



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**  
**E SAÚDE PÚBLICA**

**JOSÉ RODRIGUES DO CARMO NETO**

---

**Avaliação da produção de BMP2 no intestino de camundongos  
infectados com *Trypanosoma cruzi***

---

**Goiânia**

**2020**



**UFG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

**E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

**1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação       Tese

**2. Nome completo do autor**

José Rodrigues do Carmo Neto

**3. Título do trabalho**

**Avaliação da produção de BMP2 no intestino de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi***

**4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Reis Machado e Silva, Usuário Externo**, em 14/10/2020, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **JOSÉ RODRIGUES DO CARMO NETO, Discente**, em 14/10/2020, às 15:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1405663** e o código CRC **A6DE8E5E**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.007084/2020-36

SEI nº 1405663

**JOSÉ RODRIGUES DO CARMO NETO**

---

**Avaliação da expressão de BMP2 no intestino de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi***

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Juliana Reis Machado e Silva  
Co-orientadores: Mara Rúbia Nunes Celes e Milton Adriano Pelli Oliveira

**Goiânia**

**2020**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

do Carmo Neto, José Rodrigues  
Avaliação da produção de BMP2 no intestino de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / José Rodrigues do Carmo Neto. - 2020.  
LXII, 62 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva; co orientadora Dra. Mara Rúbia Nunes Celes ; co-orientador Dr. Milton Adriano Pelli Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2020.  
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. doença de Chagas. 2. BMP2. 3. intestino. 4. sistema nervoso entérico. I. Machado e Silva, Juliana Reis , orient. II. Título.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JOSÉ RODRIGUES DO CARMO NETO** – Aos doze dias do mês de março do ano de 2020 (12/03/2020), às 09:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA (IPTSP/UFG), HELIOSWILTON SALES DE CAMPOS (IPTSP/UFG) e ALINE DE ARAÚJO FREITAS (UniEvangélica), para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "**Avaliação da produção de BMP2 no intestino de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi***", em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PARASITOLOGIA**, de autoria de **JOSÉ RODRIGUES DO CARMO NETO**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Coorientador, Prof. Dr. **MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida o autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1481/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora	Aprovado /
Reprovado	
Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira	Aprovado
Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos	Aprovado
Profa. Dra. Aline de Araújo Freitas	Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato **Habilitado**, (**Habilitado** ou não **Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PARASITOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às   11   h   20   min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e

aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Milton Adriano Pelli De Oliveira, Presidente**, em 12/03/2020, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helioswilton Sales De Campos, Professor do Magistério Superior**, em 12/03/2020, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline de Araújo Freitas, Usuário Externo**, em 12/03/2020, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1217099** e o código CRC **448ED787**.

Referência: Processo nº 23070.007084/2020-36

SEI nº 1217099

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE  
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno (a):** José Rodrigues do Carmo Neto

**Orientador (a):** Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Reis Machado e Silva

**Membros:**

**1. Prof(a). Dr(a). Juliana Reis Machado e Silva**

**2. Prof(a). Dr(a). Helioswilton Sales de Campos**

**3. Prof(a). Dr(a). Aline de Araújo Freitas**

**Data: 12/03/2020**

## AGRADECIMENTOS

---

---

Aos meus pais, Ana Lucia e João, pelo amor incondicional, por me proporcionarem as oportunidades e educação para estar realizando esse trabalho, pela paciência, carinho e compreensão. Toda a minha gratidão.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Reis Machado pela ótima relação como orientadora e capacidade de transmitir conhecimento, confiança e ensinamentos.

Aos meus co-orientadores, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Rúbia Nunes Celes e Prof. Dr. Milton Adriano Pelli Oliveira pela parceria, disponibilidade e sempre que necessário esclarecer minhas dúvidas. Tanto quanto auxiliar no desenvolvimento do projeto.

A todos meus amigos da Biotecnologia, Denner, Elisa, Gabriela, Laryssa e Silvio. Aos amigos do Laboratório de Patologia de Invertebrados e do Laboratório de Estudos da Interação Parasito-Hospedeiro do IPTSP.

Agradeço também os colegas do laboratório de Patologia Geral do IPTSP. A Gisleine, técnica do laboratório por todo apoio.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, que viabilizou a realização deste projeto.

Ao modelo experimental por permitir novos achados científicos sobre a doença de Chagas.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em especial Prof. Dr. Marcos Vinicius Silva, por disponibilizar seu laboratório, tempo e compartilhar ensinamentos no qual permitiram a execução deste trabalho. A Doutoranda Crislaine Aparecida por ter me auxiliado nas análises histológicas.

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro durante o período de mestrado.

## SUMÁRIO

---

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA .....	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.2 Patogênese da doença de Chagas: Megacólon .....	2
1.3 Proteína morfogenética óssea do tipo 2 – BMP2.....	5
2. JUSTIFICATIVA .....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 Geral.....	9
3.2 Específicos .....	9
4. MÉTODOS.....	10
4.1 Animais .....	10
4.2 Infecção e eutanásia dos animais .....	10
4.3 Acompanhamento da parasitemia, peso corporal e sobrevida .....	11
4.4 Processamento dos órgãos .....	12
4.5 Quantificação do infiltrado inflamatório .....	12
4.6 Contagem de neurônios do plexo mioentérico.....	12
4.7 Quantificação de tecido conjuntivo fibroso.....	13
4.8 Obtenção do homogenato do intestino e do baço .....	13
4.9 Quantificação de BMP2 e citocinas.....	13
4.10 Análise Estatística.....	14
5. RESULTADOS .....	15
5.1 A cepa Y apresenta parasitemia de evolução rápida .....	15
5.2 A infecção pela cepa Y induz perda de peso .....	15
5.3 A infecção com a cepa Y não diminui a sobrevida dos animais.....	16
5.4 Animais com 30 dias de infecção apresentam infiltrado inflamatório mais intenso. 16	
5.5 Trinta dias de infecção são determinantes para a diminuição de neurônios no plexo mioentérico.....	17
5.6 A cepa Y induz deposição de colágeno após 90 dias de infecção.....	19
5.7 A cepa Y induz o aumento de BMP2 aos 30 dias de infecção no intestino .....	20
5.8 A cepa Y induz o aumento de IFN- $\gamma$ aos 30 dias de infecção no intestino .....	21
5.9 A cepa Y induz o aumento de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ no baço aos 30 dias de infecção no baço .....	22
5.10 O aumento de BMP2 pode estar relacionado com a manutenção do perfil pró-inflamatório com 30 dias de infecção .....	23

5.11 O aumento de BMP2 e IFN- $\gamma$ pode estar relacionado com a diminuição de neurônios do plexo mioentérico.....	24
6. DISCUSSÃO .....	26
7. CONCLUSÃO.....	30
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
REFERÊNCIAS .....	32
ANEXOS .....	42

## QUADROS, TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

---

- Quadro 1** – Levantamento do número de grupos, tipo de cepa utilizada para a infecção, dias de manutenção de cada experimento e o número de animais utilizados.....10
- Figura 1** – Esquema do delineamento experimental do estudo.....11
- Figura 2** – Parasitemia de camundongos C57Bl/6 infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas por via subcutânea com cepas Y de *Trypanosoma cruzi*. A parasitemia foi determinada por meio da contagem do número de tripomastigotas sanguíneas em 5µl de sangue coletado da veia caudal. Os valores da parasitemia foram corrigidos de acordo com o fator de correção baseado na área da lâmina, do campo observado e do aumento utilizado no microscópio.....15
- Figura 3** – Peso corporal (g) de camundongos C57Bl/6 controles e infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas por via subcutânea com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As análises foram feitas aos 0, 30 e 90 dias de infecção. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, considerando  $p < 0,05$ , as barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão.....16
- Figura 4** – Intensidade do infiltrado inflamatório intestinal de camundongos C57Bl/6 aos 30 e 90 dias de infecção com 1000 formas de tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. A análise foi feita seguindo os seguintes parâmetros de score: 0–0.3 = normal; 0.4–1.0 = discreto; 1.1–2 = moderado; 2.1–3 = acentuado. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .....17
- Prancha 1** – Intensidade de infiltrado inflamatório de intestino de camundongos C57Bl/6 infectados aos 30 (A) e 90 dias (B) de infecção com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina e documentadas em microscópio de luz comum sob aumento de 400x. O infiltrado inflamatório está destacado dentro de linhas pretas. Três cortes seriados (100 µm de distância) foram incluídos na análise. Para a avaliação semiquantitativa, 10 fotos aleatórias (n=30) de cada corte foram documentadas e categorizada de acordo com o score: 0–0.3 = normal; 0.4–1.0 = discreto; 1.1–2 = moderado; 2.1–3 = acentuado.....17

**Figura 5** – Número de neurônios por campo no plexo mioentérico de camundongos C57Bl/6 não infectados e infectados pelas cepas Y de *Trypanosoma cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção. Os fragmentos intestinais foram corados por Giemsa e observados em microscópio de luz comum sob aumento de 400x para contagem dos neurônios. O total de 120 campos foram analisados para cada camundongo em 4 fragmentos intestinais seriados. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .....18

**Prancha 2** – Fotomicrografia do intestino de camundongos C57Bl/6 não infectados com 30 dias (A) e infectados com 30 dias (B) com 1000 formas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Neurônios do plexo mioentérico estão destacados dentro de linhas pretas e destacados pela seta preta. A seta branca (B) representa infiltrado inflamatório próximo aos neurônios no grupo infectado com 30 dias. Quatro cortes seriados com distância de 100  $\mu\text{m}$  entre cada um foram avaliados sob microscopia de luz comum em aumento de 400x. Essa distância foi selecionada para que fosse analisada uma maior área. Os neurônios foram contados em 30 campos aleatórios em cada corte, totalizando 120 campos por animal. Coloração utilizada foi Giemsa.....18

**Figura 6** – Percentual de colágeno depositado no intestino de camundongos C57Bl/6 não infectados ou infectados pelas cepas Y de *Trypanosoma cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção. Campos aleatórios (n=20) do intestino foram avaliados em microscópios sob luz polarizada em aumento de 400x. A quantificação foi obtida por meio do software Axion vision (ZEISS). \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .....19

**Prancha 3** – Percentual de colágeno no intestino de camundongos C57Bl/6 não infectados com 30 (A) e 90 dias (B) e infectados com 30 (C) e 90 dias (D) com 1000 formas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. A análise do colágeno foi realizada por meio da captura de 20 campos aleatórios das camadas mucosa, submucosa e muscular sob aumento de 400x e a quantificação foi executada a partir do programa Axion vision (ZEISS). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p > 0,05$ .....20

**Figura 7** – Quantificação de BMP2 em picogramas/mg de intestino (A) e baço (B) de camundongos C57Bl/6 não infectados ou infectados com 1000 formas de tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As dosagens foram feitas aos 30 e 90 dias de infecção através da técnica de ELISA. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .....21

- Figura 8** – Quantificação de TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) e IL-10 (C) em picogramas/mg de intestino de camundongos C57Bl/6 não infectados ou infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As dosagens foram feitas aos 30 e 90 dias de infecção por meio da técnica de ELISA. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .....22
- Figura 9** – Quantificação de TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) e IL-10 (C) em picogramas/mg de baço de camundongos C57Bl/6 não infectados ou infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As dosagens foram feitas aos 30 e 90 dias de infecção por meio da técnica de ELISA. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .....23
- Figura 10** – Correlação entre a concentração de TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) e IL-10 (C) com a concentração de BMP2 em picogramas/mg de intestino. Dados provenientes de camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* aos 30 dias de infecção. Correlação pelo teste de Spearman. Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .....24
- Figura 11** – Correlação entre a quantidade de neurônios por campo com a concentração de TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B), IL-10 (C) e BMP2 (D) em picogramas/mg de intestino. Dados provenientes de camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* aos 30 dias de infecção. Correlação pelo teste de Spearman. Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .....25
- Anexo 1** – Parecer consubstanciado referente ao atendimento de pendência do protocolo Nº. 051/19 e certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás/CEUA-UFG.....43

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

$\mu\text{L}$  – Microlitro  
 $\mu\text{m}$  – Micrômetro  
BMPs – Proteínas morfogenéticas ósseas  
CEUA – Comissão de ética de uso de animais  
cm – Centímetros  
DC – Doença de Chagas  
DTUs – discrete typing units  
ELISA – Ensaio Imunoenzimático.  
EUA – Estados Unidos da América  
HI – Hospedeiro invertebrado  
HV – Hospedeiro vertebrado  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IL – Interleucina  
IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública  
mg – Miligrama  
mL – Mililitro  
NO – Óxido nítrico  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PBS – Solução salina tamponada com fosfatos  
pg – Picogramas  
PMI – Plexo mioentérico intestinal  
SNE – Sistema nervoso entérico  
SP – Substância P  
*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*  
TGI – Trato gastrointestinal  
Th1 – Linfócito T helper do tipo 1  
Th2 – Linfócito T helper do tipo 2  
TMB – Tetra-Metil-Benzidina  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
Tregs – Células T reguladoras  
UFG – Universidade Federal de Goiás  
VIP – Polipeptídio intestinal vasoativo  
HE – Hematoxilina e eosina

## RESUMO

---

### **Avaliação da produção de BMP2 no intestino de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi***

Uma das principais complicações tardias da doença de Chagas (DC) é o megacólon, acometendo aproximadamente 10% dos pacientes sintomáticos. Entretanto, estudos são necessários para entender mecanismos envolvidos na progressão desse quadro na fase crônica da DC. Sabe-se que neurônios do plexo mioentérico são essenciais para o controle da motilidade intestinal. Mediante a infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), o perfil inflamatório que se instala está envolvido na destruição neural. Uma das proteínas relacionadas à manutenção das células nervosas do plexo mioentérico é a proteína morfogenética óssea do tipo 2 (BMP2), produzida principalmente por macrófagos da muscular. A homeostase da relação BMP2/macrófagos está diretamente envolvida com a motilidade intestinal e com a manutenção da função do órgão. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi correlacionar a produção de BMP2 intestinal com a produção de citocinas e alterações histopatológicas em camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa Y de *T. cruzi* nos períodos de 30 e 90 dias de infecção. Os camundongos foram infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas. Após o período de infecção, os camundongos foram eutanasiados e o baço e intestino foram coletados. O intestino foi dividido em dois fragmentos, um foi utilizado para as análises histológicas e o outro para quantificação de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e BMP2, assim como o baço. A infecção pela cepa Y induziu aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e BMP2 no intestino aos 30 dias de infecção, assim como aumento do infiltrado inflamatório e a diminuição do número de neurônios no plexo mioentérico. A deposição de colágeno teve aumento gradativo ao longo da infecção, demonstrado aos 90 dias de infecção. Observou-se que o aumento de BMP2 aos 30 dias de infecção tem correlação positiva com o aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no intestino. Entretanto, BMP2 e IFN- $\gamma$  demonstraram correlação negativa com a quantidade de neurônios do plexo mioentérico nesse mesmo período no órgão. Como primeiro relato da alteração da produção de BMP2 após a infecção por *T. cruzi*, sugere-se que esse desequilíbrio possa representar uma nova via na manutenção do perfil pró-inflamatório intestinal, assim como estar relacionado com o dano neuronal que o processo infeccioso estabelece.

