

Nayra Suélen Gomes Dias Alves

Modulação da microbiota intestinal: estratégia para elucidar a patogênese da
doença de Chagas em modelo murino

Brasília, 2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Nayra Suélen Gomes Dias Alves

Modulação da microbiota intestinal: estratégia para elucidar a patogênese da
doença de Chagas em modelo murino

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas (Ciências Aplicadas em Saúde) pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Mariana Machado Hecht

Brasília

2024

Nayra Suélen Gomes Dias Alves

Modulação da microbiota intestinal: estratégia para elucidar a patogênese da
doença de Chagas em modelo murino

Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de
Doutora em Ciências Médicas
(Ciências Aplicadas em Saúde) pelo
programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Universidade de
Brasília.

Orientadora: Mariana Machado Hecht

Banca Examinadora

Dra. Mariana Machado Hecht (Orientadora)
Universidade de Brasília
Dra. Glória Ester Cadavid Restrepo (Membro)
Universidade de Brasília
Dra. Ester Cardoso Paes Rose (Membro)
Universidade do Distrito Federal
Dra. Tamires Emanuele Vital (Membro)
Unyleya
Dra. Tayane Ferreira Nobre (Suplente)
IGES-DF

AGRADECIMENTOS

Na fase final desse longo processo, que acredito ter começado ainda na graduação, o desejo de pesquisar, este espaço seria insuficiente para expressar toda a minha gratidão às pessoas que participaram direta ou indiretamente do meu desenvolvimento como profissional e pesquisadora.

Agradeço primeiramente a Deus, que me guiou e concedeu sabedoria e persistência em uma jornada que não foi fácil. À minha família, que sempre me apoiou: meus pais e meu irmão, que ajudaram a revisar textos, foram pacientes e sempre me incentivaram e incentivam até hoje.

À minha orientadora, Mariana Hecht, meu exemplo desde os tempos do TCC em 2016, que demonstrou paciência, versatilidade e liberdade na condução dos trabalhos de forma brilhante. Saiba que você é uma inspiração.

Aos meus amigos de laboratório, que me ensinaram tanto, e a todos do Laboratório Multidisciplinar de Biociências da UnB. Em especial, agradeço à Aline, companheira durante a pandemia da Covid-19, assim como à Marcelle, aos veterinários Rafael e Mariana e suas equipes, que se dispuseram a me auxiliar.

Agradeço à Marina, que me ajudou desde o seu PIBIC até o mestrado, assim como a Carlito, Andressa, Nélio, Moisés, Tamires e Bruna. A todos os professores Lou, Nadjar, Juliana e Rodrigo, que sempre estiveram disponíveis para apoiar, auxiliar e aprimorar o trabalho, e ao Dallago, com toda a sua paciência e disposição.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e me escutaram, como Andressa, Nélio, Thais e Gislane. Ao Felipe, que, nos últimos dois anos, tem sido um companheiro incansável, incentivando-me e, principalmente, sendo compreensivo em relação às horas dedicadas ao doutorado.

Por fim, a todos, mesmo não citados, que participaram da construção deste trabalho: construir um trabalho de mestrado ou doutorado não é fácil. Recursos limitados, idas a laboratórios distintos, empréstimos, doações e a necessidade de conciliar a jornada de trabalho tornam o caminho desafiador. A todos que, mesmo com uma palavra, me apoiaram ou ajudaram, o meu muito obrigada.

RESUMO

A doença de Chagas (DC), causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma doença tropical negligenciada com significativas implicações para a saúde global, afetando milhões de pessoas e levando a manifestações clínicas graves, como mega síndromes cardíacas e digestivas. Embora os danos teciduais induzidos pelo parasita e as respostas imunomediadas sejam reconhecidos como importantes contribuintes para a patogênese da DC, o papel da microbiota intestinal permanece pouco explorado. Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto da depleção da microbiota induzida por antibióticos na carga parasitária, nas respostas imunes e nos desfechos clínicos em modelos murinos de DC. Camundongos BALB/c receberam um coquetel de antibióticos antes da infecção com as cepas Colombiana ou CL Brener de *T. cruzi*. A carga parasitária foi quantificada por qPCR aos 30 e 100 dias pós-infecção (dpi), as respostas imunológicas foram avaliadas por citometria de fluxo e ELISA, e análises histopatológicas foram realizadas nos tecidos cardíacos e intestinais. Análises de correlação foram conduzidas para avaliar as relações temporais entre a depleção da microbiota e as interações hospedeiro-parasita. A administração de antibióticos revelou novas correlações. Nos camundongos infectados com a cepa colombiana a depleção da microbiota impactou no quantitativo de *Bifidobacterium*, de forma diferente dos animais infectados com a cepa CL Brener cuja o efeito foi sobre *Lactobacillus*. Além disso a depleção da microbiota promoveu redução da carga parasitária detectada no coração e no intestino que não se manter na fase crônica em animais infectados com a cepa Colombiana. Notavelmente, a redução de gêneros bacterianos específicos, como *Bacteroides* e *Bifidobacterium*, direcionou a resposta imune para um perfil mais pró-inflamatório. Anticorpos direcionados contra antígenos de *T. cruzi* e do hospedeiro exibiram uma função dupla desempenhando um papel tanto na reparação tecidual quanto na exacerbação do dano, independentemente do tratamento com antibióticos. Esses achados ressaltam a importância de considerar tanto fatores microbianos quanto específicos das cepas na patogênese da DC. Pesquisas adicionais são necessárias para elucidar as implicações de longo prazo da manipulação da microbiota, que pode ter potencial para estratégias terapêuticas voltadas para a melhoria dos desfechos clínicos em pacientes com DC.

