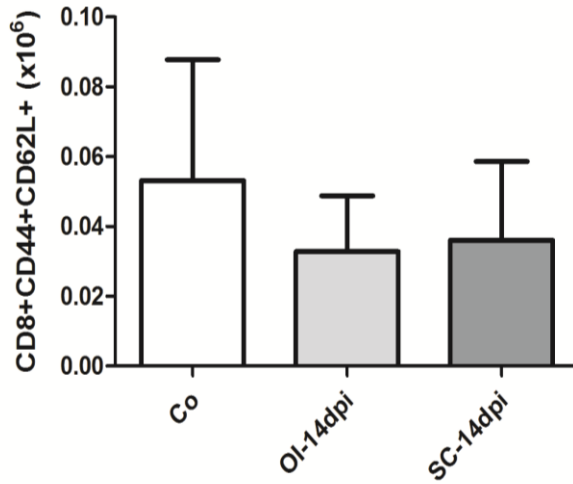
LSC



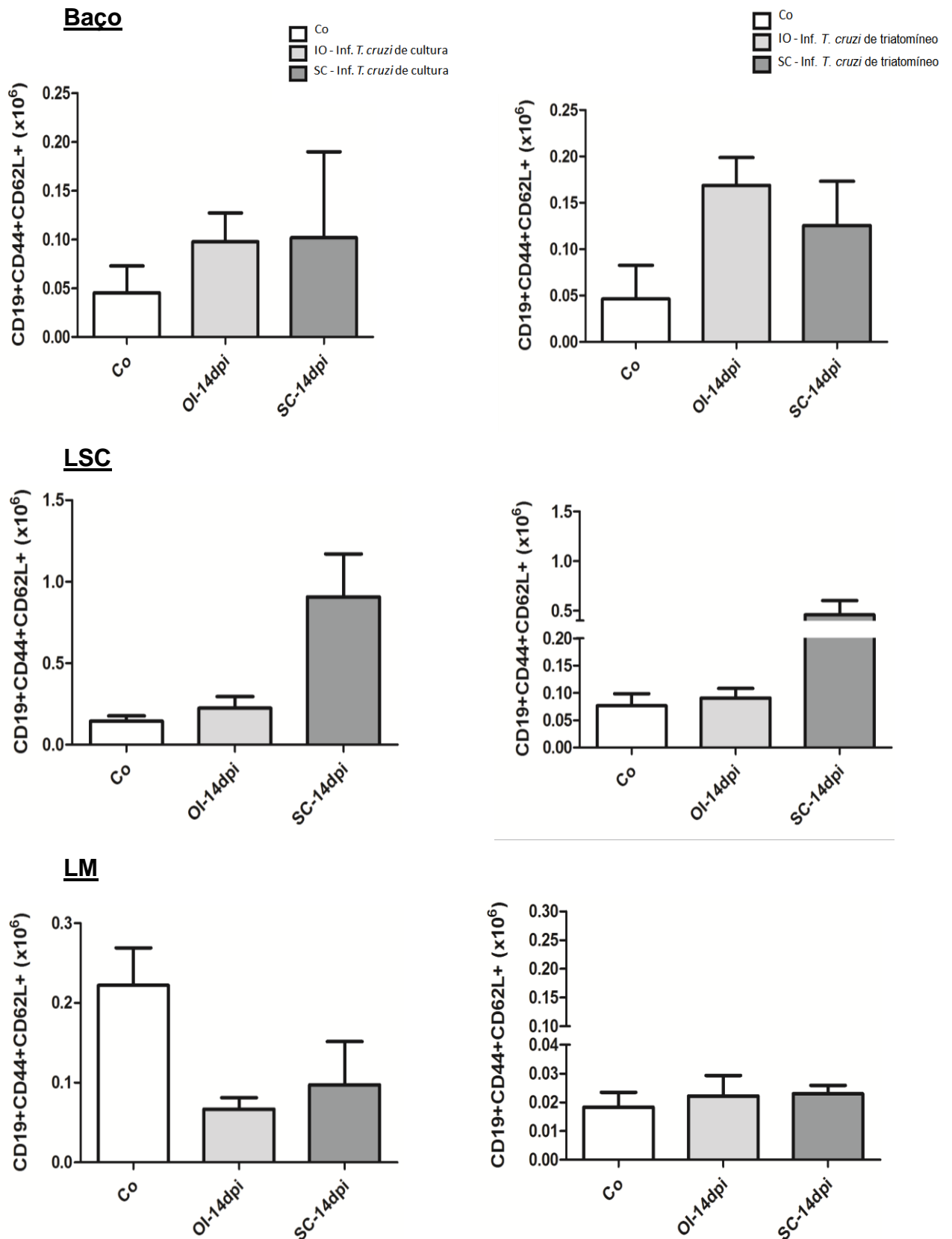
LM



PP



C) Linfócito B CD19⁺ CD4⁺CD62L⁺



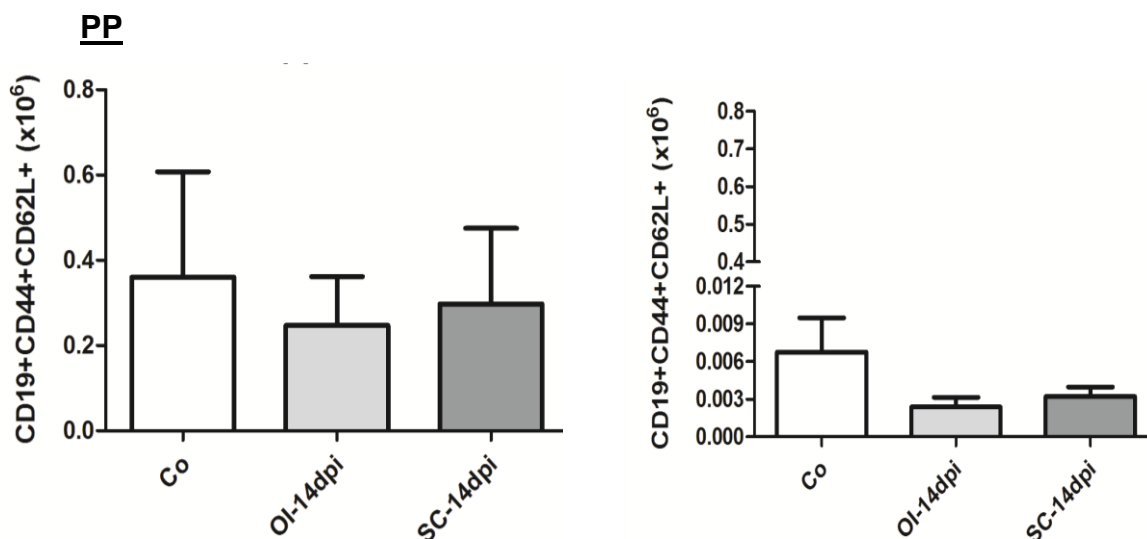
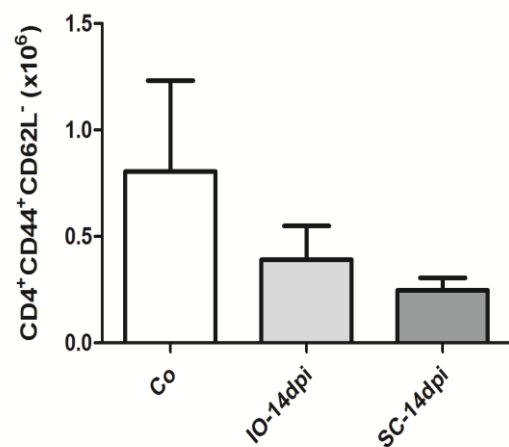
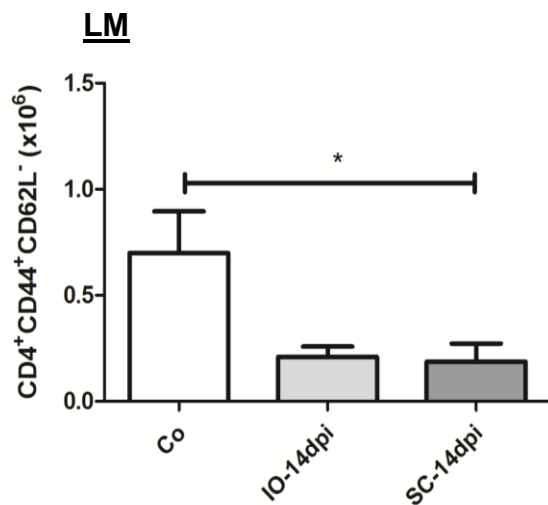
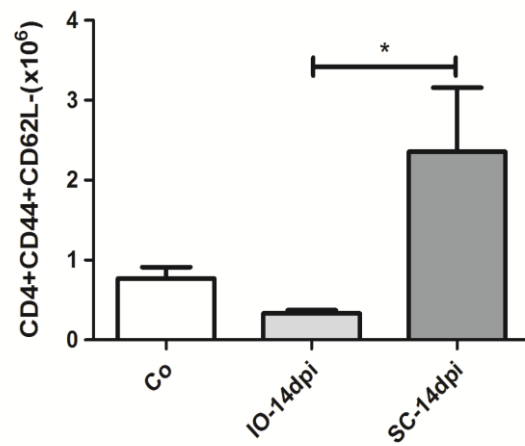
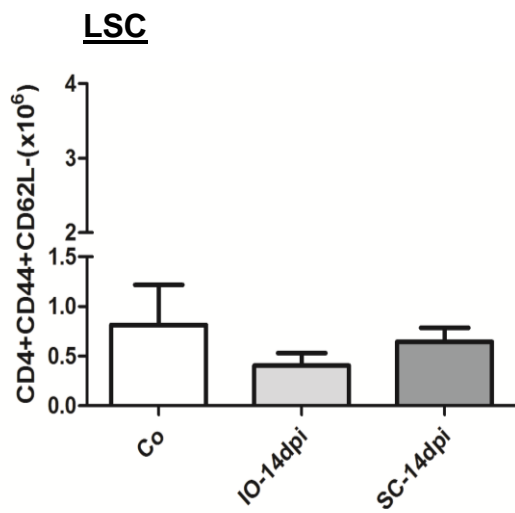
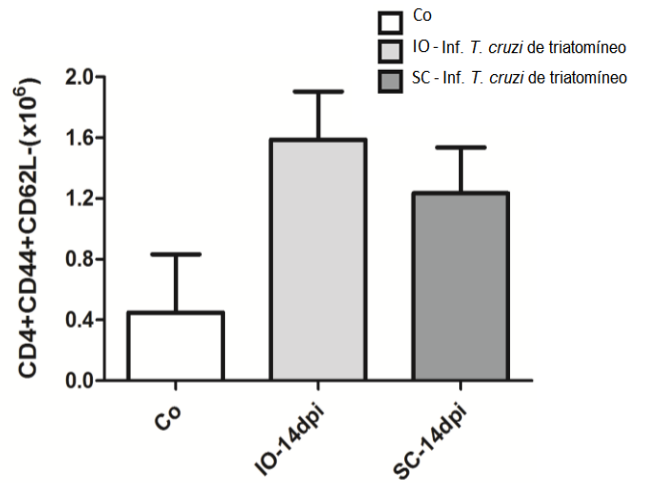
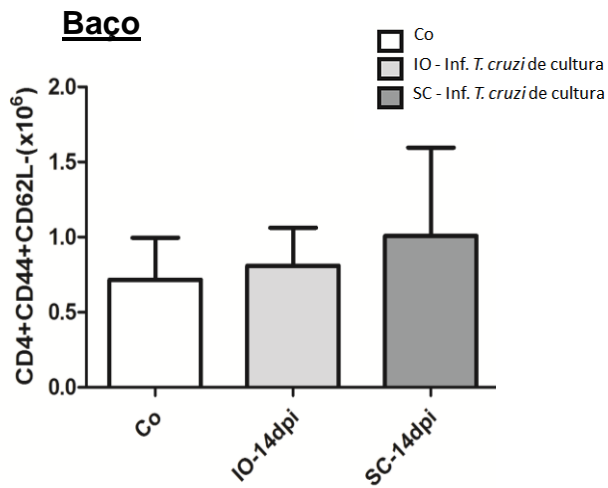


Figura 18 Número absoluto (10^6) de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B ($CD19^+$) ativados de perfil de memória central ($CD44^+CD62L^+$) presente em órgãos linfoides periféricos como linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* de origem distintas pelas vias oral e subcutânea. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção foram infectados pelas diferentes vias de infecção com 5×10^4 parasitas em $50\mu\text{L}$ de meio de cultura RPMI (à esquerda) e excreta de triatomíneo pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC) (à direita). As comparações foram realizadas com 14 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de três experimentos com parasitos de cultura e um com os parasitos de excreta. As figuras representam: A) linfócitos T $CD4^+$, B) $CD8^+$ e C) linfócitos B ($CD19^+$). n = Grupo infectado com *T. cruzi* de excreta: Co (controle) = 3, IO = 4 e SC = 4 e Grupo infectado com *T. cruzi* de cultura: n= Co (controle) = 8, IO = 10 e SC = 8. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * $P < 0,05$. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12.