**Palavras-chaves:** doença de Chagas, BMP2, intestino, sistema nervoso entérico

## ABSTRACT

---

---

### **Evaluation of BMP2 production in the intestine of mice infected with *Trypanosoma cruzi***

One of the main late complications of Chagas' disease (CD) is the megacolon, affecting approximately 10% of symptomatic patients. However, studies are needed to understand mechanisms involved in the progression of this condition in the chronic phase of CD. Myenteric plexus neurons are known to be essential for the control of intestinal motility. Through infection by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), the inflammatory profile that sets in is involved in neural destruction. One of the proteins related to the maintenance of nerve cells in the myenteric plexus is the type 2 morphogenetic protein (BMP2), produced mainly by muscle macrophages. The homeostasis of the BMP2/macrophage ratio is directly involved with intestinal motility and the maintenance of organ function. Thus, the aim of this study was to correlate the production of intestinal BMP2 with the production of cytokines and histopathological changes in C57Bl / 6 mice infected by the *T. cruzi* Y strain in the periods of 30 and 90 days of infection. The mice were infected with 1000 blood trypomastigote forms. After the infection period, the mice were euthanized and the spleen and intestine were collected. The intestine was divided in two, one fragment was used for histological analysis and the other for quantification of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and BMP2, as well as the spleen. Infection with strain Y induced an increase in the production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and BMP2 in the intestine after 30 days of infection, as well as an increase in the inflammatory infiltrate and a decrease in the number of neurons in the myenteric plexus. Collagen deposition increased gradually throughout the infection, demonstrated at 90 days of infection. It was observed that the increase in BMP2 after 30 days of infection has a positive correlation with the increase of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the intestine. However, BMP2 and IFN- $\gamma$  showed a negative correlation with the number of neurons in the myenteric plexus in the same period in the organ. As a first report of the alteration of BMP2 production after infection by *T. cruzi*, it is suggested that this imbalance may represent a new pathway in maintaining the intestinal pro-inflammatory profile, as well as being related to the neuronal damage that the infectious process establishes.

**Keywords:** Chagas disease, morphogenetic protein 2, intestine, enteric nervous system.

# 1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

---

## 1.1 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas (DC). Os principais responsáveis pela transmissão desse microrganismo na América Latina são insetos da família *Reduviidae*. Países como Argentina, Brasil, Bolívia, Colômbia, Uruguai, Equador e Venezuela são considerados endêmicos para a DC, sendo que cerca de 25 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de infecção (WHO, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) existem 8 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo que a maior parte desse número se concentra na América Latina (WHO, 2016). Também se estima que o número de novos casos por ano nesse continente seja de 300 mil casos (SIMÕES *et al.*, 2017). Além da América Latina, casos já foram relatados na Europa e na América do Norte (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). Esses achados se justificam, principalmente, pela globalização e subsequente migração de pessoas infectadas. Outras formas de infecção também estão envolvidas no aumento desses casos, como a transmissão pelo vetor, a oral e a congênita (WHO, 2016).

No Brasil, pelo menos um milhão de pessoas estão infectadas por *T. cruzi*, sendo que a maior parte desses casos são de indivíduos na fase crônica (SOUSA JÚNIOR *et al.*, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Recentemente, casos de DC aguda aumentaram no país. Sugere-se que esse aumento esteja relacionado ao consumo de alimentos contaminados com o protozoário, como o açaí e caldo de cana (VARGAS *et al.*, 2018). A atração dos vetores pelas luzes utilizadas no momento da extração do açaí e a falta de higiene antes do processamento são hipóteses que corroboram para a contaminação do alimento (COURA *et al.*, 2002). É discutido também, que possam existir crioprotetores no suco de açaí, o que permitiria a sobrevivência do parasito mesmo após congelamento (SANTANA *et al.*, 2018).

O agente etiológico da DC possui várias formas celulares de desenvolvimento dependente do hospedeiro, seja ele vertebrado (HV) ou invertebrado (HI). Mediante ao repasto sanguíneo na pele do HV, triatomíneos infectados, eliminam fezes com tripomastigotas metacíclicas (BRENER, 1997; TYLER; ENGMAN, 2001). Com o repasto, uma reação inflamatória ocorre e faz com que o hospedeiro coce o local (CHAGAS, 1909). Desta forma, o protozoário penetra pela microlesão. As formas

tripomastigotas metacíclicas conseguem infectar qualquer tipo celular nucleado (SOUZA *et al.*, 2010; WALKER *et al.*, 2013) e assim, diferenciam-se em amastigotas dentro da célula infectada. A partir de divisão binária, o parasito se multiplica e se diferencia em tripomastigota pouco antes de romper a célula. Ao ganhar a corrente sanguínea, as formas tripomastigotas sanguíneas migram para os tecidos, formando os ninhos de amastigotas e dando progressão a DC (BRENER, 1997).

A migração do *T. cruzi* para os tecidos está relacionada, principalmente, com o tipo de cepa envolvida na infecção. Embora a nomenclatura e classificação das cepas ainda seja um pouco confusa, marcadores genéticos, bioquímicos e biológicos são utilizados para a diferenciação entre elas (ZINGALES *et al.*, 2009). Atualmente existem seis grupos definidos, (TcI-TcVI) baseados nas unidades discretas de tipagem (“*discrete typing units*” – DTUs) (ZINGALES *et al.*, 2009). Um sétimo grupo ainda está em estudo para ser incluído (Tcbat). Além de características do parasito (parasitemia, ciclo etc), a classificação abrange também a predominância das cepas por regiões e por fases da doença desenvolvidas (ZINGALES *et al.*, 2012; 2018).

As cepas Colombiana e Y, isoladas de humanos, por exemplo, são classificadas como TcI e TcII, respectivamente (ZINGALES *et al.*, 2009). Cepas TcI são as mais dispersas, sendo que casos humanos são predominantemente encontrados na América Central e do Sul, geralmente associados com cardiopatia chagásica (ZINGALES *et al.*, 2012). As cepas TcII são encontradas, principalmente, nas regiões sul e central da América do Sul e estão relacionadas com o desenvolvimento de manifestações cardíacas, megaesôfago e megacólon nos indivíduos infectados (ZINGALES *et al.*, 2012).

Anteriormente aos DTUs, como uma tentativa de agrupar as cepas e os achados em infecções em modelos experimentais murinos, os biodemas também foram propostos (ANDRADE, 1974). Essa classificação baseava-se na avaliação de aspectos da interação parasito-murino, como parasitemia, morfologia, tropismo tecidual e lesões histopatológicas (ANDRADE, 1974). A cepa Y, uma das representantes do biodema I, foi classificada como crescimento *in vitro* rápido, alta parasitemia e mortalidade em camundongos com pico máximo entre 7 e 12 dias e reticulotrópica (ANDRADE; BRODKYNS; ANDRADE, 1983; DEVERA; FERNANDES; COURA, 2003).

## **1.2 Patogênese da doença de Chagas: Megacólon**

O megacólon é a forma gastrointestinal mais tardia da DC (DIAS, 1993). Na fase aguda da DC as manifestações intestinais são, de forma geral, discretas e até imperceptíveis (DIAS *et al.*, 2016), entretanto, apesar de raros, existem relatos de hemorragia e disfagia intestinal relacionados a formas diferentes de infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Na fase crônica, macroscopicamente, é possível observar alterações da forma intestinal através de exames radiológicos e clínicos (MENEGHELLI, 2004). Para ser classificado como megacólon chagásico, deve ser observado no trato gastrointestinal (TGI), o espessamento e aumento do lúmen do órgão associado com aperistalse (LOPES, CHAPADEIRO, 1997). Esses achados macroscópicos podem ser encontrados ao longo de todo o TGI, mais comumente localizados no esôfago e no cólon de humanos, sendo denominados de megaesôfago e megacólon, respectivamente.

É aceito que o estabelecimento da infecção por *T. cruzi* destrói as células nervosas do sistema nervoso entérico (SNE) levando a alteração da função e diminuição do trânsito intestinal e comprometimento do peristaltismo (MARTINS CAMPOS, TAFURI, 1973; REZENDE, 1984). A hiper-reatividade intestinal, a incoordenação motora, a acalasia esfínteriana e hipertrofia muscular também são alguns dos fenômenos encontrados que somados e relacionados à estase do bolo fecal no segmento intestinal, resultam na dilatação do órgão (GUILLÉN-PERNÍA *et al.*, 2001).

O SNE é dividido em dois plexos: mioentérico e submucoso. O primeiro é responsável, principalmente, pela regulação dos movimentos gastrointestinais e encontra-se entre as camadas musculares longitudinal e circular (FURNESS, 2012). O segundo localiza-se na submucosa e está relacionado à secreção gastrointestinal e fluxo sanguíneo (FURNESS, 2012). Ambos podem atuar também através de terminações nervosas de diferentes neurônios residentes que liberam neurotransmissores com atividades inibitória ou excitatória do sistema gastrointestinal (FURNESS, 2012). O plexo mioentérico é o mais afetado pelo processo inflamatório estabelecido pela infecção por *T. cruzi*, resultando na diminuição do número de células nervosas ou até destruição completa de gânglios nervosos (TAFURI, 1971a; ADAD *et al.*, 1991; 2001). As lesões originadas a partir da inflamação levam processos inflamatórios nos neurônios do sistema gastrointestinal (SOUZA *et al.*, 1996), como ganglionite, periganglionite, neurite e perineurite no plexo mioentérico (TAFURI; MARIA; LOPES, 1971b; ADAD *et al.*, 2001), os quais tem início logo na fase aguda e se prolongam e agravam durante a fase crônica (ANDRADE, ANDRADE, 1969). O processo inflamatório estabelecido,

geralmente possui distribuição focal. Entretanto, é possível observar neurônios íntegros próximos a neurônios lesionados (TAFURI, 1971a).

Na camada muscular, encontram-se focos de intensidade variável de miosite, com fibrose, degeneração e necrose fibrocelular (ADAD *et al.*, 1991). O processo inflamatório causado pela infecção e a compressão originada pelo bolo fecal, levam a mucosa à isquemia, seguida de degeneração, necrose e ulceração (TAFURI, 1971a). A ulceração da mucosa em conjunto com a destruição de plexos mioentérico (em maior grau) e submucoso (em menor grau) (DA SILVEIRA *et al.*, 2007b; JABARI *et al.*, 2014) e estruturas relacionadas leva a fibrose da submucosa (TAFURI, 1971).

O SNE é composto por subpopulações neuronais diferentes que são classificadas de acordo com os neuromediadores produzidos (FURNESS, 2012). Neurônios motores excitatórios produzem como principais a acetilcolina, substância P (SP) e a neurotaquicina A (COSTA, BROOKES, HENNING, 2000). Neurônios motores inibitórios estão relacionados com o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico (NO), por exemplo (COSTA, BROOKES, HENNING, 2000). Ambos os neurônios motores inervam as camadas musculares, glândulas e vasos sanguíneos (COSTA, BROOKES, HENNING, 2000). A homeostase dessas subpopulações neuronais é essencial para a funcionalidade intestinal, já que elas se comunicam com outros tipos de neurônios intestinais, como os neurônios intrínsecos aferentes primários, interneurônios e outras células intestinais (FURNESS, 2012).

Sabe-se que na DC existe uma destruição seletiva de neurônios, na qual o perfil das subpopulações diferencia-se em pacientes infectados com megacólon e megaesôfago e em pacientes sem megas (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; NASCIMENTO *et al.*, 2013; JABARI *et al.*, 2011; 2014). Para pacientes com megaesôfago, neurônios reativos para VIP e NO, caracterizados como inibitórios, estão preferencialmente diminuídos enquanto neurônios reativos para SP, excitatórios, predominam (NASCIMENTO *et al.*, 2013). No caso de megacólon chagásico, diferentemente do achado no megaesôfago, neurônios reativos para VIP, NO e VIP/NO predominam aos excitatórios (JABARI *et al.*, 2011; 2012). Contraditoriamente, estudos mais antigos demonstraram redução em subpopulações nitrérgicas em casos de megacólon (RIBEIRO *et al.*, 1998; DA SILVEIRA *et al.*, 2007c). Entretanto, seguindo JABARI *et al.*, (2011) existiam limitações nas metodologias empregadas.

A falta de material humano para a elucidação da fisiopatologia da DC diminui substancialmente o avanço da pesquisa nessa área (CAMPOS *et al.*, 2016). Como

alternativa, modelos experimentais foram propostos para estudos em diferentes áreas da DC, a maioria focado na fase aguda. Limitações como a alta taxa de mortalidade dependendo da cepa de *T. cruzi* e da concentração do inóculo dificultam a seleção de modelos murinos para a fase crônica (CAMPOS *et al.*, 2016).

A infecção experimental também causa diminuição de células nervosas em modelos experimentais murinos de fase aguda e fase crônica (MIRKIN *et al.*, 1997; MAIFRINO *et al.*, 1999; 2005; ARANTES *et al.*, 2004; CAETANO *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2011; 2013; VAZQUEZ *et al.*, 2015; MASSOCATTO *et al.*, 2017a; 2017b). Camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, apresentaram alterações na largura do cólon e da espessura da camada muscular, bem como aumento do infiltrado inflamatório no intestino, parasitismo tecidual, miosite, ganglionite e periganglionite ainda na fase aguda experimental (VAZQUEZ *et al.*, 2015).

Camundongos C57Bl/6 knockout para iNOS e IFN- $\gamma$  não apresentaram desnervação intestinal na fase aguda experimental independente da presença de infiltrado inflamatório (ARANTES *et al.*, 2004). Sugere-se que a liberação de NO induzida pela infecção no intestino esteja relacionada com a diminuição dos neurônios intestinais (ARANTES *et al.*, 2004). Na fase crônica experimental, camundongos *Swiss* infectados com cepa Y também demonstraram desestruturação da arquitetura do plexo mioentérico, diminuição de células nervosas, aumento da espessura do cólon, hipertrofia de células musculares, aumento da deposição de colágeno e presença de infiltrado inflamatório (CAMPOS *et al.*, 2016).