Palavras-chave: Doença de Chagas; cepas de *Trypanosoma cruzi*; microbiota intestinal; antibióticos; resposta imunológica; carga parasitária; inflamação tecidual; análise de correlação

ABSTRACT

Chagas disease (CD), caused by *Trypanosoma cruzi*, is a neglected tropical disease with significant global health implications, affecting millions of people and leading to severe clinical manifestations such as cardiac and digestive megasyndromes. While parasite-induced tissue damage and immune-mediated responses are well-recognized contributors to CD pathogenesis, the role of the intestinal microbiota remains underexplored. This study aimed to evaluate the impact of antibiotic-induced microbiota depletion on parasite burden, immune responses, and clinical outcomes in murine models of CD. BALB/c mice were administered a broad-spectrum antibiotic cocktail prior to infection with either the *T. cruzi* Colombiana or CL Brener strains. Parasite burden was quantified using qPCR at 30- and 100-days post-infection (dpi), immune responses were assessed via flow cytometry and ELISA, and histopathological analyses were performed on cardiac and intestinal tissues. Correlation analyses were conducted to evaluate the temporal relationships between microbiota depletion and host-parasite interactions. Antibiotic administration uncovered novel correlations. In Colombiana strain-infected mice, the antibiotic cocktail predominantly affected interactions with *Bifidobacterium* populations, whereas in CL Brener-infected mice, novel associations with *Lactobacillus* were identified. Microbiota modulation initially led to a reduction in parasite burden in the heart and intestine, followed by an increase during the chronic phase. An exception was observed in the gut of CL Brener-infected mice, where an early increase in parasite burden was followed by a decline at 100 dpi. Notably, the reduction of specific bacterial genera, such as *Bacteroides* and *Bifidobacterium*, shifted the immune response towards a more pro-inflammatory profile. Antibodies targeting *T. cruzi* and host antigens exhibited a dual function, playing a role in both tissue repair and exacerbation of damage, irrespective of antibiotic treatment. These findings underscore the importance of considering both microbial and strain-specific factors in CD pathogenesis. Further research is warranted to elucidate the long-term implications of microbiota manipulation, which may hold potential for therapeutic strategies aimed at improving clinical outcomes in CD patients.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi* strains; gut microbiota; antibiotics; immune response; parasite burden; tissue inflammation; correlation analysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Regiões endêmicas e não endêmicas para doença de Chagas..	12
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 3. Distribuição das DTUs nas regiões endêmicas.	18
Figura 4. Curso clínico da doença de Chagas em humanos e camundongos	20
Figura 5. A patogênese da doença de Chagas	23
Figura 6. Perfil imunológico dos estágios cardíacos agudo e crônico da doença de Chagas	25
Figura 7. Grupos experimentais	41
Figura 8. Eficácia do coquetel de antibióticos e impacto da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> na microbiota intestinal de camundongos tratados.....	47
Figura 9. A estratégia de antibióticos mediada pela microbiota impacta a carga de <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
Figura 10. Produção de citocinas em camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com antimicrobianos.	51
Figura 11. Avaliação de anticorpos em camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com antimicrobianos.....	53
Figura 12. Resposta inflamatória em camundongos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com antibióticos.....	55
Figura 13. Análise de rede de correlação de Pearson dos parâmetros microbiota e associados ao hospedeiro durante a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em camundongos tratados com antibióticos	58
Figura 14. Análise de componentes principais de marcadores de patogênese em um modelo murino de doença de Chagas sob tratamento com antibióticos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BNZ- Benznidazol