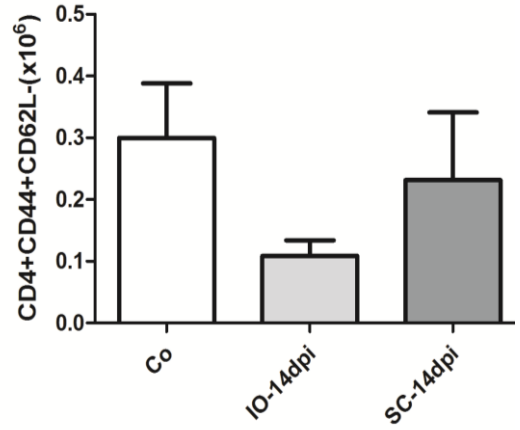
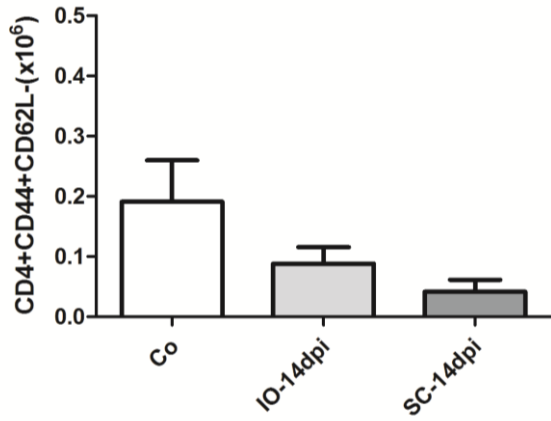
4.9.3 Células com perfil efetor ($CD4^+CD62L^+$)

Ao analisarmos a presença de linfócitos T $CD4^+$ com perfil efetor no baço, verificamos que aparentemente a infecção com parasitos de triatomíneo induz o aumento desses linfócitos nas vias IO e SC com relação ao grupo Co. Verificamos também que este grupo (animais infectados com parasitos de triatomíneos) apresenta diferenças significativas entre as vias IO e SC nos LSC. Além disso, sugerimos que essas células estão menos presentes nos LM e PP do grupo SC em relação ao Co o que não foi observado no grupo infectado com parasitos de triatomíneos (Figura 19A).

A) Linfócito T CD4⁺ CD44⁺CD62L⁻

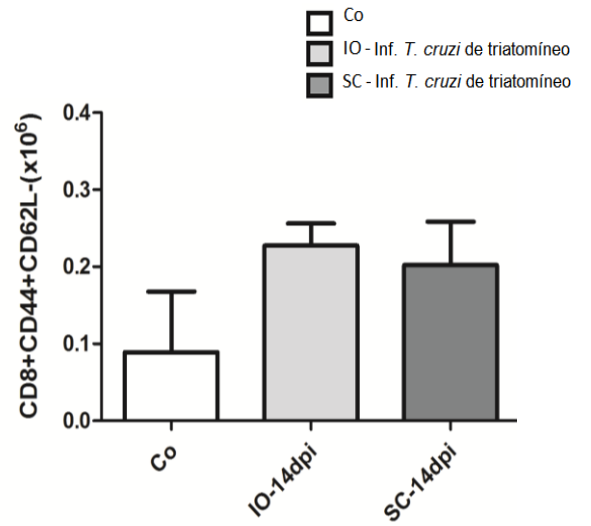
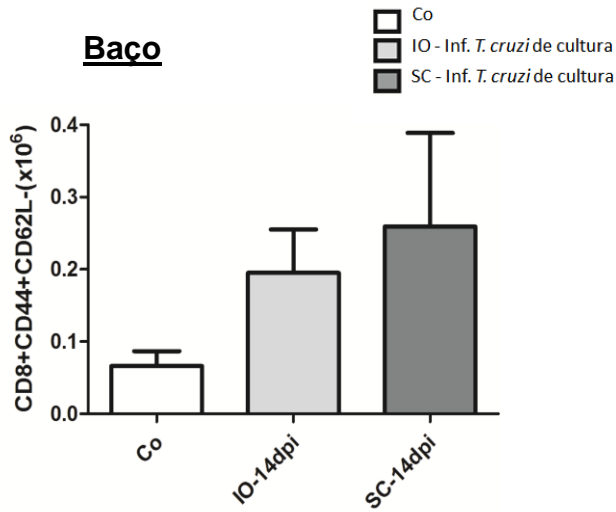


PP

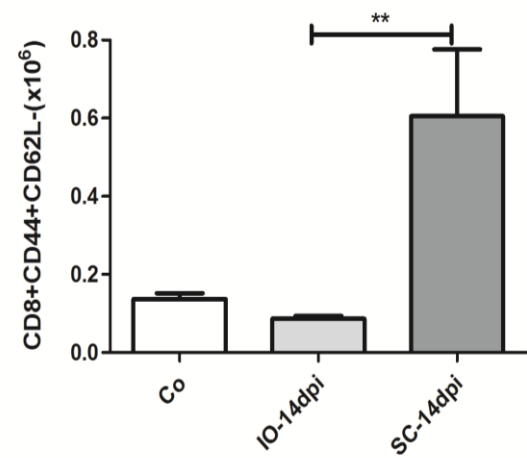
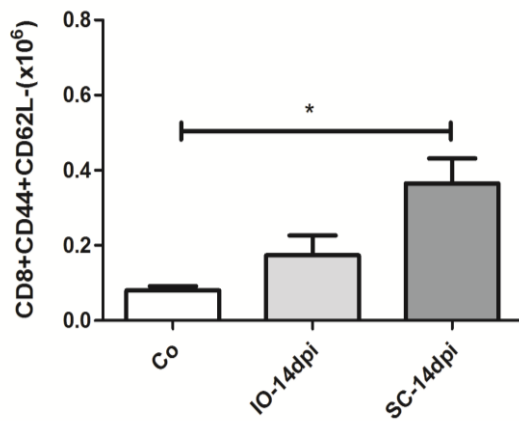


B) Linfócito T CD8⁺ CD4⁺CD62L⁻

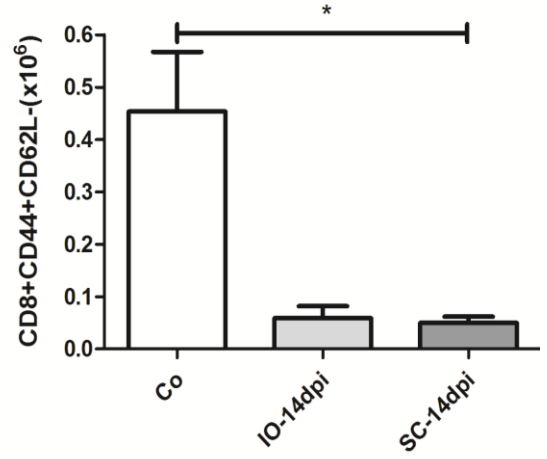
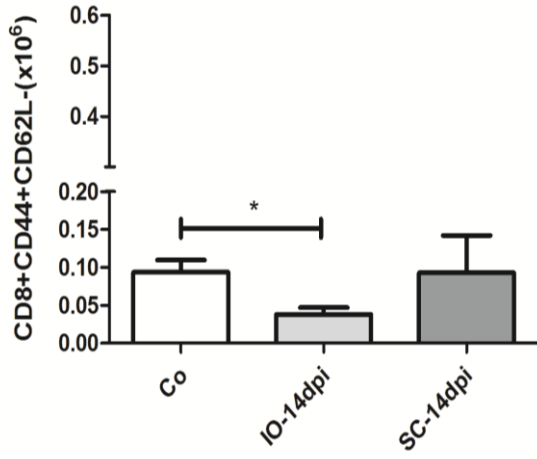
Baço



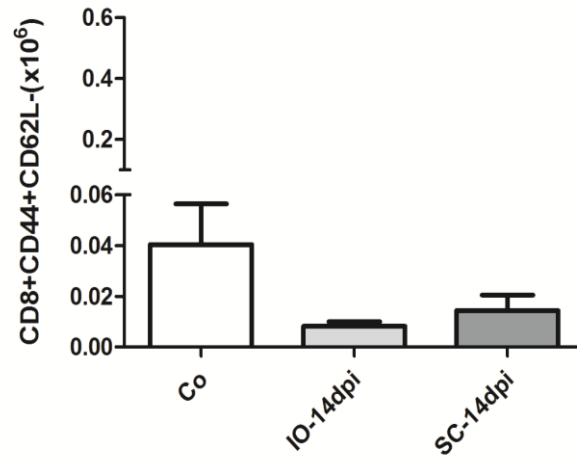
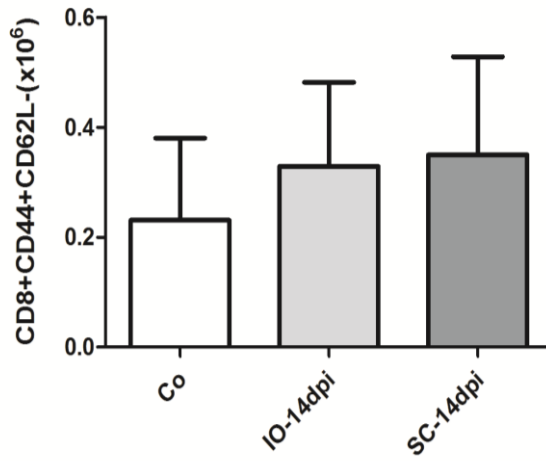
LSC



LM

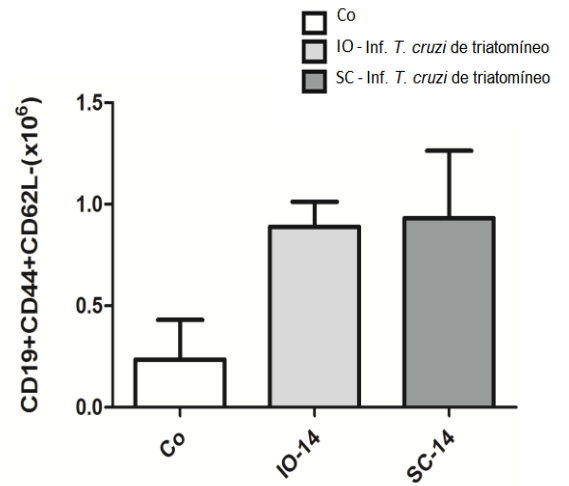
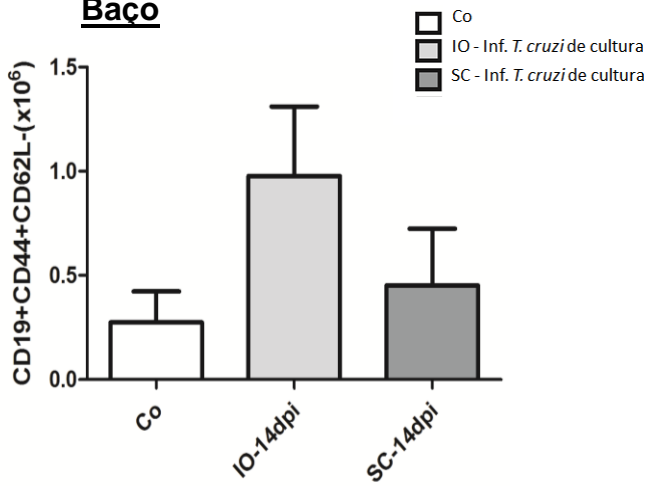


