

Avaliação da evolução da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos coinfetados com *Schistosoma mansoni*

Evaluation of the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice coinfected with *Schistosoma mansoni*

DOI:10.34117/bjdv7n11-423

Recebimento dos originais: 20/10/2021

Aceitação para publicação: 23/11/2021

Camila Cabral Campos

Formação acadêmica: Graduação em Enfermagem

Instituição de atuação atual: Universidade Federal de Alfenas

Endereço completo: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Minas Gerais, CEP: 37130-001

Email: camilacabralc856@gmail.com

Kelly Joanna González Lozano

Formação acadêmica: Mestre em Ciências Biológicas

Instituição de atuação atual: Universidade Federal de Alfenas

Endereço completo: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Minas Gerais, CEP: 37130-001

Email: kjgonloz@gmail.com

Maria Ângela Rodrigues

Formação acadêmica: Mestre em Ciências Fisiológicas

Instituição de atuação atual: Universidade Federal de Alfenas

Endereço completo: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Minas Gerais, CEP: 37130-001

Email: maria.rodrigues@unifal-mg.edu.br

Murilo César do Nascimento

Formação acadêmica: Doutor em Ciências da Saúde na Comunidade

Instituição de atuação atual: Universidade Federal de Alfenas

Endereço completo: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Minas Gerais, CEP: 37130-001

Email: murilo@unifal-mg.edu.br

Raquel Lopes Martins Souza

Formação acadêmica: Pós Doutora pelo Centro de Pesquisa René Rachou

Instituição de atuação atual: Universidade Federal de Alfenas

Endereço completo: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Minas Gerais, CEP: 37130-001

Email: souzaraquel807@gmail.com

Fábio de Souza Terra

Formação acadêmica: Doutor em Ciências – Área Enfermagem Fundamental

Instituição de atuação atual: Universidade Federal de Alfenas

Endereço completo: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Minas

Gerais, CEP: 37130-001

Email: fabio.terra@unifal-mg.edu.br

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar a evolução da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos coinfectados com *Schistosoma mansoni*. Trata-se de uma pesquisa experimental em que foram utilizados 66 camundongos balb/c fêmeas com 8 semanas de idade, alguns destes foram infectados por 25 cercarias e, posteriormente, infectados com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Os animais foram divididos em 6 grupos: G1 - Controle não infectado (90 dias); G2 - Infectado com *Schistosoma mansoni* (90 dias); G3 - Animal de 90 dias + *Trypanosoma cruzi*; G4 - Animal de 90 dias + *Trypanosoma cruzi* + benznidazol 100 mg/kg; G5 - Infectado com *Schistosoma mansoni* (90 dias) + *Trypanosoma cruzi* (30 dias) e G6 - Infectado com *Schistosoma mansoni* (90 dias) + *Trypanosoma cruzi* 30 dias + benznidazol 100 mg/kg. Os animais pertencentes aos grupos 4 e 6, foram submetidos ao tratamento com benznidazol (100mg/kg) por via oral, durante 9 dias consecutivos após a infecção ser confirmada. Foi realizado o exame de kato-katz para quantificação de oviposição de *Schistosoma mansoni*; a parasitemia dos animais infectados por *Trypanosoma cruzi* ou coinfectados com *Schistosoma mansoni* e submetidos ou não ao tratamento com benznidazol; o acompanhamento do ganho de peso corporal dos animais após infecção com *Trypanosoma cruzi*, e o peso do baço, do fígado e coração dos animais. Foi encontrado que a coinfeção por *Schistosoma mansoni* pode interferir no agravamento da evolução da infecção por *Trypanosoma cruzi*, principalmente no que se trata de hepatomegalia, esplenomegalia e na parasitemia e com menor intensidade no pulmão.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Esquistossomose mansoni. *Trypanosoma cruzi*. *Schistosoma mansoni*. Coinfecção.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice co-infected with *Schistosoma mansoni*. This is an experimental research in which 66 8-week-old female balb/c mice were used, some of which were infected by 25 cercariae and later infected with 5000 blood trypomastigote forms of the Y strain. The animals were divided into 6 groups: G1 - Uninfected control (90 days); G2 - Infected with *Schistosoma mansoni* (90 days); G3 - 90-day animal + *Trypanosoma cruzi*; G4 - 90-day animal + *Trypanosoma cruzi* + 100 mg/kg benznidazole; G5 - Infected with *Schistosoma mansoni* (90 days) + *Trypanosoma cruzi* (30 days) and G6 - Infected with *Schistosoma mansoni* (90 days) + *Trypanosoma cruzi* 30 days + benznidazole 100 mg/kg. The animals belonging to groups 4 and 6 were treated with benznidazole (100mg/kg) orally for 9 consecutive days after the infection was confirmed. The kato-katz test was performed to quantify *Schistosoma mansoni* oviposition; the parasitemia of animals infected with *Trypanosoma cruzi* or co-infected with *Schistosoma mansoni* and submitted or not to treatment with benznidazole; the monitoring of the animals' body weight gain after infection with *Trypanosoma cruzi*, and the weight of the spleen, liver and heart of the animals. It was found that the co-infection by *Schistosoma mansoni* can interfere in the worsening of the evolution of the

infection by *Trypanosoma cruzi*, especially with regard to hepatomegaly, splenomegaly and parasitemia, with lesser intensity in the lung.

Keywords: Chagas disease. Schistosomiasis mansoni. *Trypanosoma cruzi*. *Schistosoma mansoni*. Coinfection.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil vive uma situação de saúde que combina uma transição demográfica acelerada e uma transição epidemiológica singular expressa em uma agenda não superada de doenças infecciosas e carências, uma carga importante de causas externas e uma presença fortemente hegemônica das condições crônicas (BRASIL, 2012).

O ponto de que as doenças infecciosas emergem e reemergem não é nova, nem a busca por suas causas e esse movimento ocorre há milhões de anos. Com o grande salto do desenvolvimento tecnológico na era da informação, acreditou-se que o grande círculo da emergência e da reemergência infecciosa fossem evoluir até o eventual desaparecimento das doenças infecciosas e parasitárias infecciosas (TIBIRIÇÁ; GUIMARÃES; TEIXEIRA, 2011).

Devido às condições climáticas favoráveis e ao limitado desenvolvimento econômico e de recursos de saúde, países tropicais e subtropicais apresentam elevada frequência de doenças parasitárias como a esquistossomose e a doença de Chagas (HOTEZ et al., 2008). Os indivíduos são acometidos por uma ou mais destas doenças, causando elevados índices de mortalidade, com importante impacto médico-social e econômico (MACHADO et al., 2009).