DC- Doença de Chagas

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DPI- Dias pós infecção

DTUs- Unidades discretas de tipagem

ELISA- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

GALT- Tecido Linfoide Associado ao Trato Gastrointestinal

OMS- Organização Mundial da Saúde

qPCR- PCR Quantitativa em tempo real

Tc- Trypanosoma cruzi

SUMÁRIO

1. DOENÇA DE CHAGAS	11
1.2 Histórico	11
1.3 Epidemiologia da doença de Chagas	12
1.4 Vias de transmissão	13
1.5 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.6 Unidades discretas de tipagens	16
1.7 Manifestações clínicas e alterações histopatológicas	18
1.8 Diagnóstico e tratamento	20
1.9 A patogênese da doença de Chagas	22
1.10 Resposta imune	23
2. MICROBIOTA INTESTINAL.....	25
2.1 Aspectos gerais da microbiota intestinal	25
2.2 Microbiota intestinal saudável	28
2.1.1 <i>Lactobacillus.sp</i>	29
2.2.2 <i>Bifidobacterium spp</i>	30
2.2.3 <i>Bacteroides sp</i>	31
2.3 Microbiota intestinal em camundongos.....	31
2.4 Impacto do uso de antimicrobianos	32
2.5 Microbiota intestinal e sua relação com doenças parasitárias	33
2.6 Microbiota intestinal e sua relação com o <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
3. JUSTIFICATIVA.....	38
4. OBJETIVO GERAL.....	39
4.1 Objetivos específicos	39
5. METODOLOGIA	40
5.1 Grupo experimental.....	40
5.2 Tratamento antimicrobiano	41
5.3 Infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> e coleta de amostras	42
5.4 Avaliação da composição da microbiota intestinal	42
5.5 Eutanásia dos animais.....	43
5.6 Citometria de fluxo.....	44
5.7 Dosagem de anticorpos por ELISA.....	44
5.8 Análise histológica.....	45
5.9 Análise estatística.....	45
6. RESULTADOS	46

6.1	O coquetel de antibióticos induz eficazmente uma redução duradoura na microbiota intestinal.....	46
6.2	Impacto da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> na microbiota intestinal em camundongos com microbiota modulada pelo uso de antibióticos	46
6.3	Alterações dependentes da cepa na carga parasitária após a depleção da microbiota intestinal.....	48
6.4	O tratamento com antibióticos tem impacto limitado na resposta imune ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
6.5	Efeito do tratamento com antibióticos na inflamação cardíaca e intestinal em doença de Chagas experimental	54
6.6	Análise de correlação	56
6.7	Componentes principais do impacto de antibióticos na doença de Chagas ..	60
7.	DISCUSSÃO	62
7.1	Eficiência do uso de antimicrobianos na modulação da microbiota intestinal	62
7.2.	Análise univariada do Impacto do uso de antimicrobianos em animais infectados com o <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
7.2.1	Carga parasitária na infecção pelo <i>T.cruzi</i>	63
7.2.2	Resposta imune a infecção pelo <i>T.cruzi</i>	64
7.3.	Padrões e tendências observados nos modelos de análises complexas.....	66
7.1	Camundongos Infectados com a Cepa Colombiana	68
7.2	Camundongos Infectados com a Cepa CL.Brener	70
8.	CONCLUSÃO	72
9.	PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
10.	APÊNDICE.....	84

1. DOENÇA DE CHAGAS

1.2 Histórico

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta em 1909 pelo médico sanitário brasileiro Carlos Chagas. Durante uma expedição ao estado de Minas Gerais para combater a malária, Chagas recebeu relatos de um inseto que picava pessoas, causando doenças. Investigando os hábitos desse inseto, popularmente chamado de barbeiro, Chagas observou que ele habitava casas com paredes de barro e sem acabamento. O barbeiro, de hábitos noturnos, saía à noite para se alimentar de sangue, preferencialmente picando o rosto das pessoas, e liberava fezes contaminadas com o parasito recém-descoberto, o *Trypanosoma cruzi* (*Tc*) (CHAGAS, 1909; CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

Após capturar e dissecar os insetos, os pesquisadores identificaram formas flageladas do parasito no intestino do barbeiro. Em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, experimentos em cobaias revelaram a presença do protozoário no sangue periférico dos animais infectados, além de diferentes manifestações clínicas. A equipe de Chagas descreveu detalhadamente a morfologia do protozoário no sangue humano e em cobaias, os diferentes estágios de vida, aspectos epidemiológicos e manifestações clínicas. O primeiro caso humano descrito foi o de uma menina de dois anos chamada Berenice, na qual Chagas identificou o protozoário no sangue periférico (CHAGAS, 1909).

Embora a doença tenha sido descoberta e descrita apenas em 1909, estudos mostram que a infecção pelo *T. cruzi* ocorre há milhares de anos. Pesquisas moleculares identificaram o DNA do parasito em múmias andinas com cerca de 9.000 anos. Com técnicas de PCR em tempo real, foi detectada a presença do DNA do *T. cruzi* em tecidos moles de múmias do Norte do Chile e Sul do Peru, com uma positividade de cerca de 40% em um grupo de 243 múmias. Esses achados reforçam a longa história da DC nas Américas (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004).