PP

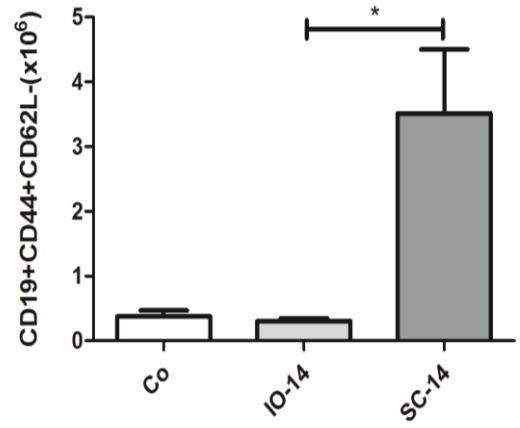
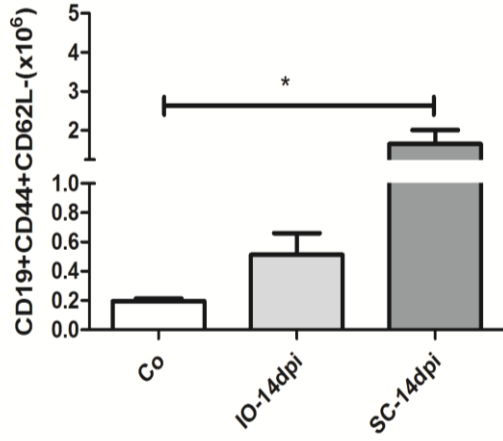


C) Linfócito B CD19⁺ CD4⁺ CD62L⁻

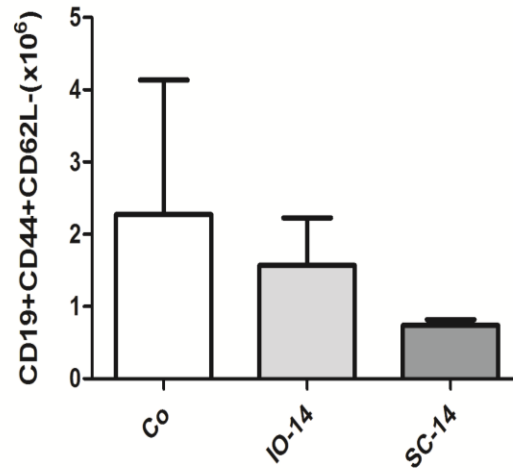
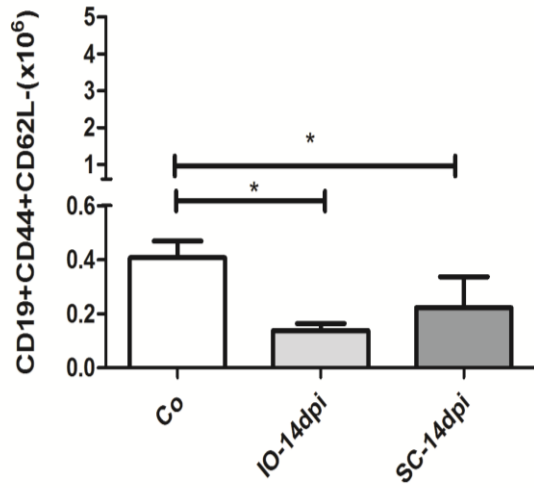
Baço



LSC



LM



PP

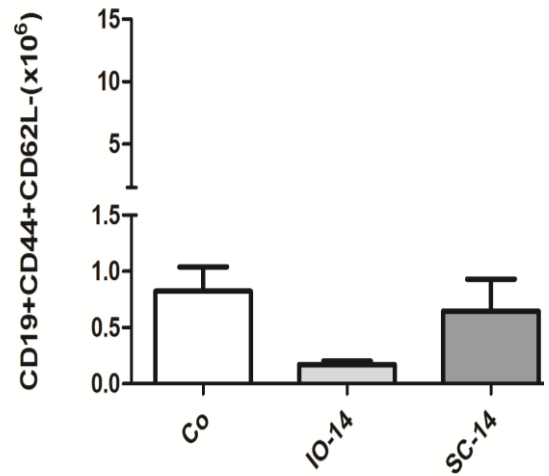
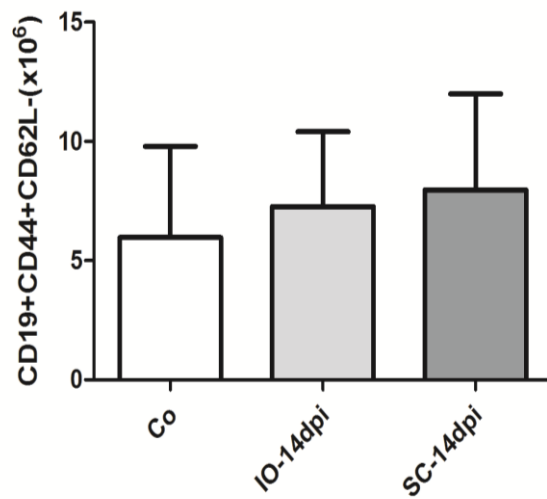


Figura 19 Número absoluto (10^6) de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B ($CD19^+$) ativados de perfil efetor ($CD44^+CD62L^-$) presente em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneos (LSC), linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) de camundongos infectados com *T. cruzi* de origem distintas pelas vias oral e subcutânea. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas diferentes vias de infecção foram infectados pelas diferentes vias de infecção com 5×10^4 parasitas em 50 μ L de meio de cultura RPMI (à esquerda) e excreta de triatomíneo pelas vias oral (IO) e subcutânea (SC) (à direita). As comparações foram realizadas com 14 dias pós-infecção (dpi). Os dados expressam marcações realizadas por citometria de fluxo (FACSCantIOI®) e os resultados foram representativos de três experimentos com parasitos de cultura e um com parasitos de excreta. As figuras representam: A) linfócitos T $CD4^+$, B) $CD8^+$ e C) linfócitos B ($CD19^+$). n = Grupo infectado com *T. cruzi* de excreta: Co (controle) = 3, IO = 4 e SC = 4 e Grupo infectado com *T. cruzi* de cultura: n= Co (controle) = 8, IO = 10 e SC = 8. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * P <0,05. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ : LW-23/12.

A presença de linfócitos T $CD8^+$ e B não se altera entre as vias no baço, tanto no grupo infectado com *T. cruzi* da excreta quanto da cultura, mas a via SC possui diferenças significativas entre o grupo IO em animais infectados com parasitos de triatomíneo no LSC. Os LM que demonstram menos linfócitos T $CD8^+$ nos grupos infectados, seja com relação à via IO (parasitos de cultura) ou SC (parasitos de triatomíneos) (Figura 19B). Diferentemente, as PP apresentam mais T $CD8^+$ nos grupos infectados em relação ao Co, em animais infectados com parasitos de cultura, do que o observado no grupo infectado com parasitos de triatomíneos. Estes apresentam menos linfócitos T $CD8^+$ do que o Co (Figura 19B).

Quanto aos linfócitos B, é notória a diminuição de células nos LM das vias IO e SC no grupo da cultura, assim como a observado nas PP do grupo IO dos animais infectados com *T. cruzi* da excreta (Figura 19C).

Os resultados do perfil de ativação entre linfócitos presentes nos órgãos linfoides de animais infectados com parasitos de cultura e de excreta foram representados nos quadros 14 (linfócitos com perfil *naive*), 15 (linfócitos com perfil de memória central) e 16 (linfócitos com perfil efetor).

Quadro 14 Linfócitos ativados de perfil *naive* (CD44⁻CD62L⁺) em animais infectados com parasitos de origens distintas

Órgãos linfóides periféricos	Perfil <i>naive</i>																	
	T CD4 ⁺						T CD8 ⁺						B (CD19 ⁺)					
	<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta			<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta			<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta		
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-
LSC	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	↑	-	-	↑↑↑	↑↑↑
LM	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↓	↓	-	-	-
PP	-	↓	↓	-	-	↓↓	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-

Quadro 15 Linfócitos ativados de perfil de memória central (CD44⁺CD62L⁺) em animais infectados com parasitos de origens distintas

Órgãos linfóides periféricos	Perfil <i>memória central</i>																	
	T CD4 ⁺						T CD8 ⁺						B (CD19 ⁺)					
	<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta			<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta			<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta		
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	↑	-	-
LSC	-	-	-	↓	-	-	-	↑↑	-	↓	-	-	-	↑	↑	-	↑	-
LM	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↓	↓	-	-	-
PP	↓	↓	↓	-	-	↓	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	↓

Quadro 16 Linfócitos ativados de perfil efetor (CD44⁺CD62L⁻) em animais infectados com parasitos de origens distintas

Órgãos linfóides periféricos	Perfil <i>efetor</i>																	
	T CD4 ⁺						T CD8 ⁺						B (CD19 ⁺)					
	<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta			<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta			<i>T. cruzi</i> de cultura			<i>T. cruzi</i> Excreta		
	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV	IO	SC	IV
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-
LSC	-	-	-	-	↑	-	-	↑	-	-	↑	-	-	↑	-	-	↑	-
LM	↓	↓	↓	-	-	-	↓	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-
PP	↓	↓	↓	↓	-	↓	-	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	↓	-	↓

Co= Controle; IO= Infecção oral; SC=Infecção Subcutânea; IV= Infecção intravenosa

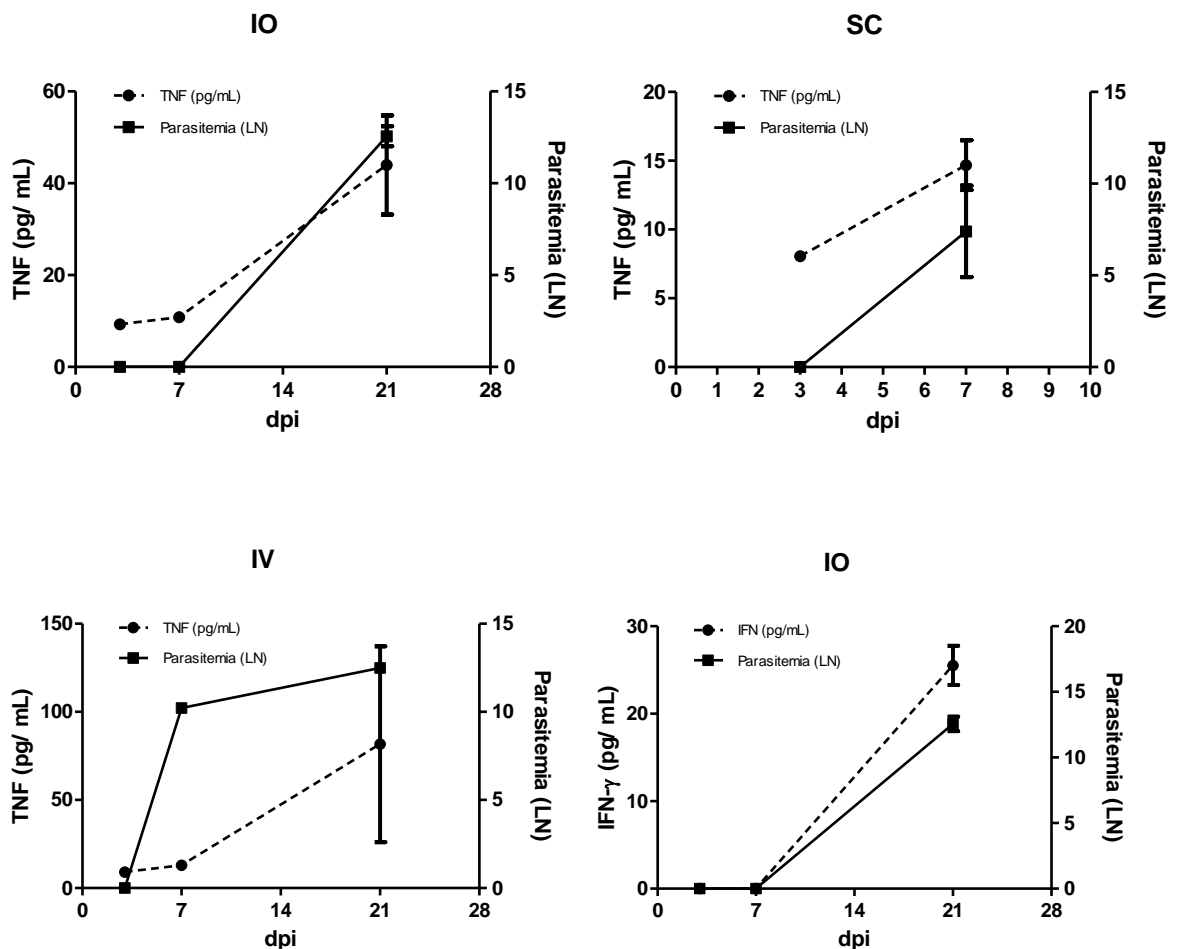
LSC= linfonodo subcutâneo; LM=linfonodo mesentérico; PP=Placas de Peyer;