A Educação em Saúde pode contribuir para o controle e a prevenção de parasitoses, e alcançar efeitos mais duradouros em comparação a outras abordagens (RODRIGUES et al., 2017). As práticas educacionais bem aplicadas induzem as pessoas a adquirirem os conhecimentos necessários para prevenção das parasitoses, alcançando os objetivos propostos e evidenciando o valor da conscientização da população (SILVA et al., 2018).

A doença de Chagas possui como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Este apresenta um ciclo de vida complexo envolvendo um hospedeiro intermediário (inseto triatomíneo) e definitivo (hospedeiro vertebrado). A infecção em humanos pode ser grave, com elevada mortalidade em crianças na fase aguda e acometimento cardíaco e/ou digestivo na fase crônica em adultos. Estima-se que cerca 8 a 10 milhões de indivíduos são acometidos anualmente em todo o mundo (NUNES et al., 2013).

A contaminação decorrente da picada de insetos vetores triatomíneos, conhecidos como barbeiros, também é responsável por numerosos casos de infecção por *T. cruzi*, principalmente em países como Bolívia, Colômbia e Venezuela, em decorrência das limitadas estratégias de controle dos insetos vetores (FERNANDES et al., 2019).

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por platelmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*, cujas formas adultas habitam nos vasos sanguíneos mesentéricos e o plexo hemorroidário superior do hospedeiro definitivo. No estágio inicial a esquistossomose é assintomática, e evolui para formas graves levando o indivíduo ao óbito. Dados epidemiológicos indicaram que cerca de 200 milhões de pessoas podem estar infectadas em todo o mundo por alguma espécie de *Schistosoma* (LIU et al., 2011; UTZINGER et al., 2009).

Ocorre circulação simultânea de *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) e *T. cruzi* em aproximadamente 17 Estados brasileiros, especialmente na região leste do país. Pode levar a coinfeções que resultam em diferentes mudanças na progressão dos parasitos nos hospedeiros (RODRIGUES et al., 2017).

A influência de infecções por helmintos sobre o desenvolvimento de coinfeções tem sido investigada principalmnete considerando que a resposta Th2 poder interferir na Th1, a qual é essencial para o controle dos parasitas intracelulares, incluindo *T. cruzi* (NETO; CHEVILLARD, 2014).

Devido aos complexos mecanismos de interação entre o patógeno e o seu hospedeiro, as coinfeções podem reduzir a eficácia do tratamento, principalmente quando o combate aos parasitos envolvidos requer a ativação de diferentes tipos de resposta de defesa do hospedeiro (ex: resposta celular vs. humoral) (BORDES et al., 2011; GRIFFTHS et al., 2014).

No Brasil, o fármaco prescrito para o tratamento da doença de Chagas é o Benznidazol que apresenta elevada toxicidade e eficácia limitada (BOSCARDIN et al., 2010; NOVAES et al., 2015; SANTOS et al., 2012). A eficácia da quimioterapia com benznidazol é variável sendo influenciada por múltiplos fatores, tais como a virulência e patogenicidade da cepa de *T. cruzi* (DIAS et al., 2009).

Devido ao fato da presença de coinfeções ser um achado frequente nos inquéritos epidemiológicos, há poucos estudos dedicados a compreender como a interação entre múltiplas infecções influencia na relação parasito-hospedeiro (BORDES 2011). Pouco se sabe sobre o impacto das coinfeções na resposta à quimioterapia antiparasitária e não

está bem estabelecido se os protocolos de tratamento utilizados nas monoinfecções apresentam a mesma eficiência em casos de coinfeccções ou se adaptações devem ser introduzidas à quimioterapia. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a evolução da infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos coinfectados com *Schistosoma mansoni*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E ÉTICA

Para a realização do trabalho foram utilizados 66 camundongos balb/c fêmeas com 8 semanas de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), Brasil. O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG e aprovado com o número 33/2019.

3.2 INFECÇÕES EXPERIMENTAIS

Para a indução da infecção por *T. cruzi*, os animais foram inoculados intraperitonealmente com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y (VIEIRA et al., 2012).

Para infecção por *S. mansoni* foi utilizada a cepa LE (Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil) fornecida pelo Moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR). Para infecção dos camundongos foram usadas 25 cercárias, as quais foram injetadas via subcutânea.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em seis grupos: G1: Controle não infectado (90 dias) com 8 animais; G2: Infectado com *S. mansoni* 90 dias, com 13 animais; G3: Animal de 90 dias + *T. cruzi*, com 11 animais; G4: Animal de 90 dias + *T. cruzi* + benznidazol 100 mg/kg, com 8 animais; G5: Infectado com *S. mansoni* 90 dias + *T. cruzi* 30 dias, com 14 animais e G6: Infectado com *S. mansoni* 90 dias + *T. cruzi* 30 dias + benznidazol 100 mg/kg, com 12 animais. Os animais pertencentes aos grupos 4 e 6, foram submetidos ao tratamento com benznidazol (100mg/kg) por via oral, durante 20 dias consecutivos após a infecção ser confirmada 5 dias após o inóculo.

3.4 DETECÇÃO DE PARASITAS

Para a confirmação da infecção por *T. cruzi* dos grupos 3, 4, 5 e 6 foi realizada a contagem do número de parasitas sanguíneas em 50 campos aleatórios com uma amplificação de 400X em microscópio de luz (Olympus CX40) (BRENER, 1962). Para a confirmação das infecções com *S. mansoni*, foi feito um exame coprológico para a visualização direta dos ovos em amostras fecais dos camundongos dos grupos infectados (G2, G5 e G6), 8 semanas após infecção com o parasita.

3.5 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Após a infecção pelo *T. cruzi* ser confirmada quatro dias depois do inoculo, começou o tratamento com bz para os grupos 4 e 6. O regime de tratamento consistiu na administração de 100mg/kg por 9 dias consecutivos. Foram usados comprimidos de Bz do Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) que foram macerados e suspensos em 10 mL de água destilada, utilizando carboximetilcelulose como agente suspensivo e administrados por gavagem.

3.6 PARASITEMIA

A contagem das formas tripomastigotas de *T. cruzi* no sangue periférico foi realizada diariamente a partir do 3º dia de infecção por 30 dias conforme o método descrito por Brener (1962). Resumidamente, para determinação da parasitemia foi registrado o número de tripomastigotas sanguíneas em cinquenta campos histológicos por lâmina, os quais foram analisados em microscópio de luz em aumento de 400x. Nos animais infectados por *S. mansoni* o parasitismo foi estimado por meio da contagem de granulomas hepáticos, ovos nas fezes e na parede do intestino delgado (íleo).