No início da infecção, o perfil Th1 é essencial para o controle do protozoário. Citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são produzidas primariamente e estão envolvidas com ativação de macrófagos microbicidas produtores de espécies reativas de oxigênio (CAMARGO *et al.*, 1997; BASSO, 2013). Uma resposta balanceada é essencial para que a infecção seja controlada e não resulte em dano tecidual excessivo. Dessa forma, IL-4 com expansão clonal de células Th2 e a presença de Tregs, com produção de IL-10 e TGF- $\beta$  são importantes frente a infecção pelo *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 1991; 1994; GUTIERREZ *et al.*, 2009a).

### **1.3 Proteína morfogenética óssea do tipo 2 – BMP2**

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), inclusas na família do TGF- $\beta$ , possuem funções pleiotrópicas (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004). Aproximadamente 20 BMPs já

foram descritas e podem estar envolvidas desde a embriogênese até a homeostase de células de órgãos adultos (GOLDSTEIN *et al.*, 2005; BRAGDON *et al.*, 2011; CHALAZONITIS *et al.*, 2011; KASHIMA; HATA, 2018; LOWERY; ROSEN, 2018; AMPUJA; KALLIONIEMI, 2018). Descritas inicialmente no mecanismo de formação óssea (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004), esse grupo de proteínas é dividido em pelo menos quatro subgrupos relacionados à similaridade de função e estrutura bioquímica (BRAGDON *et al.*, 2011).

Uma das primeiras a ser descrita, a BMP2 foi bastante estudada pela sua capacidade osteoindutiva (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004). Além disso, essa proteína está diretamente envolvida com a homeostase intestinal (MULLER *et al.*, 2014) e na organogênese do intestino, na renovação de células epiteliais e homeostase de neurônios no plexo mioentérico intestinal (PMI) (GOLDSTEIN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2014; MULLER *et al.*, 2014). Existe uma comunicação no PMI, no qual uma subpopulação específica de macrófagos da muscular (MM) secreta níveis basais de BMP2 para os neurônios dessa estrutura. Como resposta, os neurônios produzem o fator de manutenção de colônia de macrófagos (CSF-1) para regular essa subpopulação (LOCATI, 2014; ROBINETTE; COLONNA, 2014). Essa comunicação resulta na homeostase do trato gastrointestinal por regular a motilidade do órgão. Quando os MM são depletados, por exemplo, BMP2 não é produzida e a motilidade intestinal é prejudicada (MULLER *et al.*, 2014).

A secreção de BMP2 não é exclusiva dos macrófagos da camada muscular do plexo mioentérico, sendo que outras populações de macrófagos (DUBE *et al.*, 2017) e outros tipos celulares podem secretar essa proteína. A BMP2 está relacionada a diferenciação e no crescimento celular, apoptose, morfogênese tecidual, motilidade celular e renovação de células tronco embrionárias (BRAGDON *et al.*, 2011). Estudos demonstraram a importância das BMPs na migração e diferenciação celular para a formação do sistema nervoso entérico, como também na homeostase do tecido adulto (CHALAZONITIS *et al.*, 2004; 2008; 2011; 2012; GOLDSTEIN *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2007; CHALAZONITIS e KESSLER, 2012). Sabe-se que a ação da BMP2 nos neurônios entéricos *in vitro*, possui caráter concentração-dependente (CHALAZONITIS *et al.*, 2004). Isso quer dizer que concentrações diferentes dessa proteína modulam os neurônios entéricos de forma diferente. Durante a organogênese *in vitro*, baixa concentração de BMP2 aumenta o número de neurônios entéricos, enquanto alta concentração limita o número dessas células (CHALAZONITIS *et al.*, 2004).

A variação da expressão da proteína BMP2 pode ocorrer em doenças caracterizadas por distúrbios no sistema nervoso entérico. Em intestinos estenóticos de pacientes com a doença de Hirschsprung, por exemplo, a expressão da BMP2 é mais acentuada quando comparada com intestinos normais (WU *et al.*, 2014). Já em ratos com diabetes induzida, a expressão de BMP2 diminui, e só retorna a níveis normais com o tratamento de insulina (HONORÉ *et al.*, 2011). Mesmo a fisiopatologia das doenças citadas sendo diferentes, ambas estão relacionadas com inflamação, perda neuronal nos plexos intestinais, alteração da função peristáltica normal, hipertrofia e mudança na expressão da BMP2 (BLEUMING *et al.*, 2006; HONORÉ *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2014; MULLER *et al.*, 2014).

Diferentemente do que acontece para o intestino, a ação da BMP2 em processos de remodelamento e regeneração óssea é mais elucidada. Terapêuticas que envolvem o uso dessa proteína relatam a indução de inflamação no local de aplicação (NGUYEN *et al.*, 2017). Sendo que quanto maior as concentrações utilizadas, maior é o processo inflamatório estabelecido (LEE *et al.*, 2011a; 2012). Estudos *in vivo* e *in vitro* com modelos de patologias ósseas, observaram o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-18 e TNF- $\alpha$  em terapêuticas a base de BMP2, sugerindo seu perfil concentração-dependente pró-inflamatório (HORI *et al.*, 2006; ZARA *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011a; 2011b; LEE *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2013). Além da relação direta com o aumento da expressão de citocinas, IL-1b e IFN- $\gamma$  em células  $\beta$  pancreáticas e ilhotas de Langerhans de ratos e humanos, induzem o aumento na expressão de BMP2 (IBARRA URIZAR *et al.*, 2016). Esses achados podem sugerir uma importante função da BMP2 em processos inflamatórios.

Devido à falta de entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DC, especialmente aqueles relacionados as manifestações gastrointestinais, novos estudos são necessários. A partir da elucidação dos fatores que condicionam o desenvolvimento do quadro da doença, é possível buscar e estabelecer medidas terapêuticas que possibilitem uma melhor qualidade de vida para o paciente chagásico. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi correlacionar a expressão da BMP2 com a produção de citocinas e alterações histopatológicas intestinais originadas durante a infecção pelo *T. cruzi* aos 30 e 90 dias na doença de Chagas experimental.

## 2. JUSTIFICATIVA

---

Como a DC é de caráter incapacitante e prejudica a qualidade de vida dos doentes crônicos sintomáticos, é necessário buscar novas formas de terapia. Para isso, o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas principais complicações é de extrema importância. Dessa forma, estudar o papel de proteínas na infecção pelo *T. cruzi* pode auxiliar a elucidação de mecanismos que auxiliem no desenvolvimento de novos tratamentos. Fisiologicamente, a BMP2 tem função na homeostase dos neurônios entéricos e manutenção do peristaltismo através da secreção mediada pelos macrófagos da muscular do intestino. Diante disso, estudar o papel desta proteína é interessante, visto que até o momento, não existem estudos que demonstrem seu papel na infecção por *T. cruzi*.

Acreditamos que o estabelecimento do papel do BMP2 na DC é fundamental para ampliar o conhecimento acerca das complicações do trato gastrointestinal. Sabe-se que variação da expressão de BMP2 está relacionada com processos inflamatórios e distúrbios no sistema nervoso entérico. Considerando que os fatores que alteram a expressão de BMP2 estão presentes na infecção frente ao *T. cruzi* justifica-se estudar esta proteína na infecção experimental.

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1 Geral

Avaliar a produção de BMP2 e correlacionar com a produção de citocinas e alterações histopatológicas no intestino de camundongos C57Bl/6 aos 30 e 90 dias de infecção com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar peso, parasitemia e sobrevida de animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção;
- Avaliar infiltrado inflamatório no intestino de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção;
- Quantificar neurônios do plexo mioentérico de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção;
- Avaliar a deposição de colágeno no intestino de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção;
- Quantificar a expressão de BMP2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 em camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção;
- Correlacionar a concentração de citocinas com a concentração de BMP2 no intestino de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*;
- Correlacionar a quantidade de neurônios do plexo mioentérico com a concentração de BMP2 e de IFN- $\gamma$  no intestino de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

## 4. MÉTODOS

---

### 4.1 Animais

No presente trabalho, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6, com 6 a 8 semanas de idade, infectados ou não com a cepa Y de *T. cruzi*. A divisão dos grupos foi feita da seguinte forma: camundongos infectados com cepa Y com 30 dias e 90 dias de infecção e dois grupos controles sem infecção, mantidos por 30 e 90 dias.

Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) em condições controladas e conhecidas: em gaiolas plásticas de 414 mm x 168 mm, temperatura entre 20 e 25°C, umidade entre 45 e 55%, com renovação constante de ar e fotoperíodo de 12h. Foram alimentados com ração de composição conhecida (Nuvilab-CR1, NUVITAL, Brasil) e a água oferecida *ad libitum*. Todos os componentes da gaiola, como água, maravalha para forragem e ração foram autoclavadas antes do uso e exposição aos animais. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás e foi aprovado sob identificação 051/19 (Anexo 1).

### 4.2 Infecção e eutanásia dos animais

Quatro grupos experimentais fizeram parte de todo o estudo, sendo que dois grupos foram infectados e dois não. Dos dois grupos infectados, um foi infectado com a cepa Y por 30 dias e o outro por 90. Os grupos controles também seguiram com as mesmas durações de tempo experimental, seguidos de eutanásia após esses dias (Quadro 1).

**Quadro 1** – Levantamento do número de grupos, tipo de cepa utilizada para a infecção, dias de manutenção de cada experimento e o número de animais utilizados.

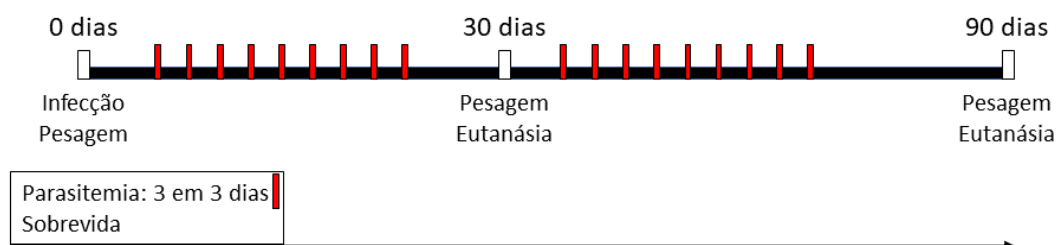
Grupo	Infectado/Controle	Cepa	Dias de infecção/manutenção	Número de animais
1	Controle não infectado	-	30	5
2	Controle não infectado	-	90	7
3	Infectado	Y	30	6
4	Infectado	Y	90	10

Tripomastigotas sanguíneos mantidos em camundongos Balb/c foram inoculados nos camundongos destinados para o experimento. Para o ajuste da concentração a ser inoculada via subcutânea (1000 tripomastigotas sanguíneas/mL), os parasitas foram contados em 50 campos num volume de 5  $\mu$ L de sangue entre lâmina e lamínula (BRENER, 1962).

A eutanásia foi realizada aos 30 e 90 dias de infecção para os grupos infectados e para os grupos não infectados. Realizada através de deslocamento cervical (após confirmação do estado anestésico, induzido por solução anestésica a 5% de cloridrato de xilazina e 10% de quetamina, intraperitoneal), seguido de coleta de sangue arterial e necropsia por incisão dorsolateral. Intestinos foram coletados para estudos posteriores. As vísceras restantes também foram coletadas e armazenadas em -80 °C para futuras análises.

#### 4.3 Acompanhamento da parasitemia, peso corporal e sobrevida

A parasitemia dos camundongos infectados foi realizada até que não fossem mais encontrados tripomastigotas sanguíneas circulantes. Através da veia caudal, 5  $\mu$ L de sangue foram retirados dos camundongos para avaliação do nível de parasitemia. Sob lâmina e lamínula, os parasitos foram contados em 50 campos aleatórios em microscópio de luz comum com aumento de 400x (BRENER, 1962). Essa observação foi feita a cada 3 dias após a primeira detecção de parasitos no sangue dos animais. O resultado da parasitemia foi normalizado pela área da lâmina e área observada no microscópio de acordo com o aumento utilizado (ARAÚJO-JORGE, 2000). O peso dos animais foi anotado no dia do inóculo (dia 0) e no dia da eutanásia (dia 30 e dia 90 pós infecção). Além disso, diariamente os camundongos foram observados para acompanhamento da sobrevida (Figura 1).



**Figura 1** - Esquema do delineamento experimental do estudo.

#### **4.4 Processamento dos órgãos**

Após a eutanásia dos grupos não infectados e infectados com 30 ou 90 dias de infecção, dois fragmentos do intestino grosso foram coletados (distal e proximal). O fragmento distal intestinal retirado, foi lavado em PBS 1x, colocado em papel filtro e fixado em paraformaldeído 4%, por no máximo 48 horas. Em seguida foram transferidos a uma série crescente de álcoois etílicos para desidratação, seguida de diafanização em xilol e inclusão em parafina. O fragmento foi posicionado em eixo longitudinal perpendicular ao plano de microtomia, para obtenção de cortes transversais. Cortes seriados com 5 µm de espessura e 25 µm de distância entre cada corte, foram realizados e estes, aderidos às lâminas com o adesivo polilisina e submetidos à secagem. Em seguida foram realizadas as colorações de rotina específicas cada avaliação do trabalho: hematoxilina e eosina (HE), Giemsa e picrossírius.

#### **4.5 Quantificação do infiltrado inflamatório**

Lâminas coradas por HE foram utilizadas para a análise do infiltrado inflamatório. A partir de microscópio de luz comum acoplado a câmera, 10 fotos de três fragmentos seriados (100µm de distância entre eles) foram capturadas sob aumento de 400x para posterior análise. A intensidade do processo inflamatório foi avaliada nas camadas submucosa e muscular e classificada em 0 (normal), 1 (discreto), 2 (moderado) e 3 (acentuado). Após a categorização das fotos, a média de cada caso obtida foi classificada conforme o seguinte escore: 0–0.3 = normal; 0.4–1.0 = discreto; 1.1–2 = moderado; 2.1–3 = acentuado (adaptado de WESLEY *et al.*, 2019).

#### **4.6 Contagem de neurônios do plexo mioentérico**

Lâminas coradas por Giemsa foram utilizadas para quantificação de neurônios. Quatro cortes seriados com distância de 100 µm entre cada um foram avaliados sob microscopia de luz comum em aumento de 400x. Essa distância foi selecionada para que fosse analisada uma maior área. Os neurônios foram contados em 30 campos aleatórios em aumento de 400x em cada corte, totalizando 120 campos por animal. O resultado foi dado por quantidade de neurônios/campo. (adaptado de CAETANO *et al.*, 2008).