1.3 Epidemiologia da doença de Chagas

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 6 milhões de pessoas estejam infectadas com o protozoário *T. cruzi*, a maioria residindo na América Latina. Estima-se que cerca de 30 mil novos casos e aproximadamente 12 mil mortes por ano, o que gera um elevado ônus para a saúde pública. Mais de 75 milhões de pessoas estariam sob risco de infecção (WHO, 2024), conforme distribuição epidemiológica apresentada na Figura 1.

O aumento da imigração de indivíduos de áreas endêmicas para diferentes localidades ao redor do mundo, principalmente para os Estados Unidos da América e Europa, tem resultado na elevação de casos da DC nesses locais (SUÁREZ *et al.*, 2022). Esse movimento migratório gera novos desafios para os sistemas de saúde desses países, que muitas vezes não estão preparados para lidar com o diagnóstico e tratamento de uma doença negligenciada, tipicamente associada a regiões pobres da América Latina. Atualmente, existem 44 países com casos relatados da DC (WORLD, 2024).



Figura 1. Regiões endêmicas e não endêmicas para doença de Chagas. Distribuição mundial de casos da DC no mundo. Fonte: Adaptada de WHO (2020).

1.4 Vias de transmissão

A principal rota de transmissão do *T. cruzi* está associada ao repasto sanguíneo dos triatomíneos, hemípteros hematófagos popularmente conhecidos como barbeiros, os quais são os hospedeiros intermediários e vetores do parasito (MWANGI *et al.*, 2023). Ao longo dos anos, esses insetos se adaptaram ao ambiente, resultando em uma mudança no perfil de transmissão, passando de peridoméstica para doméstica e de áreas predominantemente rurais para urbana, podendo ser adquirida por distintas vias de transmissão (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

Dentre as vias de transmissão não vetorial, a transmissão oral vem ganhando grande importância epidemiológica nos últimos anos, devido a casos relacionados à ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com fezes de barbeiros infectados com o parasito, notadamente alimentos *in-natura* ou com baixo processamento, como açaí e sucos de frutas contaminados (LÓPEZ-GARCÍA; GILABERT, 2023). Vale destacar que a infecção por essa via tem resultado em manifestações clínicas mais graves, como febre persistente e insuficiência cardíaca e uma taxa de mortalidade mais elevada em relação à infecção pela via vetorial (VELÁSQUEZ-ORTIZ; RAMÍREZ, 2020).

Outras vias de transmissão são consideradas importantes em regiões sem transmissão autóctones e em regiões com a transmissão vetorial controlada, como a congênita, por meio de transplante de órgãos e a transfusional (BERN, 2015; DIAS *et al.*, 2016; GOMES, C. *et al.*, 2019), sendo esta última predominante em países não endêmicos, como os Estados Unidos das Américas, Espanha, Canadá e Bélgica. Em países endêmicos, o controle para DC é obrigatório nos bancos de sangue (SHIKANAI YASUDA, 2021). Além disso, considera-se a possibilidade de transmissão por via sexual, a qual ainda precisa ser comprovada em seres humanos (RIOS *et al.*, 2018).

1.5 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

O *Tc* agente etiológico da DC, é um protozoário flagelado do tipo heteróxico. Durante seu ciclo de vida, o parasito alterna entre um hospedeiro vertebrado, normalmente mamífero, e um invertebrado, o triatomíneo, e diferenciando-se em três formas evolutivas principais: amastigota, tripomastigota

e epimastigota, todas com características específicas dentro do ciclo biológico deste protozoário (CHAGAS, 1909; LIDANI *et al.*, 2017).

A infecção do triatomíneo inicia-se quando este inseto vetor realiza seu repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado e, juntamente com o sangue, ingere as formas tripomastigotas circulantes. Estas se direcionam para o intestino anterior do inseto, onde se transformam na forma epimastigota. Uma vez no intestino médio do inseto, as formas epimastigotas se multiplicam por fissão binária e parte delas se diferencia na forma infectante (tripomastigotas metacíclicas). Assim, em um próximo repasto sanguíneo, enquanto o vetor está se alimentando, ocorre a distensão de seu abdômen e a liberação das formas infectantes nas fezes, as quais poderão penetrar o hospedeiro vertebrado em regiões de mucosa ou conjuntiva, ou no sítio da picada (LIDANI *et al.*, 2017).

No hospedeiro vertebrado, uma vez que as formas tripomastigotas estejam na corrente sanguínea, elas apresentam a capacidade de infectar uma variedade de tipos celulares, onde evadem o vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em formas amastigotas intracelulares, multiplicam-se por fissão binária e, posteriormente, se diferenciam novamente em formas tripomastigotas, que irão romper as células hospedeiras, voltado à corrente sanguínea, podendo começar um novo ciclo de infecção celular. Alternativamente, em um novo repasto sanguíneo, o triatomíneo poderá se infectar, perpetuando o ciclo de vida do protozoário (LIDANI *et al.*, 2017), como demonstrado na Figura 2.