3.7 ACOMPANHAMENTO DO GANHO DE PESO

Os camundongos de todos os seis grupos foram pesados com o auxílio de uma balança eletrônica, da marca Marte Científica, modelo BL3200H, capacidade: 3200g, sensibilidade de 0,01g. A mensuração do peso teve início um mês antes da infecção por *T. cruzi*, sendo até então registrada uma vez na semana, após a infecção, a mensuração mudou de frequência passando a ser realizada em dois dias até a realização da eutanásia dos animais.

3.8 NECROPSIA E COLETA DE MATERIAL

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados por meio de punção cardíaca realizada após anestesia com a inalação de isoflurano, concentrado até a completa abolição dos movimentos respiratórios e dos reflexos profundos. Por meio de toracotomia e laparotomia mediana, o coração, o fígado, baço e o pulmão foram coletados.

3.9 PESO DOS ÓRGÃOS

Os órgãos (coração, fígado, baço e pulmão) foram pesados e o peso relativo foi calculado por meio da divisão do peso do órgão pelo peso corporal. Fragmentos de cada órgão foram fixados em solução de paraformaldeído tamponado a 10% por 48 horas.

3.9.1 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA

Após a fixação histológica, o pulmão foi desidratado em concentrações crescentes de etanol. Em seguida foi diafanizado e incluído em parafina. Foram obtidos em micrótomo rotativo três cortes semi-seriados com 5 μm de espessura obtidos em intervalos de 100 micrômetros para evitar analisar a mesma área histológica. As secções do pulmão foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

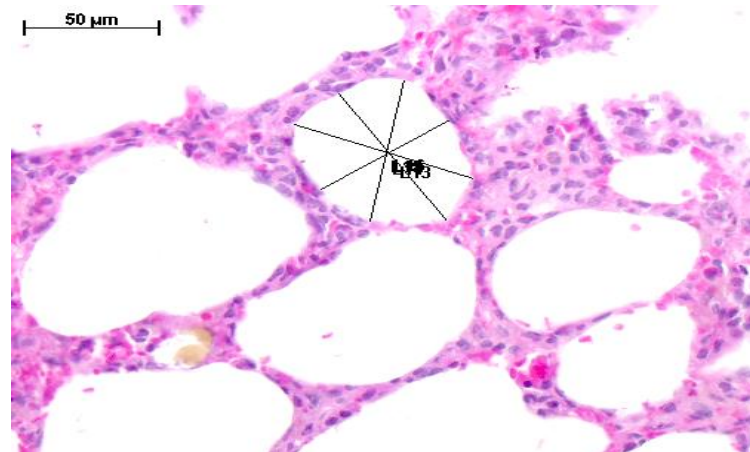
3.9.2 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

As lâminas histológicas foram visualizadas em microscópio de luz convencional com função de polarização (Axioscope A1, Carl Zeiss, Germany). Com uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio e o *software* de análise de imagens Axion Vision (Carl Zeiss, Germany), foram obtidas imagens para as análises estereológicas. Para cada análise, foram avaliados 10 campos histológicos por camundongo com uma objetiva de 40 \times (ampliação de 400 \times). As medidas foram realizadas utilizando o *software* Image-Pro® plus 4.5.

Para determinar a densidade alveolar em um aumento de 40 \times foi usada a fórmula $d_{alv}Q = \sum alv / A_t$, onde $\sum alv$ é o número de alvéolos e A_t corresponde à dimensão da área de teste utilizada ($5,9875 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). O diâmetro alveolar foi calculado com a média de 5 medidas do diâmetro dos alvéolos, como pode ser observado na Figura 1. Por outra parte, foram contados os núcleos celulares no tecido pulmonar para estimar o processo

inflamatório nesse órgão produto da coinfeção. Para determinar a densidade do número de células no tecido foi usada a fórmula $d_{celQ} = \sum_{cél} / At$, onde $\sum_{cél}$ representa o somatório do número de perfis de núcleos de células e At corresponde à dimensão da área de teste utilizada ($5,9875 \times 104 \mu m^2$).

Figura 1. Representação das medidas realizadas para o cálculo do diâmetro alveolar no software Image-Pro® plus 4.5.



Fonte: Do autor.

3.9.3 ÍNDICE DE MORTALIDADE

O experimento iniciou com um total de 73 camundongos em virtude que a mortalidade espontânea acontecia, era anotado qual animal e de qual grupo experimental ele pertencia para que houvesse controle da mortalidade.

3.9.4 EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

A susceptibilidade à infecção foi avaliada pela quantificação da excreção fecal de ovos no dia anterior a eutanásia. As fezes foram analisadas em duplicata pela técnica de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972), processados a fim de determinar o número de ovos por grama de fezes.

3.9.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

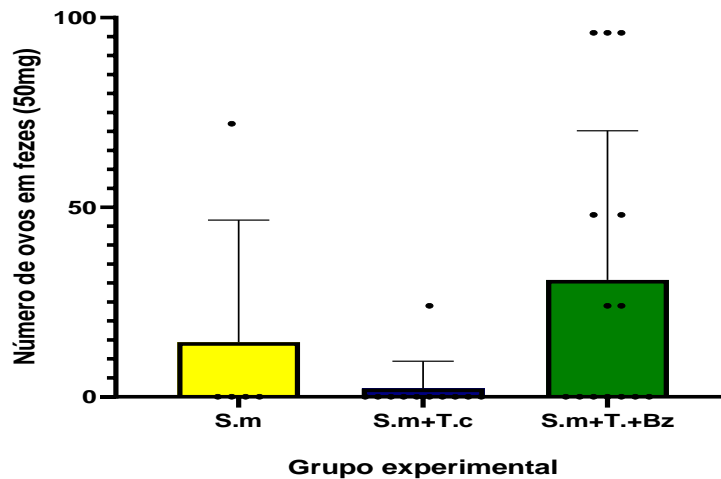
Os dados foram analisados no programa estatístico *GraphPad Prism*, versão 8. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP). A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste D'agostino Pearson. A variância dos dados obtidos de ambos os grupos investigados foi avaliada por meio de análise de variância unifatorial (*One-way ANOVA*) seguido pelo teste de *Tukey* para comparações múltiplas. Os dados não paramétricos foram comparados por meio do teste de *Kruskal-*

Wallis, seguido pelo teste de *Mann-Whitney*. Os resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 KATO – KATZ

Figura 2 – Exame de Kato-Katz realizado para a quantificação de oviposição de *S.mansoni*.