#### 4.7 Quantificação de tecido conjuntivo fibroso

Lâminas coradas por picrossírius e contra-coradas por hematoxilina foram utilizadas para avaliação morfológica de deposição de tecido conjuntivo na mucosa, submucosa e camadas musculares intestinais, com exceção da camada serosa. As análises foram feitas em microscópio sob luz polarizada e a quantificação por meio do *software Axion vision (ZEISS)*. Para cada fragmento intestinal foram analisados 20 campos em aumento de 400x. Os resultados foram expressos em % de colágeno.

#### 4.8 Obtenção do homogenato do intestino e do baço

O fragmento proximal foi pesado e transferido para tubo *Eppendorf* com solução de PBS 1x previamente identificado, juntamente com inibidor de proteases *Complete™* (SIGMA, EUA). O mesmo foi feito para o baço, sendo que o órgão foi dividido longitudinalmente em dois. Um fragmento foi armazenado em -80° C para análises futuras e o outro para obtenção do homogenato. Em seguida, os fragmentos foram submetidos ao homogeneizador. Homogenatos obtidos foram centrifugados a 12000xG, por 30 minutos e o sobrenadante respectivo, armazenado a -80°C para quantificação de BMP2, citocinas e proteínas totais.

#### 4.9 Quantificação de BMP2 e citocinas

A avaliação de níveis de BMP2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 nos homogenatos obtidos do intestino e do baço foram feitas através do ensaio imunoenzimático (ELISA). Para BMP2 foi utilizado o kit comercial *PEPROTECH* (Lot# 0614T255). Para IFN- $\gamma$  (Lot# P209723) e TNF- $\alpha$  (Lot# P210424) o kit utilizado foi da *R&D System*. Enquanto, para IL-10, o *BD OptEIA™* (Lot# 9164829). A metodologia foi realizada conforme as indicações dos fabricantes. Para reação colorimétrica, foi utilizado 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (*BD Pharmingen, EUA*) como substrato de peroxidase e a leitura feita em filtro de 450 nm em leitor de microplaca (*BIORAD 2550 READER EIA, EUA*). Foi utilizado a concentração de proteínas totais no homogenato intestinal obtida em nanodrop e do baço para normalização da concentração de BMP2 e das citocinas. A concentração final foi dada em pg/mg.

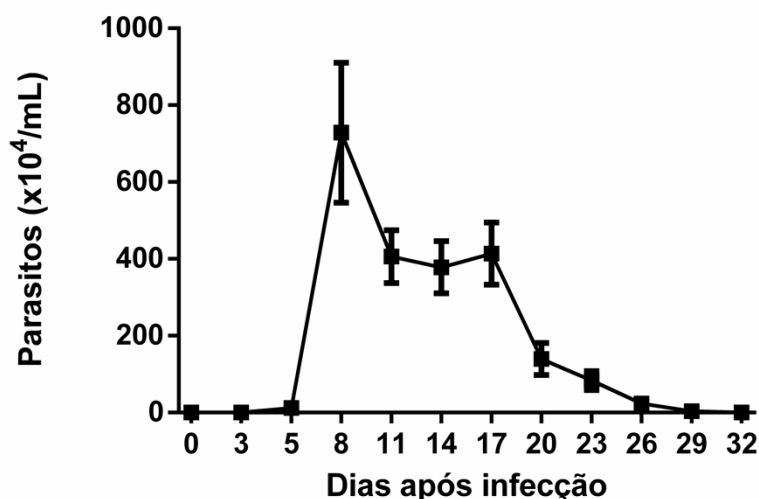
#### **4.10 Análise Estatística**

O banco de dados foi feito no programa EXCEL 2016 e as análises estatísticas executadas no GRAPHPAD PRISM 6.0 (GRAPHPAD SOFTWARE – EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste “t” não pareado para os dados com distribuição normal e teste de Mann-Whitney para os dados com distribuição não normal. Resultados como peso dos animais foram analisados a partir do teste de Two-way ANOVA. A sobrevivência foi analisada pelo teste de Log-Rank. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . As correlações foram feitas a partir do teste de Spearman com intervalo de confiança de 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 A cepa Y apresenta parasitemia de evolução rápida

Com o intuito de avaliar o comportamento da cepa Y de *T. cruzi* em camundongos C57Bl/6 infectados, fez-se a parasitemia a cada três dias após a primeira detecção de formas circulantes. A análise foi feita até que as formas tripomastigotas sanguíneas circulantes não fossem mais encontradas. A cepa Y apresentou um padrão rápido de parasitemia, com início de circulação de formas tripomastigotas sanguíneas a partir do 5º dia pós infecção e fim ao 32º dia. O pico da parasitemia foi observado aos 7 dias de infecção (Fig. 2).

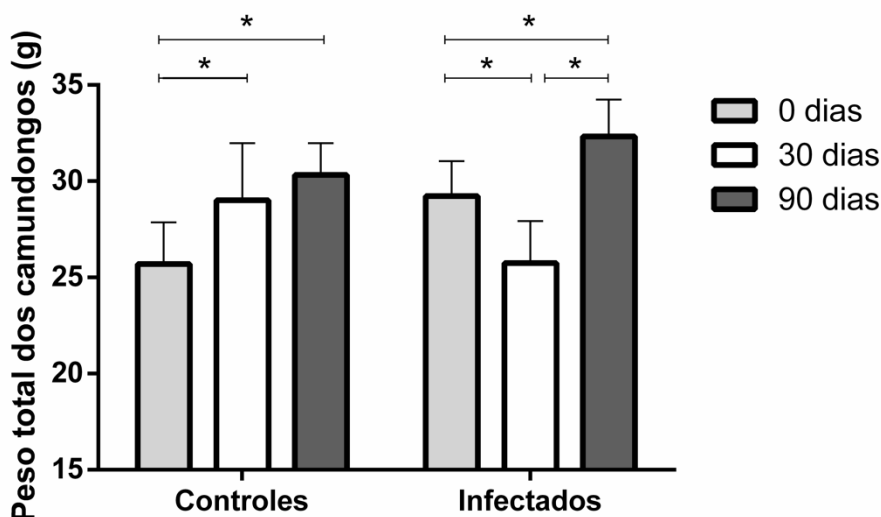


**Figura 2** – Parasitemia de camundongos C57Bl/6 infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas por via subcutânea com cepas Y de *Trypanosoma cruzi*. A parasitemia foi determinada por meio da contagem do número de tripomastigotas sanguíneas em 5 µl de sangue coletado da veia caudal. Os valores da parasitemia foram corrigidos de acordo com o fator de correção baseado na área da lâmina, do campo observado e do aumento utilizado no microscópio.

### 5.2 A infecção pela cepa Y induz perda de peso

Haja vista o padrão de parasitemia foi de evolução e desaparecimento rápido na infecção experimental, perguntou-se o peso dos animais teria sido alterado. Os animais foram pesados no dia da infecção (0 dia) e aos 30 e 90 dias de infecção. No grupo controle os animais ganharam peso significativamente aos 30 ( $p \leq 0,005$ ) e 90 dias ( $p \leq 0,005$ ). Camundongos infectados pela cepa Y apresentaram redução significativa de peso aos 30 dias de infecção quando comparados ao dia de infecção (dia 0) ( $p \leq 0,005$ ). Aos 90 dias, camundongos infectados com essa mesma cepa ganharam peso significativamente

quando comparado com o dia 0 e com o dia 30 ( $p \leq 0,005$ ). Logo, mesmo que a infecção com a cepa Y cause perda de peso aos 30 dias, os animais voltam a ganhar peso com o passar do tempo (Fig. 3).



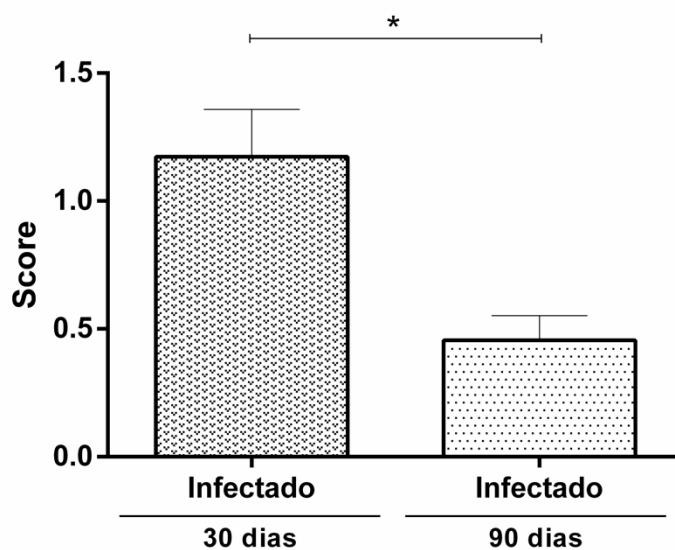
**Figura 3** – Peso corporal (g) de camundongos C57Bl/6 controles e infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas por via subcutânea com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As análises foram feitas aos 0, 30 e 90 dias de infecção. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, considerando  $p < 0,05$ , as barras representam a média e as linhas verticais representam o desvio padrão.

### 5.3 A infecção com a cepa Y não diminui a sobrevivência dos animais

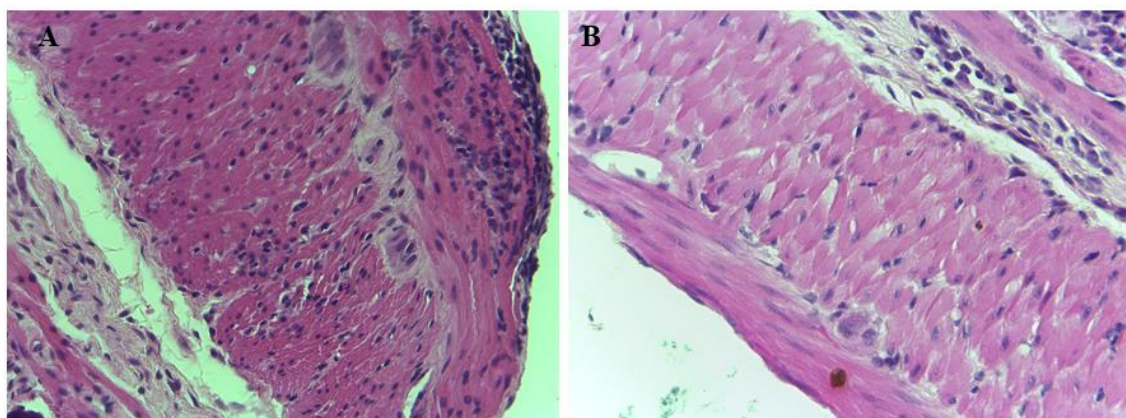
A taxa de sobrevivência dos animais infectados com cepa Y de *T. cruzi* foi avaliada durante 90 dias. Os animais infectados com 1000 formas tripomastigotas de cepa Y apresentaram uma taxa de 100% de sobrevivência aos 90 dias de infecção (10/10 animais).

### 5.4 Animais com 30 dias de infecção apresentam infiltrado inflamatório mais intenso

Para a confirmação do modelo experimental utilizado para o intestino, foi perguntado se existiam lesões intestinais nos camundongos. O primeiro passo foi avaliar o processo inflamatório no órgão. O infiltrado inflamatório encontrado no intestino dos animais com 30 dias de infecção foi mais intenso que o encontrado no grupo com 90 dias ( $p=0,0043$ ) (Fig. 4). A maior parte dos animais com 30 dias de infecção demonstrou processo inflamatório moderado (80%) (score: 1.1-1.5), enquanto que aos 90 dias o processo inflamatório decaiu e todos os animais desse grupo demonstraram infiltrado discreto (100%) (score: 0.3-0.6) (Fig. 4).



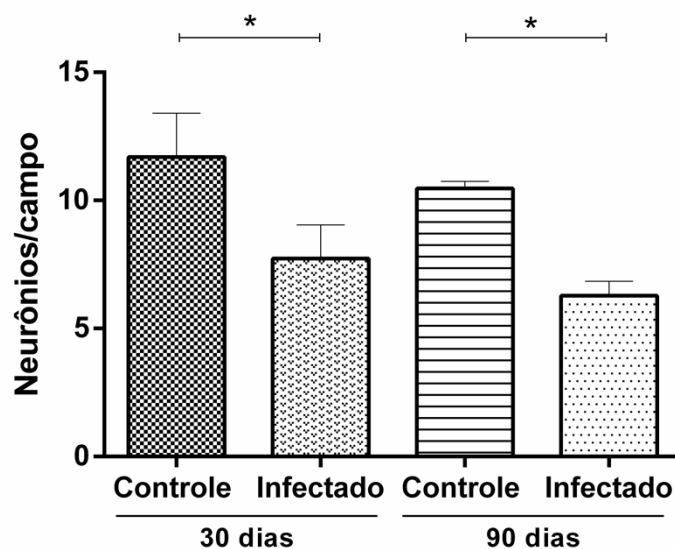
**Figura 4** – Intensidade do infiltrado inflamatório intestinal de camundongos C57Bl/6 aos 30 e 90 dias de infecção com 1000 formas de tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. A análise foi feita seguindo os seguintes parâmetros de score: 0–0.3 = normal; 0.4–1.0 = discreto; 1.1–2 = moderado; 2.1–3 = acentuado. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .



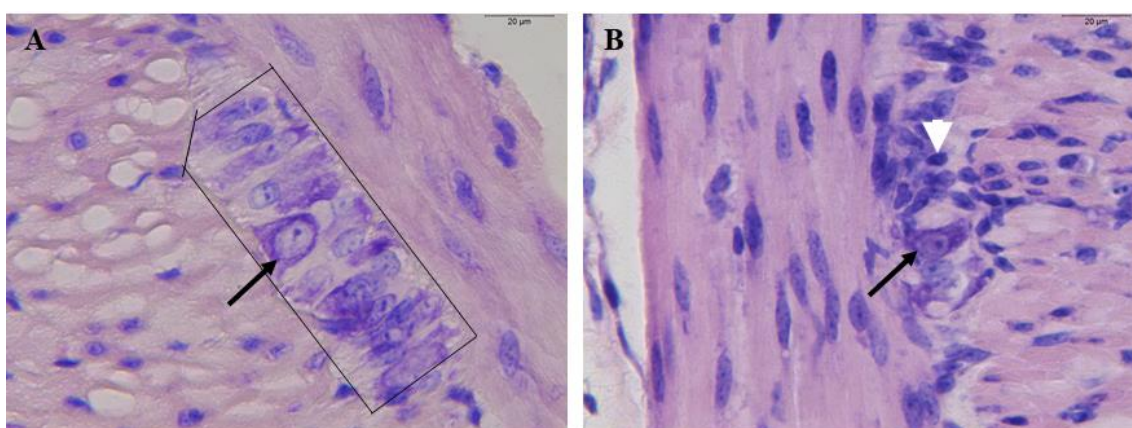
**Prancha 1** – Intensidade de infiltrado inflamatório de intestino de camundongos C57Bl/6 infectados aos 30 (A) e 90 dias (B) de infecção com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina e documentadas em microscópio de luz comum sob aumento de 400x. Três cortes seriados (100  $\mu$ m de distância) foram incluídos na análise. Para a avaliação semiquantitativa, 10 fotos aleatórias (n=30) de cada corte foram documentadas e categorizada de acordo com o score: 0–0.3 = normal; 0.4–1.0 = discreto; 1.1–2 = moderado; 2.1–3 = acentuado.

### 5.5 Trinta dias de infecção são determinantes para a diminuição de neurônios no plexo mioentérico

A partir da contagem de neurônios no plexo mioentérico, observou-se que houve diminuição significativa da quantidade dessas células ao longo da infecção experimental. Tanto com 30 dias ( $p=0,0043$ ) quanto aos 90 ( $p=0,0043$ ), a infecção induziu diminuição neuronal quando comparado aos grupos não infectados (Fig. 5).



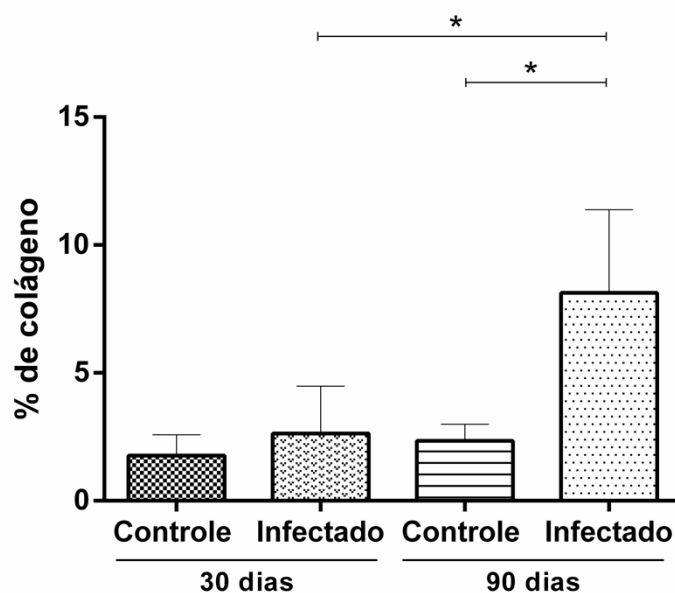
**Figura 5** – Número de neurônios por campo no plexo mioentérico de camundongos C57Bl/6 não infectados e infectados pelas cepas Y de *Trypanosoma cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção. Os fragmentos intestinais foram corados por Giemsa e observados em microscópio de luz comum sob aumento de 400x para contagem dos neurônios. O total de 120 campos foram analisados para cada camundongo em 4 fragmentos intestinais seriados. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .



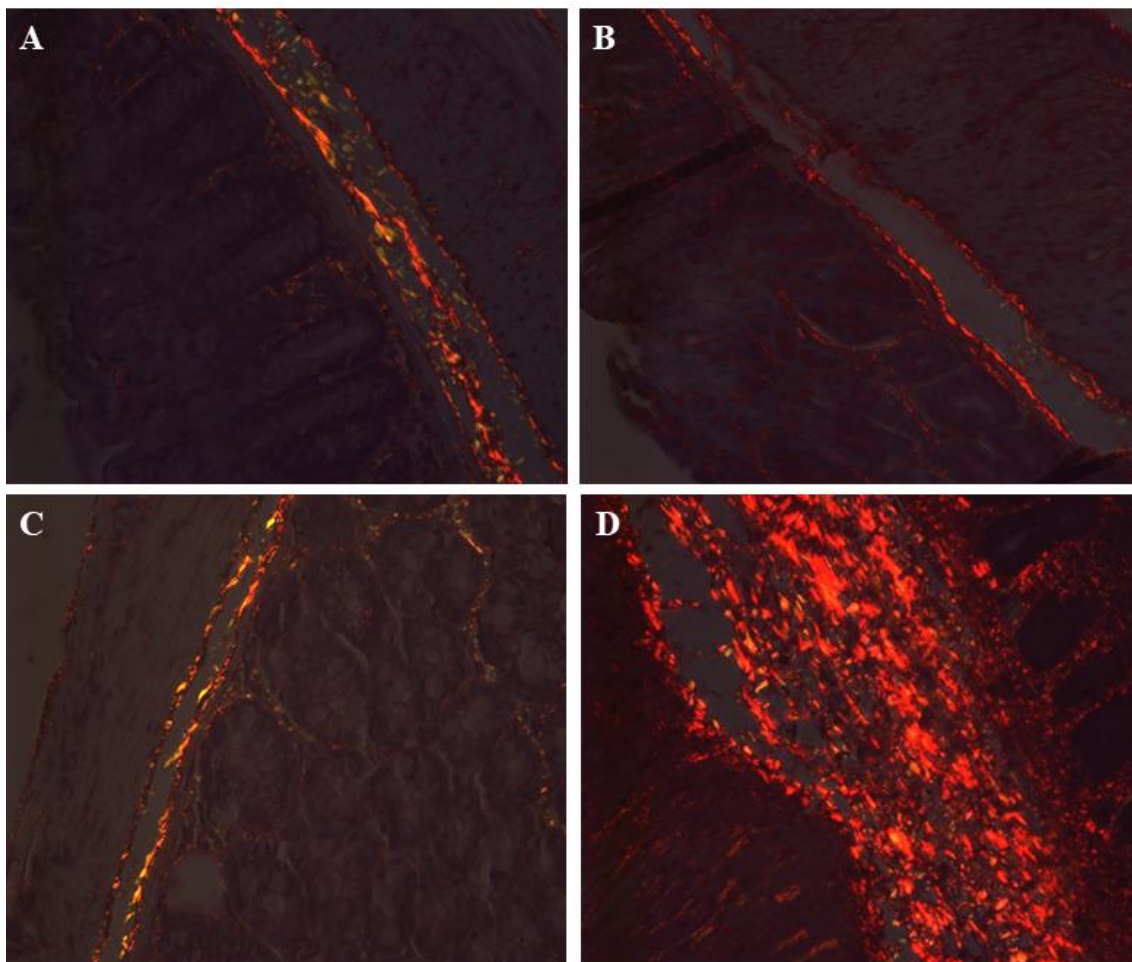
**Prancha 2** – Fotomicrografia do intestino de camundongos C57Bl/6 não infectados com 30 dias (A) e infectados com 30 dias (B) com 1000 formas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Neurônios do plexo mioentérico estão destacados dentro de linhas pretas e destacados pela seta preta. A seta branca (B) representa infiltrado inflamatório próximo aos neurônios no grupo infectado com 30 dias. Quatro cortes seriados com distância de 100 µm entre cada um foram avaliados sob microscopia de luz comum em aumento de 400x. Essa distância foi selecionada para que fosse analisada uma maior área. Os neurônios foram contados em 30 campos aleatórios em cada corte, totalizando 120 campos por animal. Coloração utilizada foi Giemsa.

### 5.6 A cepa Y induz deposição de colágeno após 90 dias de infecção

A infecção estabelecida por cepa Y induz aumento significativo de deposição de colágeno aos 90 dias de infecção quando comparado com o grupo controle ( $p= 0,0001$ ) e com o grupo infectado por 30 dias ( $p= 0,0017$ ) (Fig. 6).



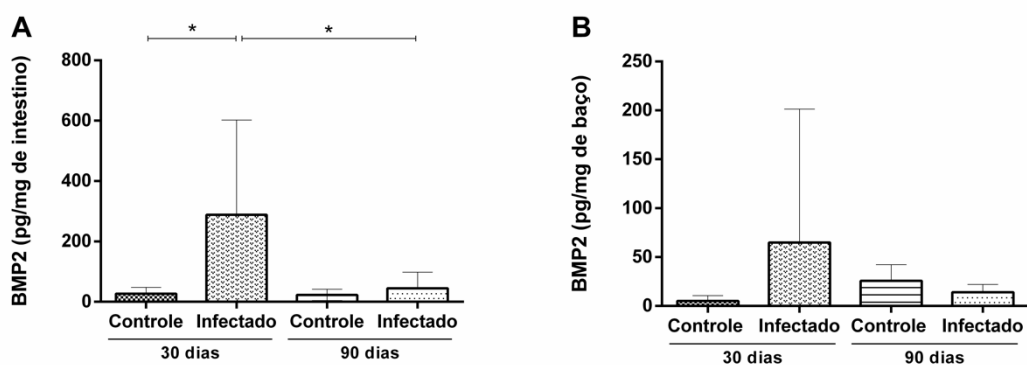
**Figura 6** – Percentual de colágeno depositado no intestino de camundongos C57Bl/6 não infectados ou infectados pelas cepas Y de *Trypanosoma cruzi* aos 30 e 90 dias de infecção. Campos aleatórios ( $n=20$ ) do intestino foram avaliados em microscópios sob luz polarizada em aumento de 400x. A quantificação foi obtida por meio do software *Axion vision (ZEISS)*. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p<0,05$ .



**Prancha 3** – Percentual de colágeno no intestino de camundongos C57Bl/6 não infectados com 30 (A) e 90 dias (B) e infectados com 30 (C) e 90 dias (D) com 1000 formas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. A análise do colágeno foi realizada por meio da captura de 20 campos aleatórios das camadas mucosa, submucosa e muscular sob aumento de 400x e a quantificação foi executada a partir do programa Axion vision (ZEISS). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p > 0,05$ .

### 5.7 A cepa Y induz o aumento de BMP2 aos 30 dias de infecção no intestino

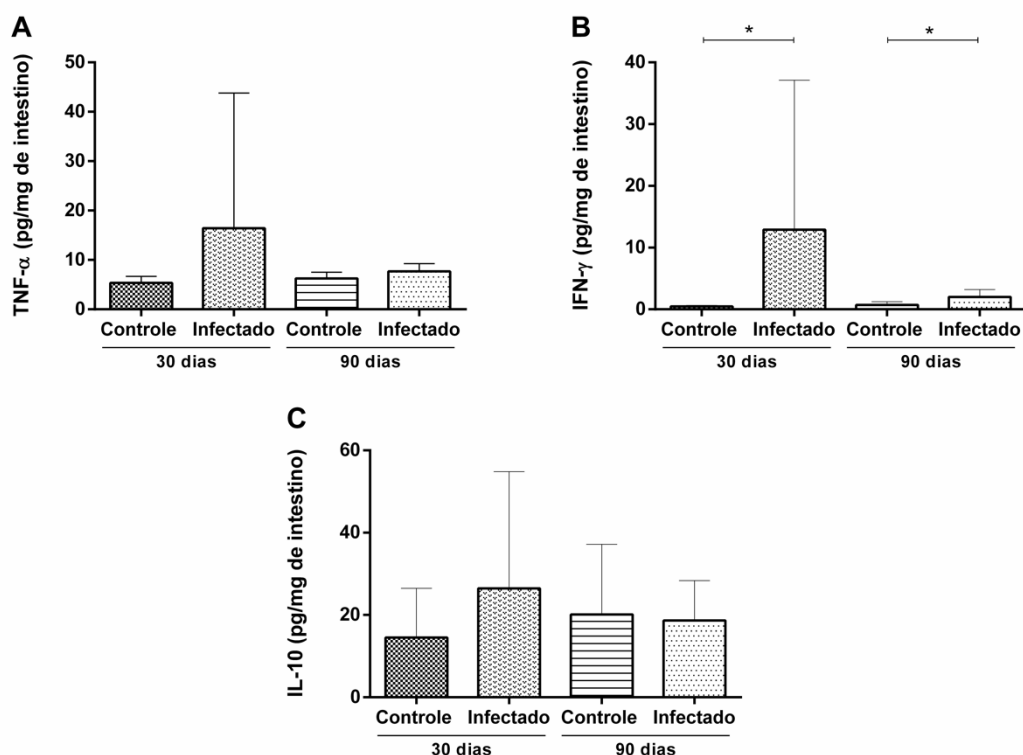
Confirmado o modelo experimental e as alterações hispatológicas, objetivou-se avaliar a produção de BMP2 frente a infecção tanto no intestino quanto no baço. A infecção estabelecida pela cepa Y induziu aumento significativo de BMP2 aos 30 dias de infecção, quando comparado com o controle ( $p=0,0303$ ) (Fig. 7A). Além disso, o aumento não se manteve e decaiu ao longo da infecção, tornando-se basal aos 90 dias de infecção por essa cepa ( $p=0,0420$ ) (Fig. 6A). Haja vista a resposta *in situ*, o próximo passo foi analisar a produção de BMP2 no baço. Na infecção com a cepa Y, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos infectados e seus respectivos controles (Fig. 7B).