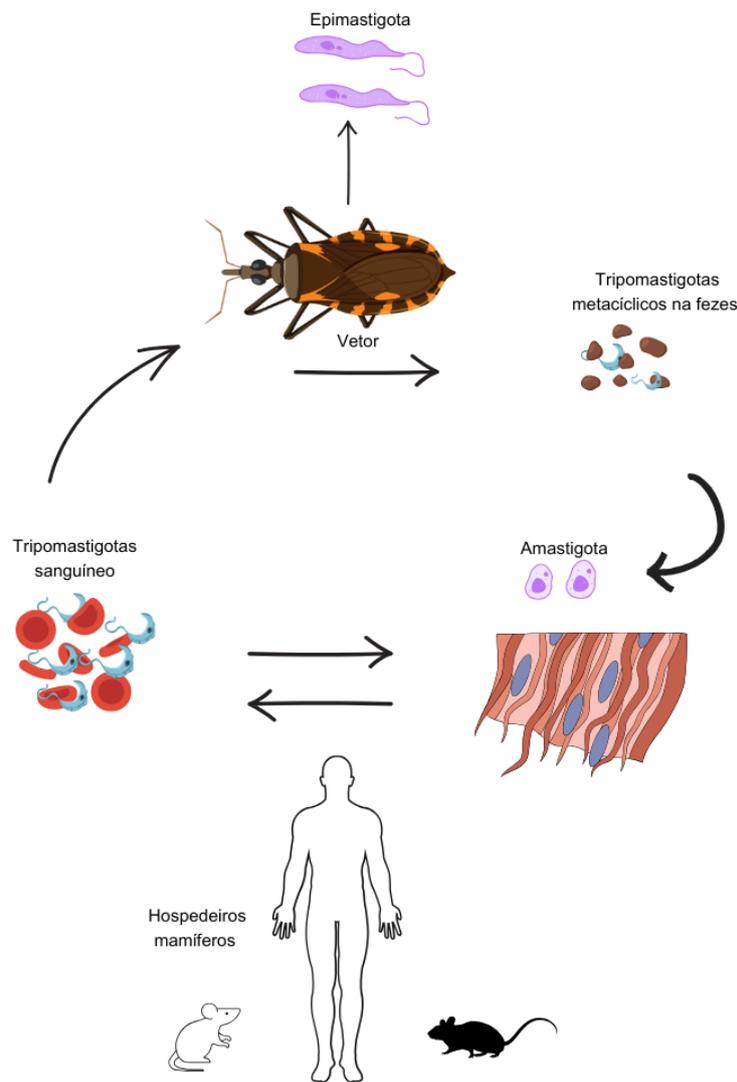


Figura 2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Após o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero, o vetor libera fezes contendo as formas tripomastigotas metacíclicas próximo ao local da picada. Assim, o parasito é capaz de penetrar no sítio da picada ou em áreas de mucosa, como a ocular. Uma vez dentro da célula, o parasito se diferencia em formas amastigotas, que iniciam vários ciclos de multiplicação no citoplasma. Em seguida, ocorre um novo processo de diferenciação, onde o parasito se transforma em formas tripomastigotas, que rompem as células e são liberadas no meio extracelular, podendo iniciar novos ciclos de infecção de células vizinhas ou adentrando na corrente sanguínea. No vetor, ao chegar ao intestino, as formas tripomastigotas se convertem em epimastigotas, que após vários ciclos de multiplicação, se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneo. O ciclo se completa quando o inseto infectado realiza um novo repasto sanguíneo, liberando as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes em suas fezes na pele do hospedeiro vertebrado. Fonte: próprio autor

1.6 Unidades discretas de tipagens

O *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e subgênero *Schizotrypanum*. Existem diversas cepas desse parasito, que são agrupadas em unidades discretas de tipagem (DTUs) de acordo com seus aspectos biológicos e genéticos (ZINGALES *et al.*, 2012). Atualmente, são descritas sete DTUs distintas (TcI a TcVI e TcBat), com diferenças quanto à virulência, manifestações clínicas e resistências a medicamentos (ZINGALES, 2018).

Ademais, as diferentes DTUs também possuem distribuição geográfica distinta, assim como a predominância em ciclos doméstico ou silvestre, embora não haja um marcador genético que possa ser usado para uma discriminação mais precisa. É interessante notar que as DTUs TcV e TcVI, que raramente são encontradas no ciclo silvestre, mostram ser predominantes no ciclo doméstico em países da América do Sul (ZINGALES; MACEDO, 2023). Assim, acredita-se que exista uma correlação entre vetor-DTU na transmissão durante o ciclo doméstico (ZINGALES; BARTHOLOMEU, 2021).