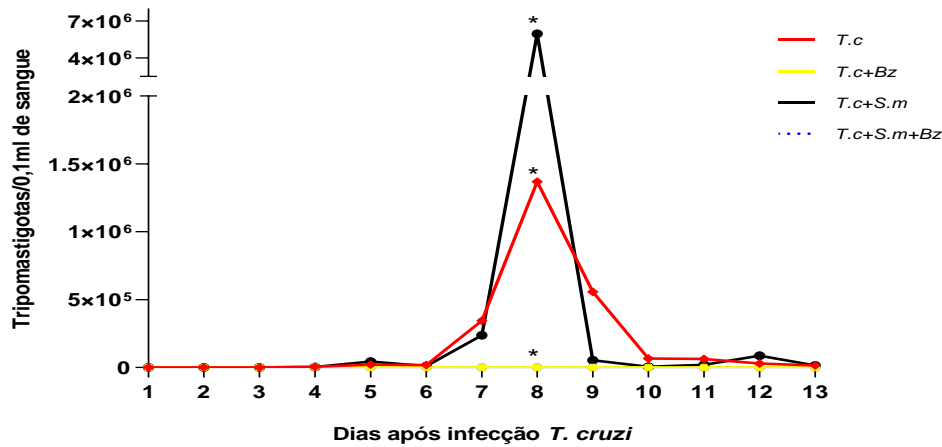
Fonte: Do autor

Legenda: As colunas mostram o número de ovos por 50mg de fezes. A cor amarela representa o grupo infectado por *S. mansoni*, a cor azul representa o grupo coinfestado sem tratamento e a cor verde apresenta o grupo coinfestado e tratado. S.m: Animais infectados com *S. mansoni*, S.m+T.c: Animais infectados com *S. mansoni* e com *T. cruzi*, S.m+T.c+Bz: Animais infectados com *S. mansoni* e *T. cruzi* e tratados com Bz.

O kato-katz mostrou que o grupo coinfestado com tratamento (T.c+S.m+Bz) apresentou maior número de ovos por grama de fezes, seguido pelo grupo com infecção única por *S. mansoni* (S.m) (Figura 2). Essa evidencia pode indicar que a coinfecção por *S. mansoni* pode aumentar a postura de ovos pelo helminto mesmo com o tratamento com Bz.

4.2 PARASITEMIA

Figura 3 – Curvas de parasitemia de camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* ou coinfetados com *S. mansoni* e submetidos ou não ao tratamento com benznidazol.



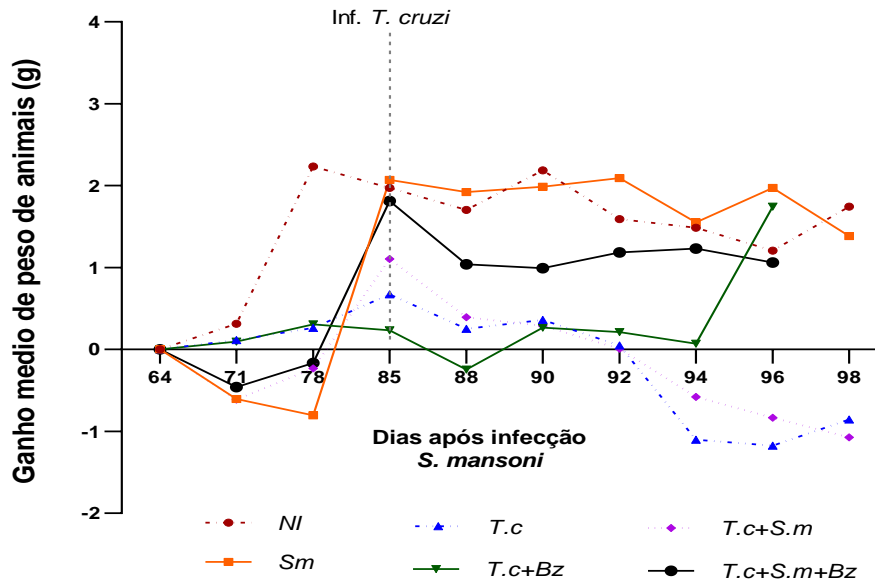
Fonte: do autor.

Legenda: Asteriscos representam diferenças estatísticas de $p < 0.0001$ entre os grupos nessa data (*Tc+Bz* vs. *Tc+S.m+Bz* sem diferenças estadísticas). *T.c*: Animais infectado com *T. cruzi*, *T.c+Bz*: Animais infectado com *T. cruzi* e tratados com *Bz*, *T.c+S.m*: Animais infectados com *T. cruzi* e com *S. mansoni*, *T.c+S.m+Bz*: Animais infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni* e tratados com *Bz*.

A infecção por *T. cruzi* foi confirmada pela parasitemia que se mostrou mais elevada entre os camundongos que foram previamente infectados por *S. mansoni*. O pico da parasitemia de *T. cruzi* para os grupos sem tratamento (*T.c*, *T.c+S.m*) apresentaram-se em oitavo dia (Figura 2). No entanto, a parasitemia do grupo coinfetado (*T.c+S.m*) foi cinco vezes mais elevada que do grupo com infecção única por *T. cruzi* (*T.c*), 1.4×10^6 e 6×10^6 respectivamente. Por outro lado, o tratamento com benznidazol foi eficaz tanto no grupo com infecção única (*T.c+Bz*) como no grupo coinfetado (*T.c+S.m+Bz*) (Figura 3).

4.3 PESOS CORPORAIS DOS CAMUNDONGOS

Figura 4 - Pesos corporais dos camundongos após infecção com *T. cruzi* em relação ao primeiro dia de pesagem.



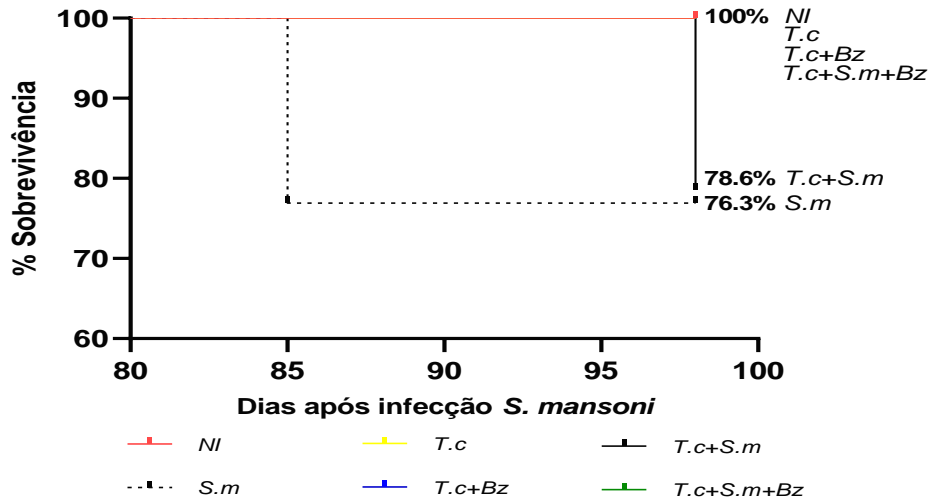
Fonte: Do autor

Legenda: A linha descontínua representa o dia do começo da infecção por *T. cruzi*. NI: Animais não infectados, Sm: Animais infectado com *S. mansoni*, T.c: Animais infectado com *T. cruzi*, T.c+Bz: Animais infectado com *T. cruzi* e tratados com Bz, T.c+S.m: Animais infectados com *T. cruzi* e com *S. mansoni*, T.c+S.m+Bz: Animais infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni* e tratados com Bz.