**Figura 7** – Quantificação de BMP2 em picogramas/mg de intestino (A) e baço (B) de camundongos C57Bl/6 não infectados ou infectados com 1000 formas de tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As dosagens foram feitas aos 30 e 90 dias de infecção através da técnica de ELISA. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 5.8 A cepa Y induz o aumento de IFN- $\gamma$ aos 30 dias de infecção no intestino

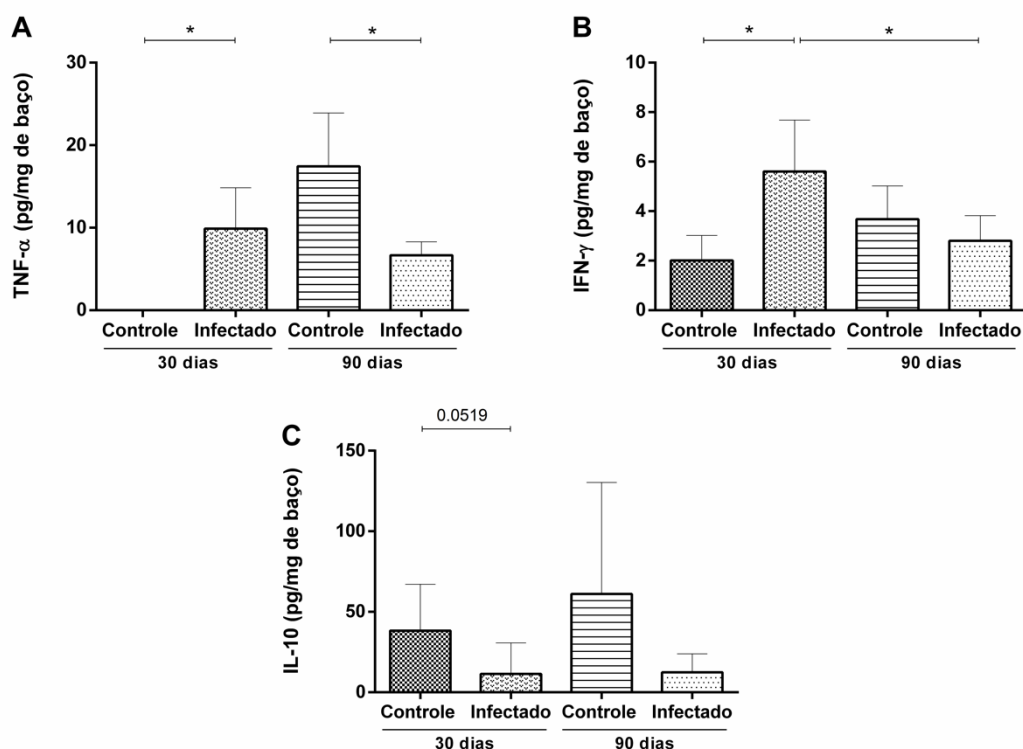
Com intuito de correlacionar a resposta imunológica com a produção de BMP2, citocinas pró-inflamatórias foram dosadas em ambos os tempos experimentais. Nenhuma diferença estatística foi encontrada na produção de TNF- $\alpha$  aos 30 e 90 dias de infecção com cepa Y no intestino (Fig. 8A). Para o IFN- $\gamma$  (Fig. 8B), a infecção induziu aumento na produção da citocina aos 30 dias de infecção ( $p=0,0043$ ) e aos 90 dias ( $p=0,0185$ ) quando comparado a seus respectivos controles. O próximo passo foi avaliar a produção da citocina reguladora IL-10. Nenhuma diferença estatística foi observada na produção de IL-10 intestinal após infecção (Fig. 8C).



**Figura 8** – Quantificação de TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) e IL-10 (C) em picogramas/mg de intestino de camundongos C57Bl/6 não infectados ou infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As dosagens foram feitas aos 30 e 90 dias de infecção por meio da técnica de ELISA. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 5.9 A cepa Y induz o aumento de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ no baço aos 30 dias de infecção no baço

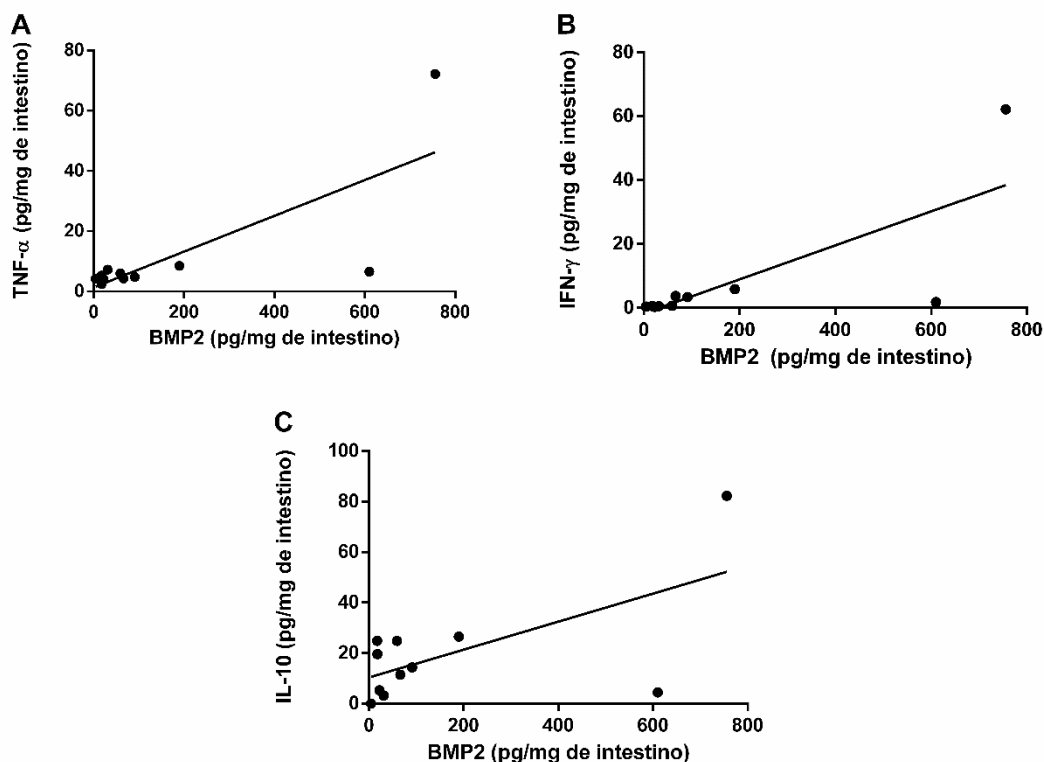
Visto a resposta inflamatória *in situ* no intestino, buscou-se entender melhor o perfil de ativação sistêmica que a cepa induz nos camundongos C57Bl/6 infectados aos 30 e 90 dias. Para o TNF- $\alpha$  (Fig. 9A), a cepa Y induziu o aumento na produção dessa citocina aos 30 dias de infecção quando comparado com o controle não infectado ( $p=0,0043$ ). Em relação ao IFN- $\gamma$  (Fig. 9B), a infecção induziu aumento aos 30 dias de infecção quando comparado ao grupo controle sem infecção ( $p=0,0087$ ). Além disso, foi observado que aos 90 dias houve uma queda nos níveis dessa citocina no baço de camundongos infectados ( $p=0,0029$ ). Não foi observado diferença estatística em nenhum momento da infecção por cepa Y na produção de IL-10 nesse órgão. Entretanto, notou-se uma tendência que resulta na diminuição da produção de IL-10 aos 30 dias de infecção com essa cepa, quando comparado com o respectivo controle ( $p=0,0519$ ) (Fig. 9C).



**Figura 9** – Quantificação de TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) e IL-10 (C) em picogramas/mg de baço de camundongos C57Bl/6 não infectados ou infectados com 1000 formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As dosagens foram feitas aos 30 e 90 dias de infecção por meio da técnica de ELISA. \*Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 5.10 O aumento de BMP2 pode estar relacionado com a manutenção do perfil pró-inflamatório com 30 dias de infecção

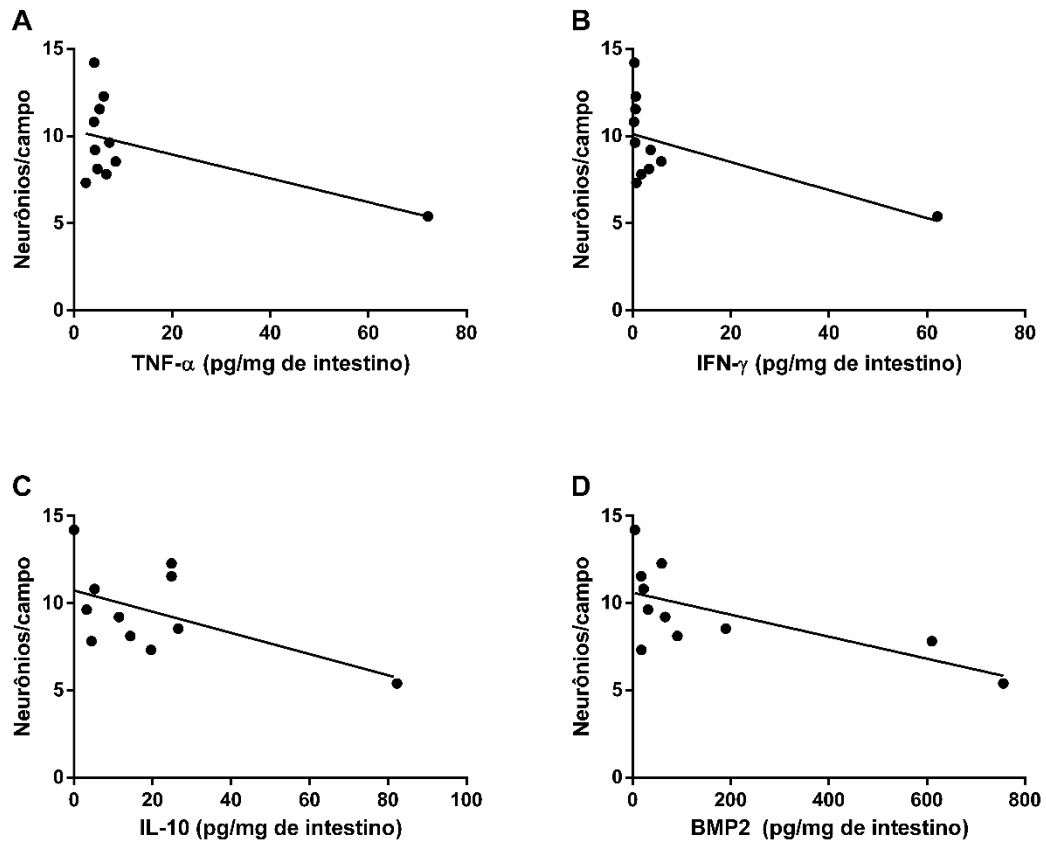
Visto que com 30 dias de infecção observou-se aumento de BMP2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , foi perguntado se o aumento dessas proteínas poderia estar correlacionado. As correlações entre BMP2 e TNF- $\alpha$  (Fig. 10A) e BMP2 e IFN- $\gamma$  (Fig. 10B) mostraram-se significativas e positivas ( $p = 0,0226$ ,  $r = 0,6909$  e  $p = 0,0039$  e  $r = 0,8091$  respectivamente). Enquanto para a citocina regulatória IL-10 (Fig. 10C), a correlação não foi significativa ( $p = 0,2030$  e  $r = 0,4182$ ). Dessa forma, é possível sugerir que o aumento de BMP2 pode ser fruto do aumento de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .



**Figura 10** – Correlação entre a concentração de TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B) e IL-10 (C) com a concentração de BMP2 em picogramas/mg de intestino. Dados provenientes de camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* aos 30 dias de infecção. Correlação pelo teste de Spearman. Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 5.11 O aumento de BMP2 e IFN- $\gamma$ pode estar relacionado com a diminuição de neurônios do plexo mioentérico

Para avaliar se existe alguma relação entre o aumento das citocinas e a diminuição dos neurônios no plexo mioentérico, foi realizada a correlação entre a quantidade dessas células e a concentração de TNF- $\alpha$  (Fig. 11A), IFN- $\gamma$  (Fig. 11B), IL-10 (Fig. 11C) e BMP2 (Fig. 11D). Correlações significativas e negativas foram observadas entre a quantidade de neurônios e a concentração intestinal de IFN- $\gamma$  e BMP2 respectivamente ( $p = 0,0162$ ,  $r = -0,7182$  e  $p = 0,0277$ ,  $r = -0,6727$ ). Entre TNF- $\alpha$  e IL-10 não foi observada nenhuma correlação significativa ( $p = 0,4348$ ,  $r = -0,2636$  e  $p = 0,2862$ ,  $r = -0,3545$ ). Visto isso, é possível observar que o aumento de BMP2 e IFN- $\gamma$  podem participar do processo de lesão neuronal intestinal.



**Figura 11** – Correlação entre a quantidade de neurônios por campo com a concentração de TNF- $\alpha$  (A), IFN- $\gamma$  (B), IL-10 (C) e BMP2 (D) em picogramas/mg de intestino. Dados provenientes de camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* aos 30 dias de infecção. Correlação pelo teste de Spearman. Diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

---

Esse estudo teve como objetivo demonstrar a produção de BMP2 no intestino e baço de camundongos C57Bl/6 frente a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*, bem como correlacionar esta produção com parâmetros relacionados a imunopatogênese da infecção.

Nossos resultados demonstram que a cepa Y induz a produção de BMP2 de forma diferente nos grupos experimentais de infecção. A infecção pela cepa Y induziu um aumento significativo de BMP2 aos 30 dias de infecção no intestino. Como primeiro relato da alteração da produção de BMP2 em uma doença parasitária, é possível que exista uma relação entre desbalanço dos níveis dessa proteína com a fisiopatologia da DC intestinal.

A cepa utilizada nesse estudo corresponde a mais bem estabelecida da literatura. A cepa Y representa a DTU II (ZINGALES *et al.*, 2009) que possui perfil mais doméstico e está intimamente relacionada com desenvolvimento da forma crônica da DC na América do Sul (ZINGALES *et al.*, 2012). Já é bem estabelecido que a parasitemia da cepa Y em animais experimentais ocorre de forma rápida e nos primeiros dias após infecção (VAZQUEZ *et al.*, 2015), como foi observado em nosso estudo.

Tanto em modelos experimentais (MACHADO *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2011, 2013; CAMPOS *et al.*, 2016; MASSOCATTO *et al.*, 2017a, 2017b) quanto em humanos (ADAD *et al.*, 2001; DA SILVEIRA *et al.*, 2005; 2007b), sabe-se que a infecção por *T. cruzi* diminui significativamente a quantidade de células nervosas no plexo mioentérico e que a fase aguda tem papel determinante nesse quadro (ADAD *et al.*, 2001). Esses dados corroboram com o nosso modelo experimental, no qual também foi observado diminuição de neurônios no plexo mioentérico aos 30 dias e 90 dias de infecção.

Arantes *et al.*, (2004), ao utilizarem camundongos C57Bl/6 knockout para iNOS e IFN- $\gamma$  infectados com 100 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y, demonstrou que a ausência de NO foi determinante para a sobrevivência neuronal após 10 dias de infecção. A falha na indução da produção de NO via IFN- $\gamma$  impediu a desnervação no modelo de fase aguda experimental (ARANTES *et al.*, 2004). Nosso estudo demonstrou correlações positivas entre o aumento de IFN- $\gamma$  com a diminuição da quantidade de

neurônios, o que está de acordo com a literatura, já que essa citocina induz NO (SANTOS-LIMA *et al.*, 1997; TALVANI *et al.*, 2000).