Em relação à importância clínica, as DTUs com o maior número de casos de infecção em humanos são TcI, TcII, TcV e TcIV, todas com capacidade de causar o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica. Já os casos de síndromes digestivas são mais frequentemente relatados em infecções causadas por representantes de TcII, TcV e TcVI (ZINGALES *et al.*, 2012; ZINGALES; MACEDO, 2023). Vale ressaltar que, no que tange à infecção em humanos, a depender da endemia, a infecção do hospedeiro pode ocorrer por representantes de DTUs distintas, podendo ocasionar doença cardíaca ou digestiva crônica mais grave (ZINGALES; MACEDO, 2023).

De interesse para o presente trabalho, a cepa Colombiana pertence à DTU TcI, que possui relatos de existência entre 16 a 36 milhões de anos atrás, com ampla distribuição, englobando a maior parte dos casos de DC na Venezuela e na Colômbia, com ocorrências relatadas também no norte da América do Sul e nos Estados Unidos das Américas. Além disso, é caracterizada por ampla diversidade genética, associada a casos de cardiomiopatia

(ZINGALES; BARTHOLOMEU, 2022). Outros representantes dessa DTU são as cepas *Sylvio-X10* e TCC (ZAGO *et al.*, 2016; ZINGALES *et al.*, 2012).

Já a cepa CL Brener, isolada na FIOCRUZ, Belo Horizonte, pertencente à DTU TcVI. É uma cepa híbrida que foi caracterizada em 1997 quanto à curva de parasitemia, suscetibilidade aos medicamentos disponíveis, além da resposta à infecção em cultura celular e *in vivo*. Essa cepa tem preferência por parasitar o coração e células musculares (ZINGALES *et al.*, 1997). A cepa CL Brener teve seu genoma sequenciado em 2005, sendo revelada a existência de um genoma repetitivo de aproximadamente 110 Mb, com cerca de 22.570 genes (TEIXEIRA, S. M.; EL-SAYED; ARAÚJO, 2011).

Estudo conduzido por DANTAS *et al.*, 2021, demonstrou que camundongos Swiss infectados com a cepa Colombiana apresentaram altos níveis de parasitemia e 100% de mortalidade, enquanto que camundongos infectados com a CL Brener apresentaram níveis intermediários de parasitemia e mortalidade de 40% (QUEIROGA *et al.*, 2021). Dessa forma, é importante considerar que as características genéticas da cepa infectante influenciam diretamente na resposta imune e manifestações clínicas (ZINGALES; BARTHOLOMEU, 2022). Na Figura 3, é possível verificar a distribuição das cepas DTU de *T. cruzi* na América Latina e sua associação com os principais sintomas da DC.



Figura 3. Distribuição das DTU nas regiões endêmicas. O mapa mostra a presença de diferentes unidades de tipagem discreta (DTUs) de *Trypanosoma cruzi* humano no México e em países da América Central e do Sul e sua associação com as manifestações clínicas. CCC: cardiomiopatia crônica de Chagas; DIG: forma digestiva da doença. Fonte: Adaptado de Zingales; Bartholomeu (2022).

1.7 Manifestações clínicas e alterações histopatológicas

As manifestações clínicas da DC e as alterações histopatológicas associadas à infecção variam conforme a fase da doença e o modelo de estudo. Em humanos, a infecção por *T. cruzi* não resulta em sintomas durante a fase aguda na maioria dos casos. Pacientes sintomáticos geralmente apresentam quadros auto-resolutivos e inespecíficos, como febre, mialgia, diarreia, dor de cabeça, linfadenopatia e esplenomegalia, frequentemente confundidos com outras infecções. Em alguns casos, a infecção pode ser evidenciada por um edema bupalpebral, conhecido como sinal de Romaña, ou por um chagoma no local da inoculação, presentes em menos de 50% dos casos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A fase aguda em humanos dura cerca de 8-10 semanas, caracterizada por alta parasitemia detectável no sangue, seguida por um período de baixa

parasitemia e estabelecimento da fase crônica indeterminada, sem sinais e sintomas. No entanto, cerca de 30-40% dos indivíduos desenvolvem a fase crônica sintomática, com acometimento do coração e intestino, manifestando-se como cardiomiopatia crônica (insuficiência cardíaca, arritmias, morte súbita) e mega síndromes (megacólon e megaesôfago) (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; ECHAVARRÍA et al., 2021; MARIN-NETO et al., 2022; DE SOUSA et al., 2024).

Pacientes com megacólon apresentam constipação crônica, enquanto aqueles com megaesôfago podem necessitar de terapias dietéticas, medicamentosas ou, em casos graves, de cirurgia de esofagectomia (QUEIROGA *et al.*, 2021). As alterações histopatológicas em humanos também variam de acordo com a fase da infecção. Na fase aguda, além de infiltrados inflamatórios, é comum encontrar o parasito em sua forma amastigota nos tecidos, especialmente no coração.