- = Co ↑=Co<1x ↑↑ =Co< 2x ↑↑↑ =Co< 3x ↓=Co >1x ↓↓=Co >2x

4.10 Análise de citocinas séricas

Considerando a importância das citocinas no desenvolvimento na resposta imune do hospedeiro, avaliamos ainda, a presença de citocinas como IL-10, TNF e IFN- γ no soro dos animais infectados pelas diferentes vias. A infecção foi realizada através da IO, SC e IV com parasitos obtidos de cultura, em três momentos diferentes (3, 7 e 21dpi) da fase aguda. O experimento foi realizado com intuito de avaliar a influência da porta de entrada do parasito na expressão das citocinas circulantes.

Os resultados mostraram que ao longo da infecção há um aumento na produção de citocinas pró- inflamatórias (TNF e IFN- γ) em todas as vias, concomitante com o aumento da parasitemia. Além disso, podemos observar que a produção de IL-10 ocorre logo no início da infecção.



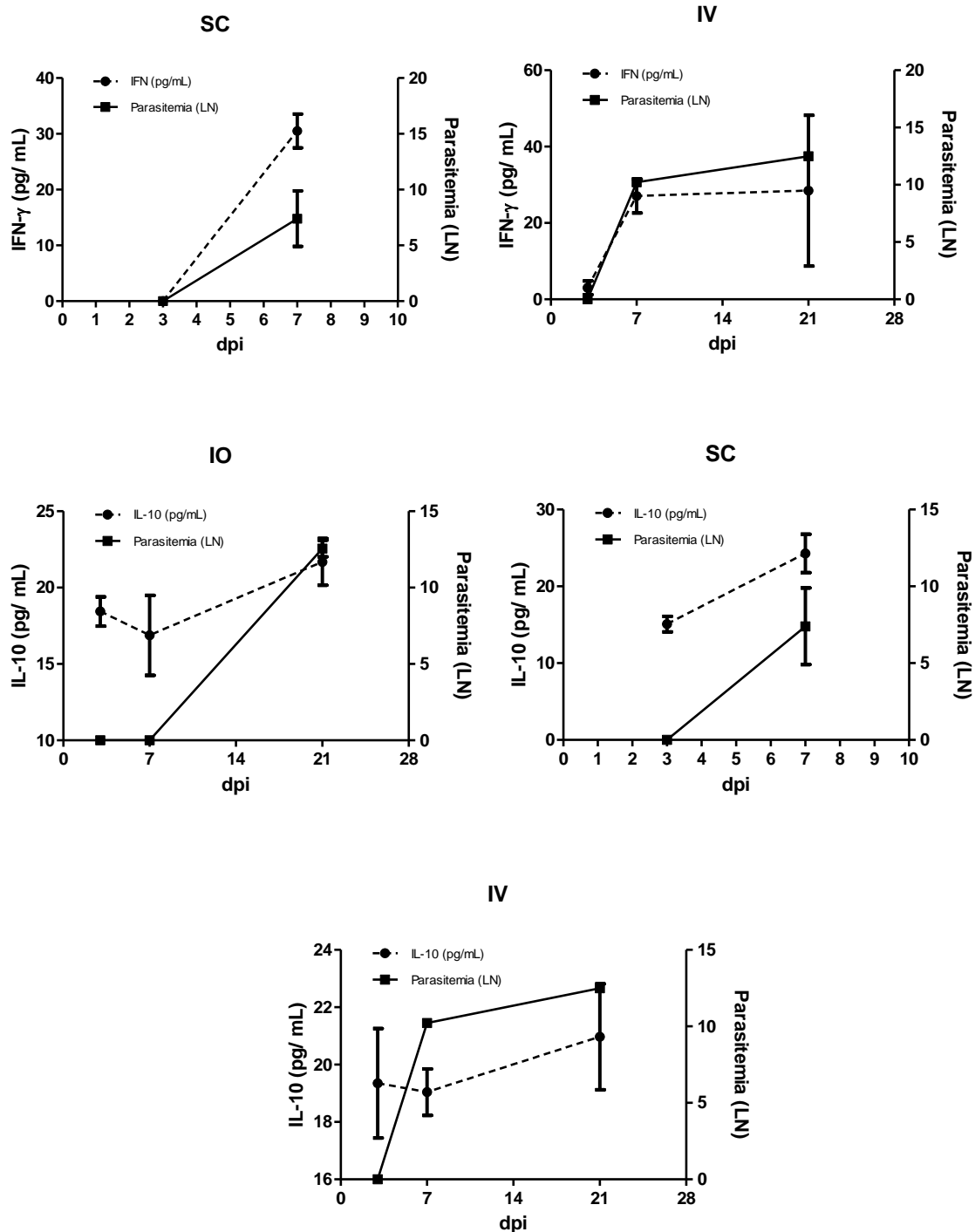


Figura 20 Relação entre citocinas presentes no soro de camundongos infectados com *T. cruzi* pelas vias oral, subcutânea e intravenosa e parasitemia. Camundongos macho BALB/c (6 semanas de idade) foram infectados pelas vias oral (IO), subcutânea (SC) e intravenosa (IV) com 5×10^4 parasitas em $50\mu\text{L}$ de RPMI e as comparações foram realizadas com 3, 7 e 21 dias pós-infecção (dpi). A concentração das citocinas séricas IL-10, TNF e IFN- γ foram quantificadas por CBA e representadas em pg de citocinas/mL. n: Co (controle) = 6; IO = 4 (3 e 7 dpi) e 21dpi = 3; SC = 4 (3 e 7 dpi); IV = 4 (3,7 e 21 dpi) = 4. Análise estatística: teste de Kruskal-Wallis. * $P < 0,05$. Comissão de Ética no Uso de Animais – Ceua/FIOCRUZ: LW-23/12.

5 DISCUSSÃO

A doença de Chagas, causada por *T. cruzi*, pode se apresentar sob diferentes aspectos clínicos no paciente. Durante a fase aguda, a sintomatologia pode variar de pacientes assintomáticos a graves com mortalidade variável na via intravenosa, entre 5-10% na via clássica vetorial e 8-35% na via oral (43). Seguida a fase aguda, os pacientes evoluem para uma fase crônica assintomática ou desenvolvem quadros de alterações cardíacas, digestivas e/ou do sistema nervoso (14,43). No entanto, ainda não foi elucidado o mecanismo de resposta que leva às distintas manifestações da doença. Acredita-se que alguns fatores interfiram na resposta, como por exemplo, a genética do hospedeiro, o acesso ao tratamento ou características do parasito como as diferentes DTUs (*do inglês “discrete typing units”*). Nesse último, as diferentes cepas de *T. cruzi* foram classificadas em seis grupos (TcI a TcVI), através de suas semelhanças genéticas e identificadas por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (14,134,135). Além da cepa do parasito, foi descrito em modelos experimentais que o tamanho do inóculo e a porta de entrada parecem contribuir para a ativação da resposta imune e para evolução doença (14,132).

Embora desconhecida a estimativa de inóculo na natureza, postula-se que em surtos de infecção oral ocorra a ingestão de grande quantidade de parasitos na infecção (14). Por outro lado, o tamanho do inóculo em modelos experimentais pode ser definido, e, acredita-se que seja maior do que o observado na natureza. Um estudo anterior realizou a análise quantitativa das dejeções de oito espécies de triatomíneos infectados e os dados revelaram que são liberadas em média 100 formas infectantes do parasito (tripomastigotas metacíclicas) nas fezes do inseto a cada dejeção (14,136).

Neste trabalho, realizamos teste de diferentes concentrações de *T. cruzi* na infecção de camundongos pelas vias IO, SC e IV com 10^2 , 10^4 e 5×10^4 . Nossos dados revelaram que evolução da parasitemia está, em parte, relacionada com a via de infecção e a carga parasitária inoculada. A via SC apresentou maior número de parasitos circulantes e elevada taxa de mortalidade, seguido das vias IV e IO, respectivamente. Além disso, em média 20% a 60% dos animais positivaram no

grupo IO, independentemente do número de parasitas inoculados, enquanto 100% dos animais infectados pelas vias SC e IV estavam positivos.

Interessantemente, experimentos do nosso grupo realizado por Barreto-de-Albuquerque e colaboradores, publicado em 2015 (34), mostraram um percentual elevado (em média 90%) de animais com parasitemia patente inoculados por via oral (34). Nesse estudo, foram utilizados tripomastigotas da cepa *Tulahuén* recém obtidos de *T. infestans*. Curiosamente, observamos que animais infectados com parasitas derivados de cultura apresentaram um percentual de infectividade menor em contraste com os dados descritos por Barreto-de-Albuquerque (34). Com isso, foram realizadas sucessíveis passagens do parasito em *T. infestans* a fim de obtermos melhores resultados no percentual de infectividade dos animais. Animais infectados com parasitas de excreta apresentaram resultados mais próximos (80%) aos observados anteriormente.

De acordo com Hoft (1996) a infecção de mucosa com tripomastigotas metacíclicas (obtido de triatomíneo infectado) é mais eficiente do que os resultados de infecção com tripomastigota sanguíneos demonstrando 100% de animais infectados por via oral (137). Estudos anteriores também demonstraram que a inoculação do parasito por vias sistêmicas (IP, SC e IV) apresentam cerca de 67% a 100% dos animais positivos, enquanto que as vias de mucosa (oral, intragástrica, intrarectal, genital e conjutival) apresentam de 17% a 67% dos animais com parasitemia patente (25,132). Além disso, os animais infectados pelas vias sistêmicas apresentam parasitemia e mortalidade maiores do que os infectados pelas vias de mucosa. Nesse sentido, Camandaroba e colaboradores demonstraram em 2002 que camundongos Swiss infectados com a cepa Colombiana pela via intraperitoneal apresentaram parasitemia e taxa de mortalidade maior do que animais infectados por via intragástrica (26). Além disso, Caradonna e Pereiraperrin em 2009 demonstraram que camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com cepa *Tulahuén* do *T. cruzi* inoculados através das vias subcutânea e intranasal, apresentam parasitemia e mortalidade elevada na via subcutânea e parasitismo maior no cérebro de animais infectados por via intranasal. (132,138).

Os resultados apresentados em nosso trabalho corroboram com esses dados pois, demonstramos que as vias sistêmicas SC e IV induziram elevado percentual de positividade, alta parasitemia e taxa de mortalidade, quando comparado com a via de mucosa oral.

Experimentos realizados pelo nosso grupo utilizando camundongos BALB/C infectados com cepa *Tulahuén* de *T. cruzi*, mostraram que animais infectados por via oral possuem elevada parasitemia e taxa de mortalidade, em comparação com a via intragástrica, porém, menor do que foi observado na via intraperitoneal (34). Os dados observados pelo grupo, se assemelham ao resultado apresentado pelo IO infectado com parasitos proveniente de *Triatoma infestans* neste trabalho, cuja parasitemia foi elevada e semelhante as vias SC e IV, principalmente com 14dpi. Com isso sugerimos que a via de infecção e a origem do parasito também contribuir para a evolução da parasitemia.