Quanto a pesagem dos camundongos os animais dos grupos infectados com *T. cruzi* e não tratados, os animais do grupo controle negativo (NI) e positivo para *S. mansoni* (S.m), mantiveram um peso constante após a infecção por *T. cruzi* até o final do experimento. O grupo infectado por *T. cruzi* (T.c) e não tratado perderam progressivamente peso e o grupo infectado só por *T. cruzi* e tratado com Bz (T.c+bz) apresentou um aumento de peso nas etapas posteriores (Figura 4).

4.4 PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA

Figura 5 - Porcentagem de sobrevivência de camundongos após-infecção com *S. mansoni*.



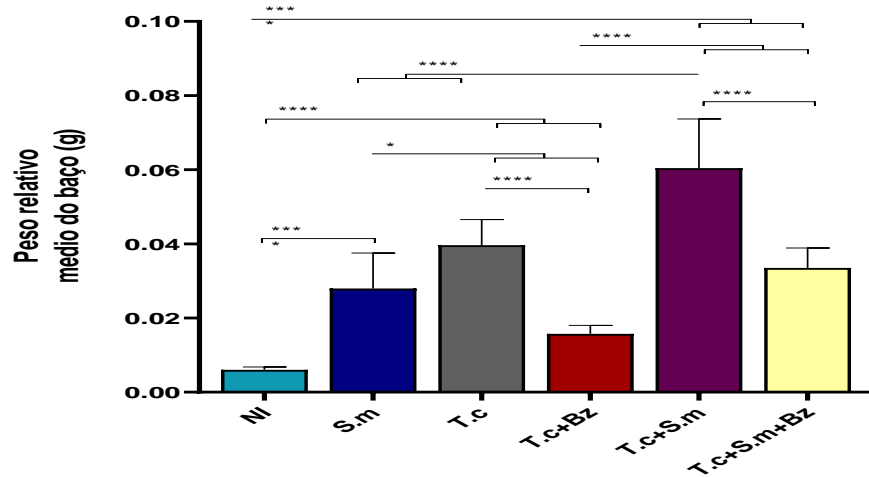
Fonte: Do autor.

Legenda: A linha descontinua representa o começo da infecção por *T. cruzi*. NI: Animais não infectados, Sm: Animais infectado com *S. mansoni*, T.c: Animais infectado com *T. cruzi*, T.c+Bz: Animais infectado com *T. cruzi* e tratados com Bz, T.c+S.m: Animais infectados com *T. cruzi* e com *S. mansoni*, T.c+S.m+Bz: Animais infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni* e tratados com Bz.

No que se refere ao registro de mortes apenas os animais com a presença do helminto apresentaram mudanças em sua sobrevivência. O grupo com infecção única por *S. mansoni* (S.m) apresentou uma sobrevivência de 76,3%, inferior ao grupo (T.c+S.m) com coinfeção e sem tratamento (78,6%). Não obstante, a sobrevivência do grupo coinfectado com tratamento (T.c+S.m+Bz) não apresentou mudanças devido ao fato que todos os animais sobreviveram até o dia da necropsia (Figura 5). A situação evidenciada por estes resultados apresentados pode ser indicativa de que o referido tratamento teve ação positiva aumentando a sobrevivência dos animais.

4.5 PESO DO BAÇO DOS CAMUNDONGOS

Figura 6 – Pesos relativos médios dos baços de camundongos 98 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.



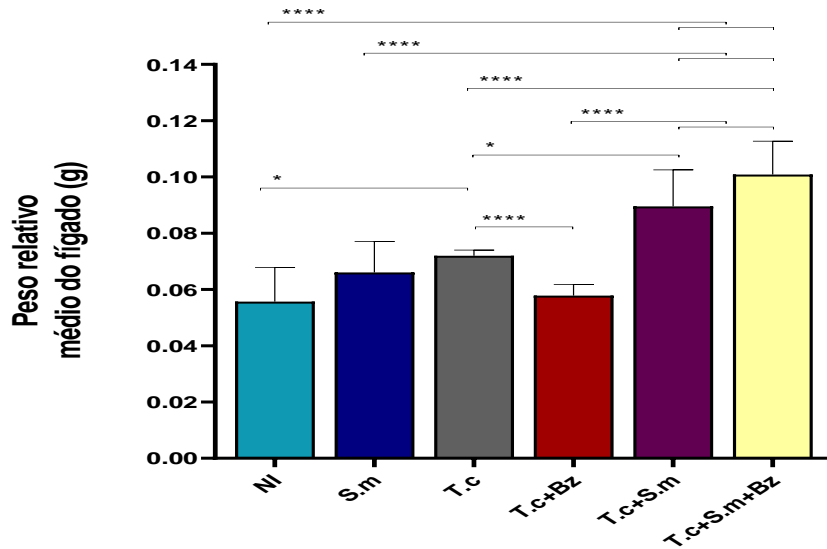
Fonte: Do autor

Legenda: As colunas mostram as medias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($*p < 0.05$; $****p \leq 0.0001$). NI: Animais não infectados, S.m: Animais infectado com *S. mansoni*, T.c: Animais infectado com *T. cruzi*, T.c+Bz: Animais infectado com *T. cruzi* e tratados com Bz, T.c+S.m: Animais infectados com *T. cruzi* e com *S. mansoni*, T.c+S.m+Bz: Animais infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni* e tratados com Bz.

Todos os grupos (S.m, T.c, T.c+Bz, T.c+S.m, T.c+S.m+Bz) apresentaram um aumento do peso do baço em comparação com o grupo controle negativo (NI). O tratamento ajudou a diminuir o impacto da infecção neste órgão, tanto no grupo com infecção única com *T. cruzi* (T.c+Bz) como no coinfetado (T.c+S.m+Bz). O grupo mais afetado quanto ao aumento do baço foi o grupo coinfetado sem tratamento (T.c+S.m+Bz), pois estes apresentaram baços com peso até cinco vezes maiores que o do grupo controle negativo (NI) seguido pelo grupo com infecção única por *T. cruzi* (T.c) (Figura 6).