Na fase crônica, os achados histológicos incluem infiltrados inflamatórios, principalmente de células T e macrófagos, ausência do parasito e a presença de fibrose focal ou difusa, necrose e edema no miocárdio. Essas alterações são típicas em pacientes diagnosticados décadas após a infecção inicial, refletindo a progressão lenta e insidiosa da doença (BONNEY *et al.*, 2019). Em camundongos, as manifestações clínicas são menos evidentes, sendo raras as mega síndromes (GUARNER, 2019).

Processos inflamatórios e lesões teciduais são mais sutis (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000). Wesley et al. (2019) observaram que camundongos BALB/c infectados apresentavam infiltrados linfocitários moderados no coração durante a fase crônica, com baixo grau nos tecidos intestinais. Já Domingues et al. (2020) não encontraram alterações histopatológicas no intestino dos camundongos avaliados. (DOMINGUES *et al.*, 2020; WESLEY, Moisés *et al.*, 2019). O curso natural da DC pode ser observado na Figura 4.

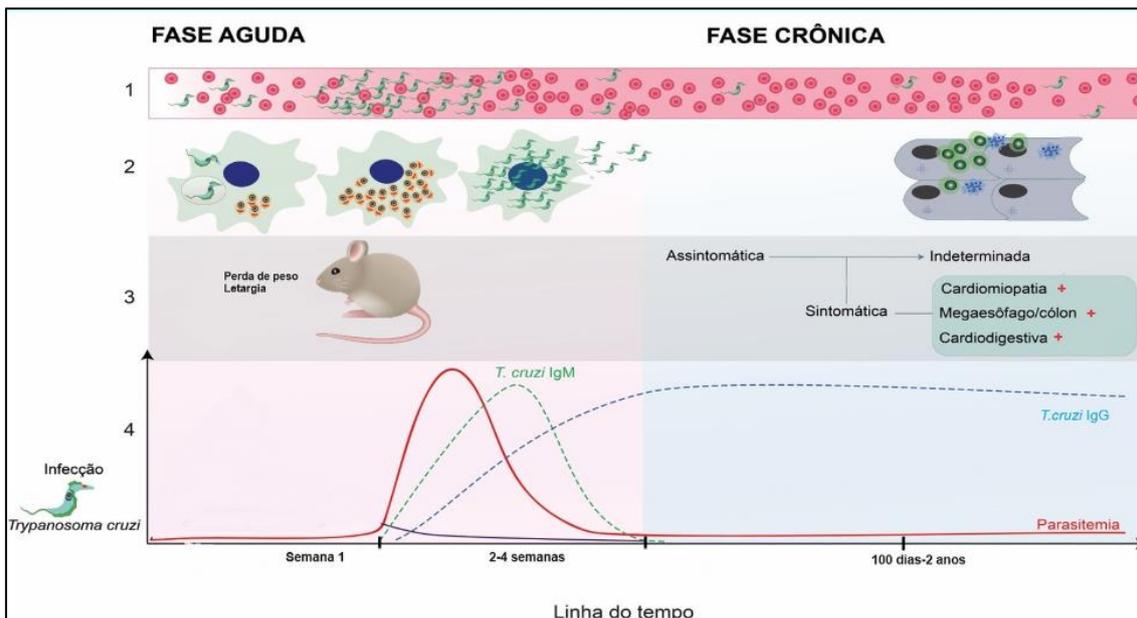


Figura 4. Curso clínico da doença de Chagas em humanos e camundongos. Tanto em humanos como em camundongos a infecção aguda é caracterizada por alta parasitemia sanguínea, sendo relativamente fácil de encontrar formas tripomastigotas, passando para a fase crônica com baixa parasitemia sanguínea. 2- Nos tecidos a infecção apresenta formação de ninhos de amastigotas de forma mais evidente na fase aguda em ambos os modelos de infecção sendo que na fase crônica existe uma menor quantidade detectável de ninhos de amastigota nos tecidos, mas é possível encontrar danos teciduais. 3- Em humanos a sintomatologia na fase aguda é bastante inespecífica, com exceção do sinal de Romaña ou Chagoma (quando presente). Em camundongos, durante a fase crônica os animais raramente apresentam desenvolvimento das megas síndromes, quando comparados aos seres humanos. 4- Durante a infecção, há inicialmente a produção de anticorpos IgM, seguida pela produção de anticorpos IgG. Em humanos, a fase aguda dura até aproximadamente 30 dias, e a fase crônica se estabelece em seguida, podendo perdurar toda a vida do indivíduo, de forma assintomática (em cerca de 70% dos casos) ou de forma sintomática (em 30% dos casos). Em camundongos, a fase crônica se inicia por volta dos 90 dias pós-infecção, podendo durar dois anos ou o tempo de vida do modelo experimental. Fonte: Adaptado de Lindani *et al.*, 2017; Bona *et al.*, 2018

1.8 Diagnóstico e tratamento

Os exames laboratoriais utilizados para diagnosticar a DC variam conforme a fase da doença em que o paciente se encontra e podem ser classificados em três categorias: parasitológicos, sorológicos e moleculares (DE SOUSA *et al.*, 2024). Na fase aguda da DC, o diagnóstico deve ser confirmado por testes laboratoriais que priorizem a detecção direta dos parasitos. O exame parasitológico direto é considerado o "padrão ouro". Os métodos mais comuns incluem o exame a fresco, gota espessa e esfregaço (WHO 2018).