Nós observamos também que o grupo IO apresentou parasitemia patente (período pré-patente) em momentos mais tardios da infecção, quando comparados com do que as vias SC e IV.

Um estudo realizado em camundongos suíços inoculados com cepa Colombiana de *T. cruzi* pelas vias intragástrica e intraperitoneal (IP) mostrou que o período pré-patente entre estas vias são distintos. De acordo com estes resultados, a via IP apresenta parasitemia patente mais alta e mais rápida do que via intragástrica (26). Entretanto, as comparações entre as vias de infecção SC e intranasal realizadas por Caradonna e Pereiraperrin utilizando cepa *Tulahuén* de *T. cruzi* inoculados em camundongos C57BL/6, não mostram diferenças (138). Corroborando com esses dados, foi demonstrado que a parasitemia de camundongos BALB/c infectados pelas vias oral, intragástrica e intraperitoneal apresentam período pré-patente menor na via IP, e semelhante nas vias intragástrica e oral (34). Com esses dados sugerimos que entre vias de mucosa, o período pré-patente pode ser semelhante, mas conforme observado no nosso estudo, a via de inoculação também pode influenciar na determinação do período de parasitemia patente e na quantidade de parasitos circulantes. Esses dados estão de acordo com a análise de pacientes sintomáticos em fase aguda que demonstraram uma variação no período de incubação do parasita de acordo com a via de transmissão: 4- 15 dias para infecções vetoriais, 30- 40 dias via transfusão de sangue e 3- 22 para infecção oral (7,42).

Além disso, outros fatores como o eluato parecem contribuir para o surgimento da parasitemia, conforme demonstrado por Barbosa (2010). Nesse estudo, foi utilizando camundongos (imunodeficientes da linhagem isogênica *scid*) infectados pelas vias IP, IG e IO com *T. cruzi* (cepa Y) e foi detectado

um período pré-patente distinto que pode ser influenciado entre o veículo utilizado como polpa de açaí ou plasma sanguíneo (139).

Devemos considerar também o tamanho do inóculo utilizado. Camundongos C57BL/6 infectados por via IP com a cepa Colombiana do *T. cruzi* mostraram que tamanho do inóculo é importante para determinar o período pré patente e para a modulação da resposta imune. Nesse trabalho, animais infectados com inóculo maior (30.000 parasitos) apresentaram parasitemia elevada, alta taxa mortalidade, maior número de infiltrados inflamatório e parasitismo no coração, diferentemente do que foi observado com inóculos menores (300 e 3000) (140). Sendo assim, indicamos que existem diversos fatores que podem influenciar no início da parasitemia patente de animais infectados com *T. cruzi*.

Considerando que a via de inoculação está associada ao controle do parasitismo e da mortalidade dos animais, pode-se postular que a porta de entrada do parasito também estaria interferindo na resposta imune do hospedeiro. De acordo com que já foi observada anteriormente a elevada taxa de mortalidade observada nos animais infectados por via oral pode estar associada coma a produção TNF. O estudo mostra que animais infectados por via oral possuem alta produção de TNF e taxa de mortalidade mais elevada do que os infectados pela via intragástrica. Acredita-se que também que presença do TNF produzido por macrófagos possa estar relacionado com a resposta contra o parasito e danos nos tecidos cardíaco, no baço e fígado (25,34,122,131).

A infecção aguda do *T. cruzi* é complexa e leva a uma forte ativação do sistema imune, promovendo alterações distintas nos tecidos linfoides como atrofia do timo, linfonodos mesentéricos e das placas de Peyer, além de hipertrofia dos linfonodos subcutâneos e esplenomegalia (122,129). Sendo assim, avaliamos a influência da via de inoculação do parasito no timo e em órgãos linfoides periféricos como baço, linfonodos subcutâneo e mesentério e placas de Peyer.

O timo é um órgão linfoide central responsável pela maturação e diferenciação de linfócitos T e alvo de doenças infecciosas como infecção por *T. cruzi* conforme já demonstrado em trabalhos anteriores (112,115). A infecção intraperitoneal (IP) promove na fase aguda atrofia tímica, com intensa depleção de linfócitos T imaturos DN, DP, CD4 e CD8. Essa depleção é observada ao longo da fase da infecção e torna-se mais intensa com o pico de parasitemia (114,115).

Corroborando com esses dados, nossos resultados demonstram que a infecção IO reduz o número de linfócitos T CD8⁺ no timo com 14dpi. Porém, a infecção IV promove maior depleção no número linfócitos T CD4⁺ e células DP em momentos mais tardios da infecção (14 e 21dpi), assim como SC com 14dpi.

A atrofia do timo pode estar relacionada com um aumento na capacidade migratória dos timócitos para periferia, intensa apoptose e diminuição da capacidade proliferativa dessas células (114,123,124,126). Conforme revisto por De Meis (2009) o aumento de proteínas de matriz extracelular como: fibronectina, laminina, colágeno tipo 4, aumento de quimiocinas como CXCL12, além da expressão de Galectina-3, dentro do microambiente tímico podem favorecer a migração anormal de timócitos para a periferia (122,124). Dentre os fatores do hospedeiro que estimulam a apoptose de timócitos estão a galectina-3, ATP extracelular e hormônio glicocorticoide (114,115,125,142,143). Além disso, sabe-se que a depleção de timócitos DP não tem o envolvimento de Fas e perforina, mas, pode estar associada com a interação de moléculas do *T. cruzi* como a trans-sialidade (122,141).

Quanto aos órgãos linfoides periféricos, dados publicados anteriormente mostram que a IP promove esplenomegalia e hipertrofia de LSC (122). Além disso, já foi observado que animais inoculados por via SC também apresentam o aumento dos LSC em diferentes modelos (BALB/c e C57BL/6) (127).

Em nossos resultados animais infectados com parasitos de cultura apresentaram um discreto aumento do baço do grupo IV com 7 dpi, porém, a esplenomegalia torna-se mais evidente na via IO ao longo da infecção (21dpi), quando comparados aos grupos Co e IV. Além disso, comparando a celularidade do baço de animais infectados com tripomastigotas de fezes de triatomíneo e cultura com 14 dpi, o primeiro grupo apresentou tendência a uma esplenomegalia nas diferentes vias nesse momento. Por outro lado, o grupo infectado com *T. cruzi* de cultura não apresentou aumento significativo no baço.

Verificamos também que a hipertrofia dos LSC torna-se mais importante no inóculo SC em momentos mais precoces da infecção. Porém observamos que infecção pode aumentar os LSC em outras vias como IO e em menor grau na IV, conforme já observado pelo nosso grupo (dados não publicados). A comparação de celularidade dos LSC de animais infectados com tripomastigotas de fezes de triatomíneos e cultura, demonstravam que as três vias de infecção apresentaram o mesmo comportamento de expansão dos LSC.

A esplenomegalia e hipertrofia de LSC em animais infectados por via IP ocorre com ativação de linfócitos T/B, da capacidade proliferativa, elevada produção de IL-2 nos linfonodos e diminuição de IL-2 no baço (122). Além disso, ensaio de linfócitos T *in vitro* demonstrou aumento na produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 nesses tecidos infectados por via IP em relação ao controle (122). A infecção também promove AICD nos esplenócitos e células dos LSC, induzindo a morte de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, através de Fas (receptor de morte da família do TNF) e TNFR1 (P55) (122,128,144).

De acordo com a literatura, os linfócitos T são importantes no desenvolvimento da resposta imune e no controle da parasitemia, inclusive pela capacidade de produção de citocinas pró inflamatórias como IFN- γ que é essencial para ativação de APC como macrófagos e células dendríticas (71,87).

Nossos dados apresentam o aumento de linfócitos T CD4⁺ no baço do grupo IO com 21dpi e de e T CD8⁺ nas três vias de infecção com 7 dpi, destacando-se a via IV nesse período e a IO com 21dpi. Nos LSC, a presença de linfócitos T CD4⁺ do grupo SC com 7dpi foi maior do que as via IV e a IO, porém esses linfócitos aumentam ao longo da infecção. Quanto aos linfócitos T CD8⁺, observamos que estes linfócitos estão mais presentes na via SC com 7dpi, do que os demais grupos. Quando comparamos animais infectados com parasitos de origem diferente, não observamos diferenças de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço entre os grupos porém, nos LSC do grupo infectado com parasito de triatomíneo, existe uma tendência a diminuição de linfócitos T CD4⁺ no grupo IO e um aumento significativo de T CD8⁺ na via SC em relação a IO.

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ secretam IFN- γ capaz de ativar macrófagos que exercem uma função microbicida contra o parasito pelo a produção de NO. Além disso, as APC são importantes na geração de linfócitos efetores que são essenciais na eliminação do parasito, liberando citocinas responsáveis pela sua própria diferenciação em células com perfil Th-1 e Th-2. Sabe-se que a infecção pelo *T cruzi* leva a proliferação intensa de linfócitos T CD8⁺ e diminuição da carga parasitária nos tecidos onde esses linfócitos são recrutados. Contudo, a inibição da proliferação de linfócitos T CD8⁺ por outras populações como T CD4⁺CD25⁺ (Treg) pela produção de TGF- β pode favorecer a presença dos parasitos nos tecidos. Além disso, a presença de linfócitos T CD4⁺ é essencial para a ativação de linfócitos B e consequentemente a produção de linfócitos antígenos específico (87,145,146).

Quanto ao perfil de ativação, observamos que no Baço não existem diferenças significativas de linfócitos T CD4⁺ *naive* entre os grupos, mas apresenta um discreto aumento desses linfócitos nos grupos SC e IV com 7dpi, quando comparados à via IO e ao Co. Nota-se aumento na IO com 21 dpi principalmente em relação a via IV. Com 7 e 21 dpi todos os grupos infectados aumentaram T CD8⁺ *naive* no órgão. Observa-se que o baço possui diminuição de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central em todas as vias de infecção com 7dpi em relação ao controle. No entanto, a IO apresenta um aumento de T (CD4⁺ e CD8⁺) de memória central com 21 dpi quando comparados ao Co e a IV. Todas as vias de infecção por *T. cruzi* (IO, SC e IV) aumentam o número T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central entre 14 e 21 dpi. Com 7dpi o baço dos grupos infectados tem menos linfócitos T CD4⁺ com perfil efetor, que o Co. Observamos que as vias IO e IV aumentam os linfócitos T CD4⁺ efetor com 21dpi em comparação ao início da infecção (7dpi). Os linfócitos T CD8⁺ também aumentam no grupo IV com 21dpi em relação ao Co e ao grupo com 7dpi.

Observamos também que não há diferenças entre os grupos infectado e Co quanto a presença de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) *naive* no baço de acordo com a origem do parasito. O baço também não apresentou diferença entre os grupos quando avaliamos linfócitos T CD4⁺ de memória central. Entretanto, animais infectados com parasitos de triatomíneo parecem aumentar linfócitos T CD4⁺ efetor na IO.

Nos LSC, a presença de linfócito T (CD4⁺ e CD8⁺) *naive* com 7 dpi foi maior na infecção SC do que nos grupos IO e IV que diminuem inclusive em relação ao Co neste período (a exceção de T CD8⁺ no grupo IV). Nota-se que o grupo IO e IV aumenta entre 7 e 14dpi linfócito *naive* T CD4⁺ e depois diminuem. Os LSC possuem o número aumentado de linfócitos T CD4⁺ de memória central, na infecção SC em comparação com IO e IV com 7dpi, embora tenha menos CD4⁺, CD8⁺ em todas as vias de infecção com relação ao Co. Na IV a presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central é menor que o Co e IO com 21 dpi. Além disso, nota-se que a IO aumenta T CD4⁺ e CD8⁺ ao longo do tempo (7, 14 21 dpi) e IV apenas CD4⁺ entre 7 e 14dpi. Os LSC tem números de linfócitos T CD4⁺ efetor menores nas vias IO e IV do que a via SC, sendo a IO menor significativamente que o grupo SC e ao Co. Quanto aos linfócitos T CD8⁺ em todos os grupos infectados, observa-se uma

intensa diminuição com 7dpi, destacando-se a via IO e IV. Nota-se que as células T CD8⁺ na via SC aumentam durante a fase aguda em relação ao controle e a 7dpi. Aparentemente a expressão de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetor com 21dpi são semelhantes entre os grupos.