4.6 PESO DO FÍGADO DOS CAMUNDONGOS

Figura 7 – Peso relativo médio dos fígados de camundongos 98 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.



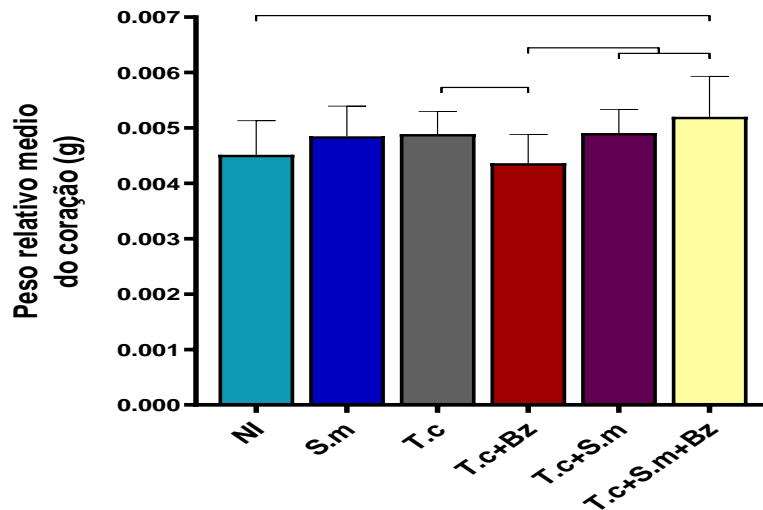
Fonte: Do autor.

Legenda: As colunas mostram as medias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas (* $p < 0.05$; **** $p \leq 0.0001$). NI: Animais não infectados, Sm: Animais infectado com *S. mansoni*, T.c: Animais infectado com *T. cruzi*, T.c+Bz: Animais infectado com *T. cruzi* e tratados com Bz, T.c+S.m: Animais infectados com *T. cruzi* e com *S. mansoni*, T.c+S.m+Bz: Animais infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni* e tratados com Bz.

Em relação ao peso do fígado registrado depois de quinze dias após a infecção de *T. cruzi* até o dia da necropsia, os grupos coinfetados (T.c+S.m, T.c+S.m+Bz) e o grupo com infecção única por *T. cruzi* em tratamento (T.c+Bz) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (NI). Enquanto que, houve uma exacerbação de hepatomegalia nos grupos coinfetados com e sem tratamento (T.c+S.m, T.c+S.m+Bz), em contraste com a infecção única por *T. cruzi* (T.c). O tratamento que se realiza nos hospedeiros coinfetados por *T. cruzi* e *S. mansoni* não evita que se desenvolva hepatomegalia (Figura 7).

4.7 PESO DO CORAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Figura 8 – Peso relativo médio do coração de camundongos 98 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.



Fonte: Do autor.

Legenda: As colunas mostram as medias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas de $P < 0.05$. NI: Animais não infectados, Sm: Animais infectado com *S. mansoni*, T.c: Animais infectado com *T. cruzi*, T.c+Bz: Animais infectado com *T. cruzi* e tratados com Bz, T.c+S.m: Animais infectados com *T. cruzi* e com *S. mansoni*, T.c+S.m+Bz: Animais infectados com *T. cruzi* e *S. mansoni* e tratados com Bz.

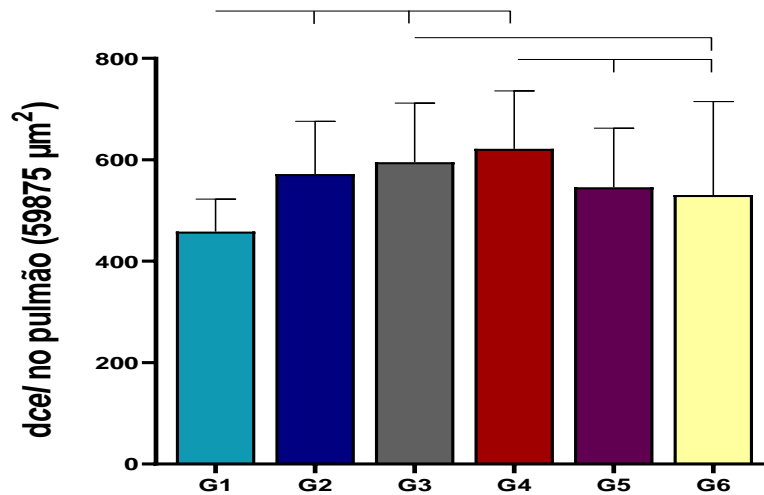
Todos os animais pertencentes a todos os grupos apresentaram pesos dos corações similares ao observado entre os camundongos do grupo controle negativo (NI). No entanto, os animais dos grupos tratados com benznidazol (T.c+Bz, T.c+S.m+Bz) registraram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre eles, sendo os coinfectedos (T.c+S.m+Bz) os que tiveram uma media superior e o de infecção única por *T. cruzi* (T.c+Bz) com uma media menor em comparação com todos os demais grupos (NI, S.m, T.c, T.c+S.m) (Figura 8).

4.8 ATIVIDADE PULMONAR DOS CAMUNDONGOS

Na Figura 9 está representado a densidade de núcleos celulares no pulmão por grupo experimental. Todos os grupos apresentaram aumento na densidade de células no pulmão comparado com o G1, sendo significativo o aumento nos grupos com infecções simples (grupos 2, 3 e 4). Os camundongos dos grupos 5 e 6 mantiveram uma densidade

celular similar a todos os grupos, mas significativamente menor se comparado aos camundongos dos grupos 3 e 4.