Sabe-se que a infecção por *T. cruzi* induz produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que aumentam a expressão de iNOS e, conseqüentemente aumentam os níveis de NO produzidos por macrófagos tripanocidas (SANTOS-LIMA *et al.*, 1997; TALVANI *et al.*, 2000). Em nosso estudo foi observado aumento significativo de IFN- $\gamma$  no intestino e no baço aos 30 dias de infecção com a cepa Y. O IFN- $\gamma$  é essencial para o controle inicial da infecção por *T. cruzi*, já que está envolvido na manutenção do perfil Th1/pró-inflamatório, inibição da multiplicação de formas amastigotas (CARDILLO *et al.*, 1996) e resistência a infecção. Entretanto, também representa um dos mecanismos de destruição neuronal (ARANTES *et al.*, 2004). Foi observado também uma queda significativa do IFN- $\gamma$  aos 90 dias de infecção, o que indica importante papel dessa citocina no início da infecção.

Embora nenhuma diferença estatística tenha sido encontrada na produção de TNF- $\alpha$  no intestino, no baço a infecção estabelecida induziu aumento significativo aos 30 dias, como esperado. Sinergicamente com o IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$  ativa macrófagos com perfil microbicida e resulta em destruição de formas intracelulares do parasito e dessa forma atua no controle da infecção (SANTOS-LIMA *et al.*, 1997; TALVANI *et al.*, 2000). Além disso, em níveis sistêmico, acredita-se que o TNF- $\alpha$  e outras citocinas como, IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-1 estejam relacionados com processos de caquexia em animais experimentais (TISDALE; 1997; ANKER; COATS, 1999; HATTER *et al.*, 2018) e isso explicaria a queda de peso aos 30 dias de infecção observada em nosso estudo.

A partir do estabelecimento do processo inflamatório e da destruição de células nervosas, a motilidade intestinal é prejudicada e a progressão para o megacólon pode ocorrer. Embora grupos de pesquisa tem como objetivo contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares do megacólon, pouco ainda se sabe.

Componentes como a substância P, o peptídeo vasoativo intestinal, serotonina, e enzimas como triptase e quinase podem estar relacionadas com a progressão do megacólon chagásico (ROGGERO *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2013; SEGATTO; OLIVEIRA; SILVEIRA, 2017; KANNEN *et al.*, 2018b; MARTINS *et al.*, 2018). Todas as proteínas citadas anteriormente compartilham a ação direta/indireta na homeostase de neurônios intestinais. Além disso, sabe-se que a presença de células inflamatórias no intestino influencia no desenvolvimento do megacólon. A resposta inflamatória mediada pela produção de óxido nítrico sintase, por exemplo, também já foi demonstrada como

putativa para o dano neuronal intestinal (ARANTES *et al.*, 2004; JABARI *et al.*, 2012). Logo, para que ocorra a diminuição de plexos mioentéricos, como foi observado em nosso estudo, é necessário o estabelecimento de um quadro inflamatório que englobe vários mecanismos que resultem no dano neuronal acumulativo.

Considerada como uma proteína essencial para a organogênese do sistema nervoso entérico e para a homeostase do tecido adulto, (GERSHON; CHALAZONITIS; ROTHMAN, 1993; MULLER *et al.*, 2014) encontramos alta produção de BMP2 aos 30 dias de infecção com a cepa Y no intestino de camundongos C57Bl/6. Níveis basais de BMP2 são secretados por macrófagos do plexo mioentérico para a homeostase dos neurônios entéricos dessa região (MULLER *et al.*, 2014). Dessa forma, a regulação da concentração dessa proteína é de extrema importância para a manutenção da atividade intestinal. Entretanto, sabe-se que em condições inflamatórias ocorre um aumento dos níveis de BMP2. Citocinas como IFN- $\gamma$  são capazes de induzir a expressão do mRNA de BMP2 (IBARRA URIZAR *et al.*, 2016). O contrário também é observado, altos níveis de BMP2 induzem o aumento de citocinas pró-inflamatórias como, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-18 e TNF- $\alpha$  (ZARA *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011a, 2011b, 2012; MITCHELL *et al.*, 2016). Na DC já é estabelecido o aumento dessas citocinas, tanto na fase crônica quanto na fase aguda (BORGES *et al.*, 2013; REIS MACHADO *et al.*, 2014; VAZQUEZ *et al.*, 2015; CARDILLO *et al.*, 2015; GATTO *et al.*, 2017).

Em estômago de camundongos infectados com *Helicobacter pylori*, observou-se que o infiltrado inflamatório induzido pela infecção produzia BMP2, e isso foi relacionado ao aumento dessa proteína no órgão (BLEUMING *et al.*, 2006). Haja vista que em nosso trabalho o infiltrado inflamatório estava em maior quantidade concomitantemente com o aumento de BMP2, acreditamos que essas células possam influenciar a quantidade de BMP2 produzida no intestino. *In vitro*, BMP2 é capaz de induzir quimiotaxia, adesão e inibir a diferenciação de monócitos para perfil de macrófago-M2, o que inibe o reparo tecidual (PARDALI *et al.*, 2018). Essa inibição resulta na manutenção do perfil pró-inflamatório M1, com aumento de citocinas pró-inflamatórias (PARDALI *et al.*, 2018).

Em nosso trabalho foram observadas correlações positivas entre o aumento de BMP2 e o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  aos 30 dias de infecção. Existem dois mecanismos que podem ser sugeridos a partir desses resultados. O aumento de BMP2 pode ter sido induzido pelas citocinas pró-inflamatórias que aumentaram em 30 dias de infecção. O contrário também pode ser válido, sendo que

BMP2 pode ter induzido o aumento de citocinas pró-inflamatórias. O resultado dessas interações é a manutenção do perfil inflamatório e a consequente diminuição de neurônios nessa fase da infecção experimental.

Além de estar relacionado com infiltrado inflamatório e citocinas pró-inflamatórias, a BMP2 induz o aumento da SP em gânglios isolados da raiz dorsal de ratos (BUCELLI *et al.*, 2007). A SP é um neuropeptídeo inflamatório que em pacientes infectados com *T. cruzi* na fase crônica com megaesôfago e megacólon (DA SILVEIRA *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2013) está altamente expressa quando comparado com pacientes não infectados. Sabe-se que esse neuromediador possui como uma de suas funções o recrutamento de células inflamatórias (NASCIMENTO *et al.*, 2013). Esse comportamento pode estar relacionado com a destruição de células nervosas mediada pelo estabelecimento do quadro inflamatório e a longo prazo (fase crônica da infecção por *T. cruzi*) com progressão para megaesôfago ou megacólon (DA SILVEIRA *et al.*, 2007c; NASCIMENTO *et al.*, 2013).

A alteração dos níveis de BMP2 também tem sido relacionada à indução de apoptose em diferentes tipos de células. Nos neurônios do hipocampo em ratos expostos ao arsênio, a BMP2 induz a apoptose via SMADs (PANDEY *et al.*, 2017). Da mesma forma, em camundongos infectados com *H. pylori*, foi observado regulação positiva da BMP2 e aumento de apoptose nas células da mucosa do estômago (BLEUMING *et al.*, 2006). Em um modelo de rato induzido por diabetes, os níveis decrescentes dessa proteína também estão correlacionados com a perda da homeostase do plexo mioentérico (HONORÉ *et al.*, 2011). Como a expressão anormal de BMP/SMAD pode ser relatada como disfunção neuronal, a alta concentração de BMP2 *in vitro* aumentou a proporção apoptótica em cultura de neurônios corticais primários (SUN *et al.*, 2013). Dito isso, a correlação negativa e significativa entre BMP2 e neurônios encontrada em nosso trabalho sugere que alta concentração de BMP2 aos 30 dias de infecção com a cepa Y representa uma nova via envolvida em apoptose neuronal.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, algumas hipóteses podem ser levantadas sobre o papel da BMP2 na DC experimental. Essa proteína pode atuar de várias maneiras que podem participar da progressão das alterações intestinais observadas pela infecção por *T. cruzi*. Resumidamente, sugere-se que aos 30 dias de infecção o aumento de BMP2 esteja relacionado com 1) aumento de células inflamatórias produtoras de BMP2, 2) manutenção do perfil pró-inflamatório intestinal e 3) destruição neuronal.

## 7. CONCLUSÃO

---

A partir desse estudo é possível sugerir que o aumento de BMP2 intestinal após infecção com a cepa Y de *T. cruzi* representa uma nova via para manutenção do perfil inflamatório e relação com a diminuição de neurônios no órgão no início do processo infeccioso (30 dias).

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

- A infecção aos 30 dias resulta em processo inflamatório intestinal mais intenso;
- A infecção aos 30 dias resulta em diminuição de neurônios no plexo mioentérico;
- A infecção induz gradativa deposição de colágeno intestinal aos 90 dias de infecção;
- Animais infectados com a cepa Y produzem mais BMP2 e IFN- $\gamma$  intestinal aos 30 dias de infecção;
- Acredita-se que a maior quantidade de infiltrado inflamatório aos 30 dias de infecção com *T. cruzi* esteja relacionada com o aumento de BMP2 intestinal;
- Acredita-se que a BMP2 esteja relacionada com um feedback positivo para a manutenção do perfil pró-inflamatório após infecção. Seja induzindo o aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ou sendo induzida por essas citocinas aos 30 dias;
- Acredita-se que o aumento de BMP2, juntamente com o aumento de IFN- $\gamma$ , esteja envolvida na indução ao dano neuronal aos 30 dias de infecção.

## REFERÊNCIAS

---

---

- ANDRADE, L. O. *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular And Biochemical Parasitology**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.163-172, maio 1999.
- ANDRADE, L. O. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 100, n. 4, p.269-275, abr. 2002.
- ADAD, S. J. *et al.* Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 443–50, 1991.
- ADAD, S. J. *et al.* Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric newhouron analysis. **Virchows Archiv**, v.438, n. 3, p. 254–258, 12 mar. 2001.
- AMPUJA, M.; KALLIONIEMI, A. Transcription factors—Intricate players of the bone morphogenetic protein signaling pathway. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 57, n. 1, p. 3–11, 2018.
- ANDRADE S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. **Revista de Patologia Tropical**, [s.I.], v. 3, p.65-121,. 1974.
- ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S. G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 77, n. 6, p.796-799, jan. 1983.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. [Immunochemical study of experimental Chagas' disease]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 44–7, 1969.
- ANKER, S. D.; COATS, A. J. Cardiac Cachexia. **Chest**, [s.l.], v. 115, n. 3, p.836-847, 1999.
- ARANTES, R. M. *et al.* Interferon- $\gamma$ -Induced Nitric Oxide Causes Intrinsic Intestinal Denervation in *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 164, n. 4, p.1361-1368, abr. 2004.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. De. Doença de chagas: manual para

experimentação animal. **Editora Fiocruz**. 2000.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1, 2013.

BLEUMING, S. A. *et al.* Altered bone morphogenetic protein signalling in the *Helicobacter pylori*-infected stomach. **Journal of Pathology**, v. 209, n. 2, p. 190–197, 2006.

BŁYSZCZUK, P. Myocarditis in Humans and in Experimental Animal Models. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, n. May, p. 1–17, 2019.

BORGES, D. C. *et al.* Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 138, n. 2, p. 145–156, 2013.

BRAGDON B. *et al.* Bone morphogenetic proteins: a critical review. **Cellular signaling**, v. 23, n. 4, p. 609-620, 2011.

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

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.

BUCELLI, R. C. *et al.* Statins Decrease Expression of the Proinflammatory Neuropeptides Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P in Sensory Neurons. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 324, n. 3, p.1172-1180, 2007.

CAETANO, L. C. *et al.* Does Cyclophosphamide Play a Protective Role Against Neuronal Loss in Chronic *T. cruzi* Infection? **Digestive Diseases And Sciences**, [s.l.], v. 53, n. 11, p.2929-2934, 22 abr. 2008.

CAMANDAROBA, E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: clones isolated from the Colombian strain , reproduce the parental strain characteristics , with ubiquitous histotropism. v. 3, p. 209–217, 2006.

CAMARGO, M. M. *et al.* 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. **American Associations of Immunologists**, n. December 2015, p. 6131–6139, 1997.

CAMPOS, C. F. *et al.* Enteric neuronal damage, intramuscular denervation and smooth muscle phenotype changes as mechanisms of Chagasic megacolon: Evidence from a long-term murine model of *trypanosoma cruzi* infection. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2016.

- CAMPOS, J. V.; TAFURI, W. L.; Chagas enteropathy. **Gut**, v. 14, n. 11, p.910-9, nov. 1973.
- CARDILLO, F. *et al.* Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. 1–8, 2015.
- CARDILLO, F. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 128–134, 1996.
- CHAGAS, C. Nova espécie morbida do homem, produzida por um *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*). **Brazil Médico**, . 1909.
- CHALAZONITIS, A. *et al.* Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. **Developmental Biology**, v. 350, n. 1, p. 64–79, fev. 2011.
- CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G. R. Bone Morphogenetic Proteins. **Growth Factors**, v. 22, n. 4, p. 233–241, 2004.
- CHEN, K. *et al.* Intestinal Mucosal Barrier Is Injured by BMP2/4 via Activation of NF- $\kappa$ B Signals after Ischemic Reperfusion. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2014, p.1-11, 2014.
- COSTA, M.; BROOKES S. J.; HENNIG G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, [s.l.], v. 47, n. 90004, p.15-19, 2000.
- COURA, J. R. *et al.* Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends In Parasitology**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.171-176, abr. 2002.
- DA SILVEIRA, A. B. M. *et al.* Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, n. 5, p. 627–634, 2005.
- DA SILVEIRA, A. B. M. *et al.* Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human Pathology**, v. 38, n. 8, p. 1256–1264, 2007b.
- DA SILVEIRA, A. B. M. *et al.* Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. **Parasitology**, v. 134, n. 6, p. 789–796, 2007a.
- DA SILVEIRA, A. B. M. *et al.* Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 10, p. 2877–2883, 2007c.
- DA SILVEIRA, A. B. M. *et al.* Substance P and NK1 receptor expression in the enteric nervous system is related to the development of chagasic megacolon. **Transactions of**

the **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1154–1156, 2008.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.1-12, jan. 2003.

DIAS, J. C. P. Aspectos clínicos, sociais e trabalhistas da doença de Chagas em área endêmica sob controle no estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, n. 2, p. 93-99, 1993.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 25, n. 21, p.1-10, jun. 2016. Instituto Evandro Chagas.

DUBE P. R., BIRNBAUMER L. e VAZQUEZ G. Evidence for constitutive bone morphogenetic protein-2 secretion by M1 macrophages: Constitutive auto/paracrine osteogenic signaling by BMP2 in M1 macrophages. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 1, p. 154-158, 2017.