Ao compararmos os animais infectados com parasitos de cultura, observamos que a IO apresenta uma tendência a diminuição de linfócitos T CD4⁺ *naive* nos LSC. Foi demonstrado que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central também parecem diminuir na IO no órgão. A via SC apresentou um aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetor em relação ao Co e a via IV e a IO.

Dados anteriores mostram que a infecção por *T. cruzi* através da via intraperitoneal, interfere na presença de linfócitos T *naive*, de memória central e efetora nos LSC e nos LM. Experimentos *in vivo* mostram que LSC de animais infectados por via IP apresentam aumento de linfócitos T *naive* (CD62L^{high} CD44^{high}) e ativados (CD62L^{low}CD44^{high}) em relação ao controle e aos LM (129).

Indivíduos humanos em fase crônica mostram que tanto pacientes que apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas, quanto aos que apresentam a forma cardíaca da doença possuem aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em apoptose. De acordo com esse estudo, o soro de pacientes com cardiopatia, submetido ao estímulo com antígenos de *T. cruzi*, possuem aumento de células efectoras (T CD4⁺CD62L⁻) circulantes. De acordo com o autor essas células podem estar envolvidas na resposta imune exacerbada, provocando miocardite e morte induzida por ativação (55).

Embora nossos dados sejam avaliados em quatro órgãos linfoides de camundongos infectados por IO, SC e IV, nós observamos que em todas as vias os linfócitos T efetores (CD4⁺CD44⁺CD62L⁻) e B efetores aumentam ao longo da infecção. Sugerimos que esse fenômeno pode estar presente também durante a fase crônica dos animais conforme observado em pacientes crônicos. Além disso, já foi visto que a maioria de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no miocárdio de pacientes com Chagas não apresentam CD62L cujas células ativadas são a maioria T CD8⁺ (147).

A presença de linfócitos B é importante para o controle da infecção, uma vez que camundongos deficientes de células B apresentam alta taxa de mortalidade, atraso na parasitemia e dificuldade de remover parasitos do sangue (51,123,146,148).

Nossos dados apresentam o aumento de linfócitos B no baço principalmente na via IO com 21dpi. Os LSC apresentam elevado número de linfócitos B na via SC com 7dpi em relação aos grupos IO e IV, mas também aumenta na via IO com 21dpi quando comparado ao IV.

Análises do baço de camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi* por via IP mostram que presença de células B é importante na produção de INF- γ e IL12, proliferação de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e no processo de ativação dessas células durante a fase aguda (145). Sabe-se que a interação de receptores Toll 9 presente nas células do hospedeiro com o DNA do parasito induz a proliferação de linfócitos B no baço e nos LSC, contribuindo para resistência do hospedeiro (122). Entretanto, existem evidencias de que a maioria dos linfócitos B presente no início da infecção não são parasito específico, sendo a ativação desses linfócitos independente de T (149). Além disso, os linfócitos B IgG⁺ também podem morrer por AICD através de expressão de Fas/FasL (122).

Os linfócitos B *naive* no baço parecem estar mais presente nos grupos infectados com 7 dpi do que o Co. Porém destaca-se a via IV com 21dpi em relação aos Co e IO neste período. Nos LSC, a presença de B *naive* com 7 dpi foi maior na infecção SC do que nos grupos IO e IV que diminuem inclusive em relação ao Co neste período. O baço do grupo IO apresenta um aumento de linfócitos B de memória central com 21 dpi quando comparados ao Co e a IV. Os resultados demonstram que em todas as vias de infecção por *T. cruzi* (IO, SC e IV) há o aumento de linfócitos B de memória central entre 14 e 21 dpi no órgão. Nos LSC, os linfócitos B de memória central na via SC com 7dpi se destaca do grupo IO, porém a via IO aumenta ao longo do tempo e em relação ao grupo IV com 21dpi. Quanto aos linfócitos B efetor no baço, encontramos um aumento na IV 21 dpi, em relação ao controle. Nos LSC, os linfócitos B efetores mostram-se mais presente na infecção SC do que nos demais grupos, principalmente IO e IV. A presença de linfócitos B efetor nos LSC com 14dpi nas vias IO e SC estão mais elevadas que o grupo Co.

Quanto a presença de linfócitos B *naive*, memória central e efetores, animais infectado com parasitos de excreta de triatomíneo por IO apresentam um discreto de linfócitos B no baço. Não observamos diferenças no perfil de linfócitos B *naive*, memória central e efetores apresentados pelos grupos infectados com parasitos de origens diferentes.

Nós avaliamos também os linfonodos mesentéricos (LM) e as placas de Peyer (PP) presentes na superfície do intestino, considerando que estes órgãos são responsáveis pela resposta de mucosa. Após a entrada do antígeno através do sistema gastrointestinal, observa-se a participação de células do epitélio gástrico, como células M, conduzindo esses antígenos até o interior das placas de Peyer para que sejam capturados por células dendríticas. Essas por sua vez, ativam linfócitos T presente no órgão ou migram para os LM através de vasos linfáticos, a fim de apresentar os antígenos aos linfócitos presentes nos linfonodos mesentéricos (85,130,150).

Em nossos resultados foi identificada atrofia dos LM nas vias de infecção avaliadas com 14dpi e quando comparamos a infecção com 14dpi utilizando parasitos de origens distintas, observamos a redução de celularidade nas PP e dos LM, principalmente nos animais infectados com parasitos com cultura em relação aos animais Co. A infecção utilizando parasitos provenientes de cultura corroboram com o que já foi visto pelo grupo, evidenciando a atrofia dos LM em todas as vias com 14dpi e das PP principalmente nas vias SC e IV.

Sabe-se que existe atrofia linfonodos mesentéricos (LM) e das PP em modelo na infecção IP e SC (122,127,129,130). A atrofia desses tecidos ocorre devido a depleção de linfócitos T/B, apoptose mediada AICD (caspase 8) e por deprivação de fatores (IL-2, IL-4 via caspase 9) (123,127). A morte por deprivação de fatores ocorre por liberação anormal do citocromo c para o citoplasma devido ao colapso no potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspase 9 no complexo apoptosoma (APAF+ citocromo c+ caspase-9 e ATP) que levam a ativação de outras caspases efetoras como a caspase 3. Além disso, já foi descrito que nos LM ocorre aumento de IFN- γ que pode induzir o aumento da expressão de Fas/FasL induzindo a morte dos linfócitos (122,127,129). Vale ressaltar que as PP são pouco estudadas na infecção, e que a literatura mostra atrofia desse tecido na infecção intraperitoneal (122,130). Com esses resultados sugerimos que a resposta imune regional pode ser modulada em diferente intensidade dependendo da porta de entrada do parasito.

Nos LM também observamos mais T CD4⁺ na via IO com 21dpi, porém, T CD8⁺ foi encontrado nas três vias (IO, SC e IV) com 7dpi. As PP, apresentaram perda linfócitos T CD8 com 7 e 21 dpi em todas as vias de infecção, destacando-se 14dpi cuja presença desses linfócitos foi igual ao Co. Quando comparamos animais infectados com parasitos de origem diferente, observamos o comprometimento dos

linfócitos T CD4⁺ diminuindo nos LM dos animais infectados pelas três vias com parasitos de cultura. Nota-se diminuição dos linfócitos T CD8⁺ em todas as vias, independente da origem do parasito.

Os linfócitos T CD4⁺ *naive* presentes nos LM reduzem com 21dpi na via IV. Observamos que o órgão perdem linfócitos T CD8⁺ com 14 dpi, em todas as vias de infecção, mas diminui T CD8⁺ na via IO com 21 dpi. Nota-se que nos LM dos grupos infectados tem menos linfócitos T CD4⁺ de memória central que o controle, e não apresenta CD8⁺ com 7 dpi. Com 21 dpi a via IO possui a presença de T CD8⁺ semelhante ao controle. Quanto aos linfócitos T CD4⁺ efetor observados nos LM, não identificamos diferenças entre os grupos. Os linfócitos T CD8⁺ efetor na via SC com 7dpi está menos presente do que o observado com 14dpi e o grupo Co. A presença de células T (CD4⁺ e CD8⁺) nos LM diminuem com 7dpi em todos os grupos porém, aumentam após 14 e 21 dpi, tornando-se semelhante ao Co.

Nas PP, claramente foi observada a diminuição de linfócitos T CD4⁺ *naive* nas PP dos grupos infectados, principalmente na via IO com 7dpi. Interessantemente apenas a via IO torna-se semelhante ao Co ao longo da infecção (14 e 21dpi). Quanto aos linfócitos T CD8⁺ observamos que o grupo IO também perde T CD8⁺ com 7 dpi, repõe aos 14dpi mas perde novamente com 21dpi. Os grupos infectados não demonstraram T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória central com 7dpi. Observa-se que a via IO tem os números de células T (CD4⁺ e CD8⁺) de memória central aumentado com 21 dpi, diferentemente do que foi visto na IV. E embora seja notório menos T CD4⁺ efetor nas PP do grupo IO com 7dpi do que os demais grupos, a diminuição destaca-se em relação ao Co. Os linfócitos T CD8⁺ também reduziram nos grupos infectados com 7dpi e 21. Entretanto, linfócitos T CD8⁺ com perfil efetor aumentam significativamente na IV com 14dpi em relação à quantidade observada inicialmente (7dpi).

De acordo com o que foi visto anteriormente, animais infectados por via IP apresentam depleção de linfócitos T de *naive* ou ativado nos LM. Neste experimento camundongos BALB/c infectados tripomastigotas apresentam depleção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos LM (129). Nos LM, os linfócitos B não apresentam diferenças entre os grupos. Nas PP observamos a perda linfócitos B com 7 e 21 dpi em todas as vias de infecção, destacando-se 14 dpi cuja presença desses linfócitos foi igual ao Co.

Quando comparamos animais infectados com parasitos de origem diferente, observamos que os linfócitos B diminuem nos LM dos animais infectados pelas três vias com parasitos de cultura, porém, altera entre os grupos infectados com *T. cruzi* de triatomíneo. Os linfócitos B também diminuem nas PP do grupo IV infectado com parasitos provenientes de triatomíneo.

Observamos que o estado de ativação nos LM demonstram diminuição de linfócitos B *naive* com 14 dpi, independentemente da via e diminui B na via IO com 21 dpi. Os LM dos grupos infectados apresentam menos linfócitos B de memória central com 7dpi, do que o controle. Além disso, nos LM não observamos diferenças na presença de linfócitos B perfil efetor entre os grupos. Nota-se que os linfócitos B diminuem com 7dpi em todos os grupos mas, aumenta após 14 e 21 dpi, tornando-se semelhante ao Co. Os linfócitos B também reduziram nos grupos infectados com 7dpi e 21.

Os linfócitos B *naive* das PP parecem reduzir com 7dpi nas três vias em relação ao controle e não estão presente com 21dpi nos grupos infectados. As PP, também mostram menos linfócitos B que os grupos infectados com 7dpi. Observa-se que a via IO tem os números de linfócitos B de memória central aumentado com 21 dpi, diferentemente do que foi visto na IV. Os linfócitos B efetores das PP também reduziram nos grupos infectados com 7dpi e 21.

É notório que os linfócitos T/B efetores, de memória central ou *naive* podem apresentar variações em relação ao controle e as vias de inoculação do parasito. Sabe-se que a presença de linfócitos B contribui para geração de células de memória central e efetora durante a fase aguda da infecção. Nossos resultados evidenciam que além da porta de entrada do *T. cruzi*, a origem do inóculo pode influenciar a permanência dos linfócitos nos tecidos. É notório que a frequência de linfócitos T/B efetores, de memória central ou *naive* podem apresentar variações em relação ao controle e as vias de inoculação do parasito. Com isso, sugerimos que a modulação dos linfócitos pode interferir no processo de ativação das células, prejudicando a geração de células de memória ou efetora e ainda induzir a morte de linfócitos *naive* prejudicando a resposta imune no órgão.