Figura 9 – Densidade celular (*dcel*) no pulmão de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

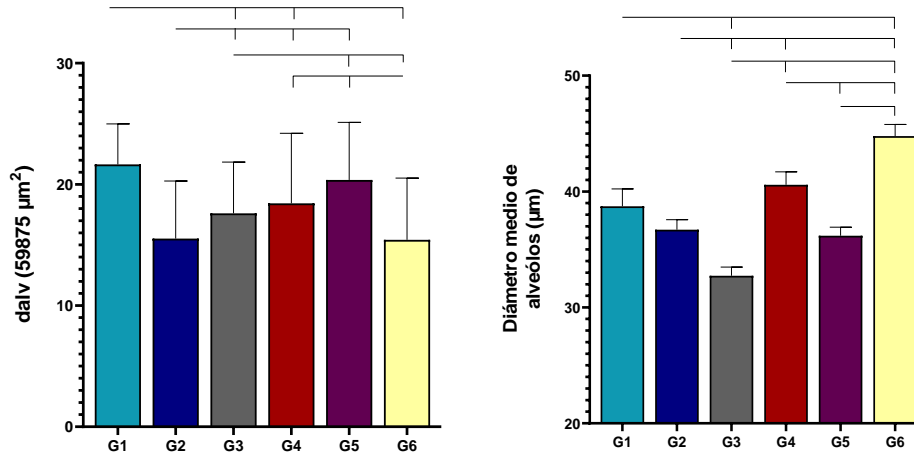


Fonte: Do autor.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

No que concerne aos outros parâmetros do pulmão avaliados, diâmetro e densidade alveolar, mostrados na Figura 10, é possível observar que para animais de alguns grupos (grupo 4 e 6) há uma relação inversa entre o diâmetro de alvéolos e a densidade dos mesmos, pois quanto maior diâmetro de alvéolos menor é a densidade. Este fato é mais evidente no G6 o qual apresentou uma média de diâmetro alveolar significativamente superior aos outros grupos com uma densidade baixa de alvéolos (Figura 10).

Figura 10 – Densidade alveolar (*dalv*) e diâmetro médio de alvéolos de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.



Fonte: Do autor.

Legenda: As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0.05$). G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol.

5 DISCUSSÃO

Ao considerar o aspecto da evolução da infecção por *T. cruzi*, a coinfeção por *T. cruzi* e *S. mansoni* pode aumentar a postura de ovos pelo helminto mesmo com o tratamento com o medicamento Bz. Isso pode acontecer devido ao fato de que no decorrer da infecção por *S. mansoni* a resposta imune entre 3 e 4 semanas é diferente da infecção crônica. No início o hospedeiro é exposto a uma resposta imune do tipo Th1 devido a imaturidade dos parasitas com a maturação dos parasitas e com a postura de ovos, que ocorre entre 5 e 6 semanas, a resposta imune passa a ser fortemente Th2 e essa resposta é induzida pelos antígenos dos ovos (DINIZ, 2009).

O presente resultado encontrado vai de encontro à literatura que demonstra que uma vacina anti esquistossomose eficiente requer forte indução de respostas do tipo Th1 e Th2 (MCMANUS; LOUKAS, 2008). A estratégia seria utilizar salmonelas atenuadas recombinantes apresentando antígenos de *S. mansoni* desenhada devido ao fato dessa forma de apresentação modular a resposta imune do tipo Th1, assim como, o *T. cruzi* que é requerida contra o verme nos seus estágios iniciais de desenvolvimento no hospedeiro. Desta forma, o aumento da resposta imune do tipo Th1 resultaria em um efeito de

bloqueio na maturação dos vermes de *S. mansoni* (DINIZ, 2009; MCMANUS; LOUKAS, 2008).

Constatou-se também na presente pesquisa que a infecção prévia por *S. mansoni* não intensifica a perda de peso entre os animais infectados unicamente por *T. cruzi*. Por tanto, não ocorre ganho de peso dos animais sob inoculação de *T. cruzi*, sendo que este achado difere de estudo realizado com ratos inoculados com a cepa Y que demonstrou perda de peso nesses animais devido a sua maior virulência (MATA et al., 2000). O resultado difere também da investigação de Rezende (2016), este traz que a esquistossomose apresenta, após a formação dos granulomas, um estabelecimento da fibrose, intensificando o aumento de órgãos como o baço e o fígado, seguido de perda de peso e chegando a alto índices de mortalidade que variam de acordo com a linhagem dos modelos experimentais.

Outro achado refere-se à mortalidade durante o período analisado e que não foi induzida pela infecção por *T. cruzi*. Na esquistossomose o maior dano tecidual está relacionado com a resposta inflamatória granulomatosa, os ovos depositados pelas fêmeas de *S. mansoni* induzem tanto a resposta imune humoral quanto a celular, sendo este responsável pelo complexo fisiopatológico que promove a formação de granulomas, fibrose hepática e hipertensão portal, podendo evoluir para o óbito (WILSON et al., 2007; LINS et al., 2008; RODRIGUES, 2016). Em estudo desenvolvido com camundongos deficientes em citocinas responsáveis pela modulação da resposta Th1 e Th2 foi observada uma resposta excessiva de Th2 e também alta taxa de mortalidade (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000).

Com relação à interação entre dois patógenos diferentes, o presente estudo investigou a evolução da infecção por *T. cruzi* em camundongos coinfectados com *S. mansoni*. Nesta investigação, os animais infectados previamente por *S. mansoni* apresentaram parasitemia mais elevada que os animais com infecção única por *T. cruzi*. Resultado este que condiz com os achados do estudo desenvolvido por Rodrigues (2016) que apresentou que no grupo com esquistossomose estabelecida, quando coinfectados por *T. cruzi*, a parasitemia foi elevada durante todo o experimento, indicando possíveis alterações no mecanismo imunológico de controle da infecção.

No que se trata do peso dos órgãos dos animais utilizados nos experimentos, os resultados encontrados neste estudo mostraram que houve hepatomegalia nos grupos coinfectados com e sem tratamento, evidenciando, assim, a possibilidade do tratamento

não evitar a hepatomegalia. Porém, no estudo de Rodrigues (2016), os animais infectados apenas por *T. cruzi* ou *S. mansoni* ou aqueles coinfectados apresentaram hipertrofia hepática em relação ao grupo controle.

Foi adicionalmente investigado o peso do baço dos animais que, conseqüentemente, apresentou-se elevado principalmente no grupo coinfectado. Esse achado foi consistente com os danos teciduais tipicamente causados pela esquistossomose (LENZI et al., 2008; ANDRADE, 2009). A resposta Th2 é importante para o controle de infecções por helminto, mas quando essa resposta Th2 é persistente pode contribuir para a patologia hepática e doença hepatoesplênica (MAIZELS et al., 2009).

Neste contexto, destaca-se que em estudo prévio com modelo murino, a coinfecção pelo *S. mansoni* e *choriomeningitis* vírus aumentou consideravelmente a susceptibilidade do fígado à replicação viral, tendo como consequência a amplificação do dano tecidual (EDWARDS et al., 2005). Além disso, a infecção por *T. cruzi* realiza uma resposta antagônica do tipo Th1, estimulando, a ação de uma resposta imune regulatória pelo *S. mansoni*, interferindo nos danos hepáticos e, com isso, o *T. cruzi* também foi capaz de induzir danos na hepatomegalia e na doença hepatoesplênica e o tratamento teve pouca contribuição para evitar o aumento do baço e do fígado dos animais (RODRIGUES, 2016).