DUZ, A. L. C. *et al.* The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 109, n. 8, p.1005-1013, 2014.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, p. 286–294, 2012.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, 2010.

GATTO, M. *et al.* Benznidazole affects expression of Th1, Th17 and Treg cytokines during acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.1-9, 2017.

GERSHON, M. D.; CHALAZONITIS, A.; ROTHMAN, T. P. From neural crest to bowel: Development of the enteric nervous system. **Journal of Neurobiology**, v. 24, n. 2, p. 199–214, 1993.

GOLDSTEIN, A. M. *et al.* BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. **Mechanisms of Development**, v. 122, n. 6, p. 821–833, 2005.

GUEDES, P. M. M. *et al.* Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.1-10, 2012.

GUILLÉN-PERNÍA, B.; LUGO-YARBUH, A. & MORENO, E. Dilatación del tracto digestivo de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. **Invest. Clín.**, vol. 24, no. 3, p.

195-209, 2001.

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

HATTER, J. A. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection triggers chronic cachexia and sustained commensal dysbiosis in mice. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–16, 2018.

HONORÉ, S. M. *et al.* Neuronal loss and abnormal BMP/Smad signaling in the myenteric plexus of diabetic rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 164, n. 1-2, p. 51-61, 2011.

HORI M. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 counterregulates interleukin-18 mRNA and protein in MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells. **Connect Tissue Research**, v. 124, n. 3, p. 124–132, 2006.

IBARRA URIZAR, A. *et al.* Inflammatory Cytokines Stimulate Bone Morphogenetic Protein-2 Expression and Release from Pancreatic Beta Cells. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 36, n. 1, p. 20–29, 2016.

JABARI, S. *et al.* Mucosal layers and related nerve fibres in non-chagasic and chagasic human colon—a quantitative immunohistochemical study. **Cell And Tissue Research**, [s.l.], v. 358, n. 1, p.75-83, 2014.

JABARI, S. *et al.* Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon. **Histochemistry And Cell Biology**, [s.l.], v. 135, n. 1, p.47-57, 24 dez. 2011.

JABARI, S. *et al.* Preponderance of inhibitory versus excitatory intramuscular nerve fibres in human chagasic megacolon. **International Journal Of Colorectal Disease**, [s.l.], v. 27, n. 9, p.1181-1189, 23 jun. 2012.

KANNEN, V. *et al.* Mast Cells and Serotonin Synthesis Modulate Chagas Disease in the Colon: Clinical and Experimental Evidence. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 63, n. 6, p. 1473–1484, 2018.

KASHIMA, R.; HATA, A. The role of TGF- $\beta$  superfamily signaling in neurological disorders. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 50, n. 1, p. 106–120, 2018.

LEE, K. B. *et al.* BMP induced inflammation: A comparison of rhBMP-7 and rhBMP2. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 12, p. 1985–1994, 2012.

LEE, K. B. *et al.* Bone morphogenetic protein-binding peptide reduces the inflammatory response to recombinant human bone morphogenetic protein-2 and recombinant human bone morphogenetic protein-7 in a rodent model of soft-tissue inflammation. **Spine Journal**, v. 11, n. 6, p. 568–576, 2011b.

LEE, K. B. *et al.* Inflammatory characteristics of rhBMP2 in vitro and in an in vivo rodent model. **Spine**, v. 36, n. 3, p. 149–154, 2011a.

- LOCATI, M. Macrophages Have a Grip on the Gut. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 11–13, 2014.
- LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de chagas humana. 1997.
- LOWERY, J. W.; ROSEN, V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 4, p. 2431–2452, 2018.
- MACHADO, E. M. M. *et al.* Morphometry of Submucous and Myenteric Esophageic Plexus of Dogs Experimentally Reinfected with *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 545–548, 2001.
- MAGALHÃES, L. M. D. *et al.* Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.1-17, 2015.
- MAGALHÃES, L. M. D. *et al.* High Interleukin 17 Expression Is Correlated With Better Cardiac Function in Human Chagas Disease. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 207, n. 4, p.661-665, 2012.
- MAIFRINO, L. B. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Preliminary investigation of NADH-positive and somatostatin – immunoreactive neurons in the myenteric plexus of the mouse colon during the infection. v. 111, p. 224–229, 2005.
- MAIFRINO, L. B. M. Vasoactive intestinal peptide and substance P immunoreactive nerve fibres in the myenteric plexus of mouse colon during the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Annals Of Tropical Medicine And Parasitology**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.49-56, 1999.
- MARTINS CAMPOS, V.; TAFURI, W. L. Progress report Chagas enteropathy. **Gut**, v. 14, p. 910–919, 1973.
- MARTINS, P. R. *et al.* Mast cell-nerve interaction in the colon of *Trypanosoma cruzi*-infected individuals with chagasic megacolon. **Parasitology Research**, [s.l.], v. 117, n. 4, p.1147-1158, 2018.
- MASSOCATTO, C. L. *et al.* Treatment with low doses of aspirin during chronic phase of experimental Chagas' disease increases oesophageal nitrergic neuronal subpopulation in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 6, p. 356–362, 2017a.
- MASSOCATTO, M. C. L. *et al.* Aspirin prevents atrophy of esophageal nitrergic myenteric neurons in a mouse model of chronic Chagas disease. **Diseases of the Esophagus**, v. 30, n. 2, p. 1–8, 2017b.

- MENEGHELLI, U. G. Chagasic enteropathy Enteropatia chagásica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 252–260, 2004.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 3:1-29, 2005.
- MIRKIN, G. A. *et al.* Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. **Clinical And Experimental Immunology**, [s.l.], v. 107, n. 2, p.328-334, 1997.
- MITCHELL, K. *et al.* Bone morphogenetic protein-2-mediated pain and inflammation in a rat model of posterolateral arthrodesis. **BMC Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2016.
- MOREIRA, N. M. *et al.* Moderate physical exercise reduces parasitaemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. p. 426–435, 2013.
- MOREIRA, N. M. *et al.* Neuronal changes caused by *Trypanosoma cruzi*: An experimental model. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 2, p. 545–555, 2011.
- MULLER, P. A. *et al.* Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 300-313, 2014.
- NASCIMENTO, R. D. *et al.* An imbalance between substance P and vasoactive intestinal polypeptide might contribute to the immunopathology of megaesophagus after *Trypanosoma cruzi* infection. **Human Pathology**, v. 44, n. 2, p. 269–276, 2013.
- NGUYEN, V. *et al.* BMP2-induced bone formation and neural inflammation. **Journal Of Orthopaedics**, v. 14, n. 2, p. 252-256, 2017.
- NOGUEIRA-PAIVA, N. C. *et al.* Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains in Beagle dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 51–60, 2014.
- PANDEY, R. *et al.* From the Cover: Arsenic Induces Hippocampal Neuronal Apoptosis and Cognitive Impairments via an Up-Regulated BMP2/Smad-Dependent Reduced BDNF/TrkB Signaling in Rats. **Toxicological Sciences**, v. 159, n. 1, p. 137–158, 2017.
- REIS MACHADO, J. *et al.* Immunopathological Aspects of Experimental *Trypanosoma cruzi* Reinfections. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- REZENDE, J. M. DE. The digestive tract in Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 97–106, 1984.

- RIBEIRO, U. *et al.* Effect of chagas' disease on nitric oxide-containing neurons in severely affected and unaffected intestine. **Diseases Of The Colon & Rectum**, [s.l.], v. 41, n. 11, p.1411-1417, nov. 1998.
- ROBINETTE, M. L.; COLONNA, M. GI motility: Microbiota and macrophages join forces. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 239–240, 2014.
- ROGGERO, E. *et al.* Different peripheral neuroendocrine responses to *Trypanosoma cruzi* infection in mice lacking adaptive immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1262, n. 1, p. 37–44, 2012.
- SANTANA, R. A. G. *et al.* Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.132-135, jan. 2018.
- SANTOS-LIMA E. *et al.* Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.** 1997; 65: 457-65.
- SEGATTO, M. A. R. F. N.; OLIVEIRA, N. T. E. C. DE; SILVEIRA, A. B. M. Relation between mast cells concentration and serotonin expression in chagasic megacolon development. n. January, p. 19–22, 2017.
- SHEN J. *et al.* BMP2-induced inflammation can be suppressed by the osteoinductive growth factor NELL-1. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 21-22, p. 2390-2401, 2013.
- SILVA, J. S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4862–4867, 1995.
- SILVA, J. S. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 169–174, 1994.
- SILVA, J. S. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, n. 6, p. s314-325, 2003.
- SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 3, p. 539–45, 1991.
- SIMÕES, M. V. *et al.* Chagas disease cardiomyopathy. **International Journal Of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173-189, 2018.
- SOUSA JÚNIOR, A. S. *et al.* Análise espaço-temporal da doença de Chagas e seus fatores de risco ambientais e demográficos no município de Barcarena, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.742-755, dez. 2017.

- SOUZA, M. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system pathology in experimental Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 217-224, 1996.
- SOUZA, P. E. A. *et al.* Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 72, n. 9, p.5283-5291, 2004.
- SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 2010, p.1-18, 2010.
- SUN, Q. *et al.* Role of miR-17 Family in the Negative Feedback Loop of Bone Morphogenetic Protein Signaling in Neuron. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.1-11, 2013.
- TAFURI W. L. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis. **Virchows Arch**, [s.I], vol. 354, n. 2, p.136–149,. 1971a.
- TAFURI W. L.; MARIA T. A.; LOPES E. R. Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, vol. 13, n. 2, p.76-91, mar-abril. 1971b.
- TALVANI, A. *et al.* Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- $\gamma$  as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes And Infection**, [s.l.], v. 2, n. 8, p.851-866, 2000.
- TISDALE, M. J. Biology of cachexia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 23, p. 1763–1773, 1997.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal For Parasitology**, [s.l.], v. 31, n. 5-6, p.472-481, 2001.
- VARGAS, A. *et al.* Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.1-8, 5 fev. 2018.
- VAZQUEZ, B. P. *et al.* Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-12, 2015

- VILLANI, F. N. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi*-Induced Activation of Functionally Distinct and CD4- CD8- T Cells in Individuals with Polar Forms of Chagas' Disease. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 78, n. 10, p.4421-4430, 2010.
- WALKER, D. M. *et al.* Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 2013.
- WESLEY, M. *et al.* Correlation of Parasite Burden, kDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 10, p.1-16, 2019.
- WHO. Relevé épidémiologique hebdomadaire. **Weekly epidemiological record**, v. 91, n. 30, p. 349–364, 2016.
- WU M. *et al.* Expression analysis of BMP2, BMP5, BMP10 in human colon tissues from Hirschsprung disease patients. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 2, p. 529-536, 2014.
- XIAO Y. T., XIANG L. X. e SHAO J. Z. Bone morphogenetic protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 3, p. 550-553, 2007.
- ZARA J. N. *et al.* High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, n. 9-10, p. 1389-1399, 2011.
- ZINGALES, B *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 7, p.1051-1054, nov. 2009.
- ZINGALES, Bianca *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.240-253, mar. 2012.
- ZINGALES, Bianca. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 184, p.38-52, ago. 2018.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. **Bol Epidemiol** [Internet]. 2020 abr [20/10/2020]; 51(n.esp.):1-43. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

## ANEXOS

---

**Anexo 1** – Parecer consubstanciado referente ao atendimento de pendência do protocolo Nº. 051/19 e certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás/CEUA-UFG.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 12 de agosto de 2019.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 051/19**

**I - Finalidade do projeto de pesquisa:**

**II - Identificação:**

- Data de apresentação a CEUA: 23/05/19
- Data do atendimento da pendência: 12/08/2019
- Título do projeto: Avaliação imunopatológica do intestino de camundongos reinfetados por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*
- Pesquisador Responsável/ Unidade: Arthur Wilson Florencio da Costa/IPTSP
- Pesquisadores Participantes: Mara Rúbia Nunes Celes/IPTSP, Juliana Reis Machados/IPTSP, Liliana Borges de Menezes/IPTSP, Flávia Aparecida de Oliveira/IPTSP, Milton Adriano Pelli de Oliveira/IPTSP, José Rodrigues do Carmo Neto/IPTSP, Yarla Loyane Lira Braga/IPTSP.
- Médico Veterinário/CRMV: Liliana Borges de Menezes Leite/ 3056
- Unidade onde será realizado: IPTSP/UFG

**III – Respostas as pendências:**

- ✓ **Solicitação da CEUA:** Descrever as dimensões das caixas a serem utilizadas  
**Resposta do Pesquisador Responsável:** Os animais serão alocados em gaiolas de polipropileno de tamanho 30x20 cm com tampas de aço inoxidável perfurado (microisoladores) que serão trocadas duas vezes por semana e mantidos em estantes com ventilação individual.

- ✓ **Solicitação da CEUA:** Descrever o potencial zoonótico e a via a ser utilizada para a infecção da cepa Colombiana de *T. cruzi*

**Resposta do Pesquisador Responsável:**

Qual (espécie)	Cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i>
Potencial zoonótico	Alta virulência. Não apresenta potencial zoonótico direto, mas pode causar a doença via fômite ou contato com o berbeiro.
Via utilizada para infecção	Intrapertoneal.
Frequência	Dois momentos, infecção (1º dia) e reinfecção (90º dia)

- ✓ **Solicitação da CEUA:** Adequar o cronograma  
**Resposta do Pesquisador Responsável:** início do uso de animais em 11/2019 e fim da pesquisa em 31/12/2022.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO. Fone: (55-62) 3521-1876.  
Email: [ceua.ufg@gmail.com](mailto:ceua.ufg@gmail.com)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



**VI - Parecer da CEUA:**

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

**Informação aos pesquisadores:**

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que os pesquisadores responsáveis deverão encaminhar à CEUA-PRPI-UFPG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações em 31/12/2022.

**VII - Data da reunião: 12/08/19.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação imunopatológica do intestino de camundongos reinfetados por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*”, registrada com o protocolo nº 051/19, sob a responsabilidade de Arthur Wilson Florencio da Costa e Mara Rúbia Nunes Celes que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 12/08/2019

- Finalidade: ( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 12/08/2019 a 31/12/2022
- Espécie/linhagem/raça: Camundongos, C57/BL6
- Nº de animais autorizados: 362
- Peso/Idade: 22 a 25g/adultos
- Sexo: machos
- Origem (fornecedor): Biotério central UFG



*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.  
Email: [ceua.ufg@email.com](mailto:ceua.ufg@email.com)