Além da celularidade total dos órgãos, quantificação das populações linfocitárias (T CD4⁺, CD8⁺ e B) e perfil de ativação dessas células, avaliamos outro parâmetro relevante que é a expressão de citocinas durante a infecção,

considerando que são moléculas essenciais na resposta do hospedeiro contra o parasito influencia o desenvolvimento e a progressão da doença (49,56,60).

Sabe-se que durante a infecção aguda, animais inoculados por via IP e IG aumentam a resposta Th1 e Th2 (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) nos tecidos (62,122). Por conta disso, ao avaliamos a presença de citocinas circulantes nas diferentes vias em animais infectados com parasitos de cultura.

Em nossos resultados observamos que à medida que aumenta a parasitemia aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IFN- γ . Entretanto, a presença de IL-10 mostra-se semelhante em todas as vias. O aumento é maior nas vias IV e SC, sugerindo que a resposta imune com perfil Th1 ocorre em momentos iniciais da fase aguda nessas duas vias de infecção sistêmica em animais infectados com *T. cruzi* de cultura. A presença de INF- γ nas infecções SC e IV podem interferir na atividade microbicida de macrófagos com produção de espécies reativas de oxigênio, além de estimular a resposta imune antígeno específica, considerando que a presença de IFN- γ estimula a apresentação de antígenos por células dendríticas e conseqüentemente a ativação de linfócitos T e produção de anticorpos antígeno específicos (52,87,151).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- ✓ A via de infecção altera a evolução da parasitemia dos camundongos e a concentração de parasitos inoculados interfere no período pré-patente de forma mais expressiva na via IO;
- ✓ A resposta imune regional pode se apresentar de forma distinta de acordo via de infecção e a origem do parasito;
- ✓ Ocorre atrofia do timo na via SC e IV, porém de maneira mais expressiva em animais infectados pela via IV;
- ✓ A infecção com parasitos obtidos de cultura promove esplenomegalia mais importante na IO em relação ao IV e Co;
- ✓ Independentemente da via de infecção ocorre hipertrofia dos LSC, sendo evidente na via SC com 7 e 14dpi, e nas vias IO e SC com 21dpi;
- ✓ O padrão de celularidade das PP pode ser comprometido de acordo com a via de infecção, sendo o número de células total no órgão reduzido na via IO;
- ✓ Conforme a origem do parasito há alteração nos LM e nas PP;
- ✓ A modulação das subpopulações linfocitárias dos órgãos analisados varia dependendo da porta de entrada, do tempo de infecção e da origem do parasito.

- ✓ A expressão de citocinas no soro dos animais infectados ocorre em momentos diferentes dependendo da via de inoculação, resultando na presença de o IFN- γ inicialmente nas vias sistêmicas SC e IV.

Contudo, os resultados apresentados neste trabalho evidenciam a influência a porta de entrada do parasito na modulação da resposta imune regional durante a infecção do *T. cruzi*. E consideramos a importância de estudos mais aprofundados que possam relacionar a via de infecção, a origem do parasito e a resposta imune do hospedeiro com as patologias encontradas na doença de Chagas.

7 PERSPECTIVAS

Avaliar a presença de outras citocinas que podem influenciar na dinâmica dos órgãos linfoides como IL-2, IL-4, IL17 e TGF- β . Além de avaliar a presença de IL-12, considerando que essa citocina poderia explicar a presença IFN- γ conforme a via de infecção.

Analisar o comportamento do curso da infecção utilizando diferentes alimentos para infecção oral, como por exemplo: o açaí, com o objetivo cada vez mais mimetizar o que ocorre na natureza. Esse estudo seria importante, uma vez que já existem trabalhos que mostram parasitemia distinta entres os grupos.

Avaliar os órgãos linfoides em diferentes dias de parasitemia utilizando formas tripomastigotas oriundas de triatomíneo.

Dar continuidade a análise dos corações dos animais infectados nesse estudo.

Analisar CD69, marcador de ativação recente, no sentido de contribuir para elucidar os resultados aqui apresentado.

Estudar a presença de células duplo-positivas nos órgãos linfoides periféricos para tentar entender a diminuição dessas células no timo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1909. Vol. 1p. 159–218.
2. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010;465(n7301_suppl):S6–7.
3. WHO – World Health Organization (OMS - Organização Mundial de Saúde). Chagas disease (American trypanosomiasis). 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
4. Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC V. Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(7):856–62.
5. Coura JR. The main scenarios of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):277–82.
6. Ministério de Saúde. Boletim Epidemiológico. Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Secr Vigilância em saúde . 2015;46(2358–9450):1–9. Disponível em : <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>
7. Rey. L. Parasitologia. 4ª. Guanabara Koogan; 2008.

8. De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro. 2009;104:89–100.
9. Dias GBM, Gruending AP, Araújo SM, Gomes MÔL, Toledo MJ de O. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. Exp Parasitol . 2013;135(3):511–7.
10. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, Souza W De. Atlas didático Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ / Consórcio CEDERJ, 2011. v. 1. 50p;
11. Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MT V, Ceron CR. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). Braz J Biol. 2006;66(2B):703–8.
12. Junqueira ACV, Gonçalves TCM, Moreira CJ. Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopista da malária e laboratoristas da rede pública. Organ Panam saúde. 2011.
13. Nery-Guimarães F, Venâncio I, Grynberg N. Refratariedade das galinhas ao "*Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *Cruzi*"; III - dissociação dos fenômenos da refratariedade e da lise dos epimastigotas pelo soro das aves. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1974;72(1–2):131–6.
14. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:113–22.

15. Nery F, Cunha N, Clausell DT, Mello A, Rapone T, Snell T, et al. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). *Hospital (Rio de J)*, 73: 1767-1804, 1968.
16. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):845–52.
17. Coura JR, Junqueira AC V. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(2):145–54.
18. Coura JR, Junqueira AC V, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol*. 2002;18(4):171–6.
19. Coura JR, Junqueira AC V. Surveillance, health promotion and control of chagas disease in the Amazon Region - Medical attention in the Brazilian Amazon Region: A proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(7):825–30.
20. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):653–5.
21. da Silva NN, Clausell DT, Nólíbos H, de Mello AL, Ossanai J, Rapone T ST. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Inst Med Trop São Paulo*. 1968;10(5):265–76.
22. Sánchez LV, Ramírez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology*. 2013;140(2):1–13.

23. Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile*. 2011;139:258–66.
24. Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Med Clin (Barc)* . 2017;148(3):125–31.
25. Marsden PD. Trypanosoma cruzi infections in CFI mice. II. Infections induced by different routes. *Ann Trop Med Parasitol* . 1967;61(1):62–7.
26. Camandaroba ELP, Pinheiro Lima CM, Andrade SG. Oral transmission of Chagas disease: Importance of Trypanosoma cruzi biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44(2):97–103.
27. Hoft DF, Farrar PL, Kratz-owens K. Gastric invasion by Trypanosoma cruzi and induction of protective mucosal immune responses . Gastric Invasion by Trypanosoma cruzi and Induction of Protective Mucosal Immune Responses. *Infection and Immunity*. 1996;64(9):3800–10.
28. Cortez C, Martins RM, Alves RM, Silva RC, Bilches LC, Macedo S, et al. Differential Infectivity by the Oral Route of Trypanosoma cruzi Lineages Derived from Y Strain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10):e1804.
29. Cortez C, Yoshida N, Bahia D, Sobreira TJP. Structural basis of the interaction of a trypanosoma cruzi surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. *PLoS One*. 2012;7(7):e42153.
30. Collins MH, Craft JM, Bustamante JM, Tarleton RL. Oral exposure to Trypanosoma cruzi elicits a systemic CD8+ T cell response and protection against heterotopic challenge. *Infect Immun*. 2011;79(8):3397–406.

31. Costa J, Lorenzo M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines--Chagas disease vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz . 2009;104:46–51.
32. Staquicini DI, Martins RM, Macedo S, Sasso GRS, Atayde VD, Juliano MA, et al. Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(3):e613.
33. Assal A, Corbi C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine: un problème parasitaire émergent dans les pays non endémiques. Transfus Clin Biol. 2011;18(2):286–91.
34. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Berbert LR, de S-VE, Farias-de-Oliveira DA, Cotta-de-Almeida V, et al. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? PLoS Negl Trop Dis . 2015;9(6):e0003849.
35. Dias JCP, Amato Neto V, Luna EJ de A. Artigo de Opinião / Opinion Article Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. Rev da Soc Bras Med Trop. 2011;44(3):375–9.
36. Moraes-souza H, Ferreira-silva MM. O controle da transmissão transfusional Control of transfusional transmission. O Control da Transm transfusional. Rev da Soc Bras Med Trop. 2011;44:64–7.
37. José Rodrigues Coura. Contribution to the Study of Chagas' Disease in the State of Guanabara - Journals - NCBI. Rev Bras Malariol Doencas. 1966;18(1):9–98.

38. Gontijo ED, Andrade GMQ, Santos SE, Galvão LMDC, Moreira EF, Pinto FS, et al. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Rev do Sist Único Saúde do Bras.* 2009;18(3):243–54.
39. Rotta S, Siqueira L, Pedroso D. Transmissão congênita da Doença de Chagas: Uma revisão. *Arq Ciênc Saúde.* 2013;20(4):140–6.
40. Cevallos AM, Hernández R. Chagas' disease: Pregnancy and congenital transmission. *Biomed Res Int.* 2014 (2014) ID 401864 p. 10.
41. Howard E, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BJOG.* 2014;121(1):22–33.
42. Beltrão H de BM, Cerroni M de P, Freitas DRC de, Pinto AY das N, Valente V da C, Valente SA, et al. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. *Trop Doct.* 2009;39(4):231–2.
43. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* . 2010;375(9723):1388–402.
44. Dias JCP. Elimination of chagas disease transmission: Perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:41–5.
45. Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol.* 2006;112(1):132–3.

46. Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(3):296–300.
47. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26(2):275–91.
48. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;
49. Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, et al. Cytokine profiling in chagas disease: Towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (A benefit trial sub-study). *PLoS One.* 2014;9(3):1–8.
50. Nardy AF, Freire-De-Lima CG, Morrot A. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol Res.* 2015(2015); ID 178647 p. 7.
51. Parodi C, Padilla AM, Basombrío MA. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:288–94.
52. Andrade D V., Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(7):1–10.
53. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob K, Teixeira M, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis os Chagas disease. *Semin Immunopathol.* 2013;34(6):753–70.

54. Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araujo-Jorge TC, Antas PRZ, et al. Phenotypic Features of Peripheral Blood Leucocytes during Early Stages of Human Infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*. 2003;58(6):655–63.
55. Chaves AT, Assis J De, Gomes S, Fiuza JA, Carvalho AT, Ferreira KS, et al. Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease : modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. *BMC Infect Dis* . 2016;1–11.
56. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm*. 2014 (2014); ID 683230 p. 11.
57. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25^{high} T cells balancing activated CD8⁺ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol*. 2006;145(1):81–92.
58. de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PRZ, Gomes JAS, Sathler-Avelar R, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):1–8.
59. Gomes JAS, Rocha MOC, Gazzinelli G. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. 2003;71(3):1185–93.

60. Sousa GR, Gomes JAS, Fares RCG, Damásio MPDS, Chaves AT, Ferreira KS, et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PLoS One*. 2014;9(3):1–9.
61. Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol*. 2009;31(11):673–85.
62. Rodrigues AA, Notário AFO, Teixeira TL, Silva RT e, Quintal APN, Alves RN, et al. A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection. *Acta Trop* . 2016;157:42–53.
63. Abel LC., Rizzo L V, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' Disease Cardiomyopathy Patients Display an Increased IFN- γ Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Autoimmun*. 2001;17(1):99–107.
64. Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti L a, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* . 1997;83(2):165–72.
65. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley DG MT. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(2):192–200.

66. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LCJ, Buck P, Mady C, Kalil J, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . 2003;98(3):407–11.
67. Barcelos S, Gomes YM, Ribeiro L, Teixeira MM. Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor – a in Chagasic Cardiomyopathy. 2004;943–50.
68. Ramirez LE, Lages-silva E, Chapadeiro E. The hamster (*Mesocricetus auratus*) as experimental model in chagas' disease: parasitological and histopathological studies in acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994;27(3):163–9.
69. Aliberti JCS, Cardoso MAG, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*. 1996;64(6):1961–7.
70. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL SA. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol*. 1992;148(6):1792–6.
71. Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett*. 1992;33(1):35–40.

72. Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC, et al. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic chagas disease cardiomyopathy. *Scand J Immunol.* 2007;66(2–3):362–71.
73. Graefe SEB, Jacobs T, Gaworski I, Klauenberg U, Steeg C, Fleischer B. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. *Microbes Infect.* 2003;5(10):833–9.
74. Müller U, Köhler G, Mossmann H, Schaub G a, Alber G, Di Santo JP, et al. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol.* 2001;167(6):3346–53.
75. Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med .* 1991;174(3):539–45.
76. dos Santos RR, Rossi M a, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med .* 1992;175(1):29–39.
77. Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi* infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* 2000;68(7):4075–83.
78. da Matta Guedes PM, Gutierrez FRS, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(2).

79. Cunha-neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuto L, Higuchi ML, et al. Cardiac Gene Expression Profiling Provides Evidence for Cytokinopathy as a Molecular Mechanism in Chagas ' Disease Cardiomyopathy. *American Journal of Pathology*. 2005;167(2):305–13.
80. Gomes J a S, Bahia-oliveira LMG, Rocha OC, Busek SCU, Teixeira MM, Silva JS, et al. Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas` Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients. *Infection and immunity*. 2005;73(12):7960–6.
81. Machado FS, Martins G a, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi* infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 2000;102(24):3003–8.
82. Marino APMP, Da Silva A, Dos Santos P, De Oliveira Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, et al. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of trypanosoma cruzi-elicited myocarditis. *Circulation*. 2004;110(11):1443–9.
83. Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM, et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* . 2005;191(4):627–36.
84. Guedes PMM, Veloso VM, Talvani A, Diniz LF, Caldas IS, Do-Valle-Matta MA, et al. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Vet Immunol Immunopathol* . 2010;138(1–2):106–13.

85. Kenneth M, Travers P, Walport M, Charles Janeway. Janeway's immunobiology. Garland Sc. New York; 2008.
86. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Weiss LM, Chua S, Albanese C, Machado FS, et al. Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio Janeiro. 2009;104:219–25.
87. Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. World J Exp Med . 2013;3(1):1–10.
88. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2006;177(6):3515–9.
89. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nat Rev Immunol . 2007;7(3):179–90.
90. Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect . 2010;12(7):511–7.
91. Oliveira AC, Peixoto JR, Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. J Immunol . 2004;173:5688(9):5688–96.
92. Aoki MP, Carrera-Silva EA, Cuervo H, Fresno M, Giroñs N, Gea S. Nonimmune cells contribute to crosstalk between immune cells and inflammatory mediators in the innate response to *Trypanosoma cruzi* infection. J Parasitol Res. 2012 (2012); ID 737324 p. 13.

93. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low Density Lipoprotein receptor in invasion. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(2).
94. Brener Z GR. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol. 1997;114(2):103–10.
95. Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR GR. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. J Immunol. 1997;159(12):6131–9.
96. Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, 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. 1998;66(3):1208–15.
97. Cardillo F, de Pinho RT, Antas PRZ, Mengel J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. Pathog Dis . 2015;73(9):ftv082.
98. Xiao BG, Ma CG, Xu LY, Link H LC. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. Mol Immunol. 2008;45(4):1191–6.
99. Kress Y, Bloom BR, Wittner M, Rowen A, Tanowitz H. Resistance of *Trypanosoma cruzi* to killing by macrophages. Nature . 1975;257(5525):394–6.
100. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. Clin Microbiol Rev. 2011;24(3):592–630.

101. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 2002;18(6):272–8.
102. Gil-Jaramillo N, Motta FN, Favali CBF, Bastos IMD, Santana JM. Dendritic cells: A double-edged sword in immune responses during chagas disease. *Front Microbiol.* 2016;7:1–12.
103. Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, Förster R. Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics. *Annu Rev Immunol .* 2016;34:203–42.
104. Buettner M, Bode U. Lymph node dissection – understanding the immunological function of lymph nodes. *Clinical and Experimental Immunology* 2012;205–12.
105. Gasteiger G, Ataide M, Kastenmuller W. Lymph node - An organ for T-cell activation and pathogen defense. *Immunol Rev.* 2016;271(1):200–20.
106. Stahl P, Ruppert V, Schwarz RT, Meyer T. *Trypanosoma cruzi* evades the protective role of interferon-gamma-signaling in parasite-infected cells. *PLoS One.* 2014;9(10):1–14.
107. Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, Nomizo A, Mengel J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8 + T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology.* 2007;122(4):584–95.
108. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM KJ. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:252–8.

109. MA, Bryan, Guyach SE NK. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(7):e733.
110. Umekita LF MI. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? Braz J Med Biol Res. 2000;33(3):253–8.
111. Dos-Santos ALA, Carvalho-Kelly LF, Dick CF, Meyer-Fernandes JR. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. Exp Parasitol . 2016;167:67–75.
112. Gordon J, Manley NR. Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. Development . 2011;138(18):3865–78.
113. Ruddle NH, Akirav EM. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. J Immunol . 2010;183(4):2205–12.
114. De Meis J, Aurélio Farias-De-Oliveira D, Nunes Panzenhagen PH, Maran N, Villa-Verde DMS, Morrot A, et al. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. J Parasitol Res. 2012;2012.
115. Savino W. The Thymus Is a Common Target Organ. PLoS Pathog. 2006;2(6).
116. De Meis J, Aurélio Farias-De-Oliveira D, Nunes Panzenhagen PH, Maran N, Villa-Verde DMS, Morrot A, et al. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. J Parasitol Res. 2012;2012:1–2.

117. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(3):326–32.
118. Dzwonek J, Wilczynski GM. CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Front Cell Neurosci* . 2015;9:175.
119. Baaten BJB, Tinoco R, Chen AT, Bradley LM. Regulation of antigen-experienced T cells: Lessons from the quintessential memory marker CD44. *Front Immunol*. 2012;3:1–12.
120. De Alencar BCG, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, et al. Perforin and Gamma Interferon Expression Are Required for CD4+ and CD8+ T-Cell-Dependent Protective Immunity against a Human Parasite, *Trypanosoma cruzi*, Elicited by Heterologous Plasmid DNA Prime-Recombinant Adenovirus 5 Boost Vaccination. *Infect Immun* . 2009;77(10):4383–95.
121. Reedt SG. Adoptive Transfer of Resistance to Acute *Trypanosoma cruzi* Infection with T-Lymphocyte-Enriched Spleen Cells. *Infect Immun* 1980;28(2):404–10.
122. De Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DMS, Savino W. Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(7).
123. Morrot A, Barreto De Albuquerque J, Berbert LR, De Carvalho Pinto CE, De Meis J, Savino W. Dynamics of lymphocyte populations during *trypanosoma cruzi* infection: From thymocyte depletion to differential cell expansion/contraction in peripheral lymphoid organs. *J Trop Med*. 2012;2012.

124. Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Mendes-da-Cruz DA, Riederer I, de Meis J, Ferreira Lima-Quaresma KR, et al. *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol.* 2003;33(9):2439–48.
125. Silva-Monteiro E, Reis Lorenzato L, Kenji Nihei O, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, et al. Altered Expression of Galectin-3 Induces Cortical Thymocyte Depletion and Premature Exit of Immature Thymocytes during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Am J Pathol.* 2007;170(2):546–56.
126. Mendes-da-Cruz DA, de Meis J, Cotta-de-Almeida V, Savino W. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect.* 2003;5(10):825–32.
127. De Meis J, Mendes-Da-Cruz DA, Farias-De-Oliveira DA, Corrêa-De-Santana E, Pinto-Mariz F, Cotta-De-Almeida V, et al. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: Differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. *Microbes Infect.* 2006;8(1):221–31.
128. Guillermo LVC, Silva EM, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Pereira WF, Yagita H, et al. The Fas death pathway controls coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol.* 2007;81(4):942–51.
129. De Meis J, Ferreira LMS, Guillermo LVC, Silva EM, DosReis GA, Lopes M de F. Apoptosis differentially regulates mesenteric and subcutaneous lymph node immune responses to *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol.* 2008;38(1):139–46.
130. Antunez MI, Feinstein RE, Cardoni RL, Gronvik KO. *Trypanosoma cruzi*: T cell subpopulations in the Peyer's patches of BALB/c infected mice. *Exp Parasitol.* 1997;87(1):58–64.

131. Caradonna K, Pereiraperrin M. Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2009;77(4):1349–56.
132. De Meis J, De Albuquerque JB, Dos Santos DS, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, Cotta-de-Almeida V, et al. *Trypanosoma cruzi* entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in mice. *Front Immunol*. 2013;4:1–7.
133. Araújo-Jorge, T. & Castro SL. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal. Rio Janeiro, FIOCRUZ. 2000;
134. Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita , dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia*. 2011;44–8.
135. Zingales B, Andrade SG, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature : second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:1051–4.
136. Borges-Pereira J, Pessoa I CJ. Observações sobre as dejeções e o número de *T. cruzi* eliminados por diferentes espécies de triatomíneos durante a alimentação. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio Janeiro*. 1988;83.
137. Hoft D. Infecção diferencial da mucosa em diferentes estádios de vida de *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(4):360–4.
138. Caradonna K, PereiraPerrin M. Preferential Brain Homing following Intranasal Administration of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* . 2009;77(4):1349–56.

139. Barbosa RL. Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi* pela polpa de açaí em camundongos (Tese de doutorado). Campinas. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas; 2010.
140. Borges DC, Araújo NM, Cardoso CR, Lazo Chica JE. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. 2013;138(2):145–56.
141. Mucci J, Mocetti E, Leguizamón MS, Campetella O. A sexual dimorphism in intrathymic sialylation survey is revealed by the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 2005;174(8):4545–50.
142. Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DMS, Nunes Panzenhagen PH, Silva-dos-Santos D, Berbert LR, Savino W, et al. Caspase 8 and 9 mediate thymocyte apoptosis in *Trypanosoma cruzi* acutely infected mice. *J Leukoc Biol*. 2013;93:227–34.
143. Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Roggero E, Calmon-Hamaty F, Villar SR, Gutierrez FR, et al. Immunoendocrinology of the thymus in chagas disease. *Neuroimmunomodulation*. 2011;18(5):328–38.
144. Silva EM, Guillermo LV, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Pereira RM, Wu Z, Calegari-Silva TC, Seabra SH, Lopes UG, Siegel RM, Dosreis GA LM. Caspase-8 activity prevents type 2 cytokine responses and is required for protective T cell-mediated immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2005;174(10):6314–21.
145. Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, Nomizo A, Mengel J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8 + T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. 2007;122(4):584–95.

146. Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Montes CL, Acosta-Rodríguez E V., Gruppi A. B-cell response during protozoan parasite infections. *J Parasitol Res.* 2012;2012.
147. Dos Santos PVA, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino APMP, Paiva CN, et al. Prevalence of CD8+ $\alpha\beta$ T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.* 2001;3(12):971–84.
148. Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* 1976;116(3):755–60.
149. Gao W, Wortis HH, Pereira M a. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int Immunol.* 2002;14(3):299–308.
150. Houston S a, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat a M, Milling S. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol.* 2016;9(2):468–78.
151. Batalla EI, Pino Martínez AM, Poncini C V., Duffy T, Schijman AG, González Cappa SM, et al. Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent *Trypanosoma cruzi* population. *J Innate Immun.* 2013;5(5):494–504.