No que se refere ao peso do coração dos animais utilizados nos experimentos, os achados do presente estudo não apresentaram cardiomegalia nos animais, confirmando o que foi constatado no estudo de Rodrigues (2016) que evidenciou a não diferença na massa relativa do coração dos animais. Com isso, infere-se que a coinfecção não induziu repercussões negativas na cardiomiopatia apesar de influenciar negativamente no controle da parasitemia.

O presente estudo constatou-se que a atividade pulmonar foi influenciada mais pela infecção por *T. cruzi* do que pela infecção por *S. mansoni*, evidenciado pelo aumento da densidade celular dos grupos experimentais quando comparado ao grupo controle e com a relação inversa entre o diâmetro de alvéolos e a densidade dos mesmos, sendo que este é notoriamente identificado no grupo coinfectado e tratado (grupo 6) que apresentou uma média de diâmetro alveolar significativamente superior aos outros grupos com uma densidade baixa de alvéolos. Estes resultados condizem com os encontrados no estudo sobre o desenvolvimento de alterações cardíacas, pulmonares e hepáticas em camundongos coinfectados com *S. mansoni* e *T. cruzi* que foi desenvolvido por Rodrigues

(2016) e apresentou que as alterações histopatológicas foram mais pronunciadas nos animais infectados por *T. cruzi* e também que todos os grupos experimentais apresentaram redução significativa da densidade de volume de alvéolos pulmonares. São escassos os estudos sobre a influência da infecção pelo *T. cruzi* na estrutura e na função do pulmão, constituindo uma área de investigação negligenciada (RODRIGUES, 2016). Existem ainda limitadas evidências que o *T. cruzi* é capaz de parasitar o tecido pulmonar, desencadeando processos inflamatórios persistentes capazes de comprometer a estrutura microscópica pulmonar (RODRIGUES, 2016; MELNIKOV et al., 2005).

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a coinfeção por *S. mansoni* pode interferir no agravamento da evolução da infecção por *T. cruzi*, principalmente no que se trata de hepatomegalia, esplenomegalia e na parasitemia e com menor intensidade no pulmão.

O presente estudo teve como limitação à quantidade de animais utilizada para a experimentação, que seria pequena para aumentar a possibilidade de utilizar mais grupos experimentais e com dosagens de medicação diferentes e com a aplicação de outros testes. Outra limitação se refere à falta de investimento financeiro para as experimentações e que permitiria aumentar as análises e testes.

Sugere-se a realização de novas investigações com diferentes dosagens do medicamento Bz, além de adicionar na pesquisa alguns grupos experimentais, como animais infectados com *S. mansoni* e tratado com Bz. Investigar também a reação contrária, ou seja, como seria a evolução da infecção por *T. cruzi* e coinfeção com o tratamento para *S. mansoni*. Seria interessante desenvolver estudos sobre a metabolização do Bz no organismo dos animais, visando analisar o possível dano hepático apresentado.

REFERÊNCIAS

- BORDES, F. The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. **Infection Ecology and Epidemiology.**, v. 1, n. 10, p.73-6, 2011.
- BOSCARDIN, S. B. et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 14, n. 6B, p. 1373-1384, 2010.
- BRASIL, **Ministério da Saúde**. Recomendações sobre o diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica. Revista Patologia Tropical. 2012.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389 - 396, 1962.
- DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.
- DINIZ, P. P. **Estudo do potencial vacinal de proteínas de Schistosoma mansoni utilizando salmonelas atenuadas recombinantes como veículo para apresentação de antígenos ao hospedeiro**. 2009. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de ciências biomédicas. Programa de pós-graduação interunidades em biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan.
- EDWARDS, M. J. et al. Reciprocal Immunomodulation in a Schistosome and Hepatotropic Virus Coinfection Model. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 10, p. 6275–6285, 4 nov. 2005.
- FERNANDES, A. L. B. et al. Doença de chagas no Brasil: panorama da incidência e prevalência entre os anos 2000 e 2013. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 5, n. 10, p. 18200-18207, 2019.
- HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the Dangers of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6406–6416, jun. 2000.
- HOTEZ, P.J. Forgotten people and forgotten diseases: the neglected tropical diseases and their impact on global health and development. Washington (D.C.): **ASM Press**, v. 15, n. 3, p. 510 – 511, 2008.
- JUNQUEIRA, L. C. .; JUNQUEIRA, L. M. M. . **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, v. 8, p. 3, 1983.

KATZ, N., CHAVES, A., PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

LENZI, H. L. et al. Patologia Experimental com Enfoque no Granuloma Esquistossomótico. In: **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: editora fiocruz, V. 20, p. 569–654. 2008.

LINS, R. A. B. et al. [Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 173–8, 2008.

LIU, R. et al. Efficacy of praziquantel and artemisinin derivatives for the treatment and prevention of human schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 201, p. 201, 17 out. 2011.

MACHADO, C.M. et al. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 9, n. 6, p. 324, 2009.

MAIZELS, R. M. et al. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 10, p. 2059–2066, 2009.

MATA, J. R. et al. Trypanosoma cruzi infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes, and the brain reaction to parasitism. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 2, p. 153-162, 2000.

MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for Schistosomiasis. **Revista Clínica Microbiologia** v. 21, n. 1, p. 225 – 242, 2008.

MELNIKOV, V. G. et al. Pathologic Changes in lungs caused by mexican isolates of Trypanosoma cruzi in the acute phase of infection in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 301–306, 2005.

NETO, E. C; CHEVILLARD, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. **Hindawi Publishing Corporation**. v. 4, n. 201, out. 2014.

NUNES, M.C.P. et al. Chagas Disease An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p.767 – 776, 2013.

REZENDE, M. C. **Alterações imunopatológicas induzidas pela co-infecção entre Schistosoma mansoni e Strongyloides venezuelensis em camundongos**. 2016. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

RODRIGUES, J. P. F. **Desenvolvimento das alterações cardíacas, hepáticas e pulmonares em camundongos coinfectados com Schistosoma mansoni e trypanosoma cruzi**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Biociências Aplicadas à Saúde Universidade Federal de Alfenas, 2016.

RODRIGUES, J. P. F. et al. *S. mansoni*-*T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 66, p. 43–52, jun. 2017.

SILVA, M. R. et al. Educação em saúde sobre parasitoses: um relato de experiência. **Revista Científica Univiçosa**, Viçosa, v. 10, n. 1, p. 1061 – 1067, 2018.

TIBIRIÇA, S. H.; GUIMARÃES, F. B.; TEIXEIRA, M. T. B. A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 1375-1381, 2011.

UTZINGER J. et al. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1859-1874, 2009.

VIEIRA, P. M. D. A. et al. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental chagas disease. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 148–154, 2007.