Já na fase crônica, seja sintomática ou indeterminada, o diagnóstico geralmente é baseado em testes sorológicos, devido à baixa quantidade de parasitos no sangue, o que dificulta a detecção microscópica (WHO, 2018). Para

o diagnóstico sorológico, são utilizados testes imunológicos que detectam indiretamente a presença do parasito por meio de anticorpos anti-*T. cruzi*. Esses testes, no entanto, podem apresentar falsos positivos e falsos negativos (Gadelha et al., 2003). Por isso, considera-se um indivíduo positivo quando há concordância em dois testes sorológicos distintos, como imunofluorescência indireta, hemoaglutinação e ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (WHO, 2023).

Para resolver possíveis inespecificidades dos testes sorológicos, utiliza-se os testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR possui alta sensibilidade e especificidade, desde que sejam seguidos os parâmetros de padronização e controle de qualidade dos reagentes. No entanto, devido ao seu alto custo e à ausência de kits comerciais para uso rotineiro na vigilância, o uso da PCR para diagnóstico molecular de *T. cruzi* ainda é restrito e realizado principalmente em laboratórios de pesquisa (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Em relação ao tratamento da DC, pouco se avançou desde sua descoberta há mais de 115 anos. Apenas dois medicamentos estão disponíveis comercialmente: o nifurtimox e o benznidazol (BNZ). Ambos são eficazes no tratamento da infecção na fase aguda, mas apresentam ação limitada em casos crônicos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2020). Além disso, esses medicamentos têm efeitos adversos significativos. O nifurtimox pode causar náuseas, vômitos e distúrbios neurológicos, enquanto o BNZ pode provocar reações de hipersensibilidade, erupção cutânea e febre, que muitas vezes, levam à interrupção do tratamento (SUÁREZ *et al.*, 2022).

Um ensaio clínico randomizado publicado em 2015, conhecido como BENEFIT, avaliou o uso de BNZ em 2854 pacientes com cardiomiopatia devido à DC. Embora o grupo medicado tenha apresentado uma diminuição significativa da carga parasitária, quantificada por qPCR, em comparação ao grupo controle, o BNZ não foi capaz de impedir o desenvolvimento dos danos cardíacos (MORILLO et al., 2015).

Assim, pesquisas continuam sendo conduzidas para a descoberta de novas drogas, associações de fármacos e reposicionamento de medicamentos. Em outro estudo randomizado com 30 pacientes por grupo, o uso do BNZ em combinação com fosravuconazol em pacientes na fase indeterminada da doença

demonstrou uma resposta antiparasitária eficaz em todos os esquemas de tratamento. A associação com fosravuconazol foi bem tolerada, embora não tenha afetado a eficácia (TORRICO *et al.*, 2021). No entanto, até o momento, nenhum novo medicamento ou protocolo mostrou-se suficientemente satisfatório para ser instituído no tratamento da DC (RIBEIRO *et al.*, 2020; TORRICO *et al.*, 2021).

1.9A patogênese da doença de Chagas

A DC apresenta uma patogênese complexa, particularmente na sua fase crônica. Duas teorias principais têm sido propostas para explicar o surgimento das manifestações clínicas nesta fase: a teoria da persistência parasitária e a teoria da autoimunidade. Ambas as teorias, apesar de distintas, não são mutuamente excludentes e podem interagir de forma a agravar a patologia chagásica (SANTI-ROCCA *et al.*, 2017; WESLEY, M. *et al.*, 2019).

A teoria da persistência parasitária sugere que o *T. cruzi* permanece no organismo hospedeiro durante toda a vida, devido à capacidade do parasito de evadir o sistema imunológico, esconder-se em nichos celulares menos acessíveis, como adipócitos e o trato gastrointestinal, e apresentar uma replicação intermitente e de baixa intensidade (ROSSI; DE SOUZA; RAMIREZ, 2024). Isso é evidenciado pela detecção do DNA do parasito em tecidos de pacientes crônicos e a observação direta de parasitos em biópsias de tecidos, além de estudos que utilizam técnicas avançadas de biologia molecular e de imagem por bioluminescência (FRANCISCO *et al.*, 2022; SILBERSTEIN *et al.*, 2018).

Segundo essa teoria, a presença contínua do parasito nos tecidos pode causar lesão tecidual direta por meio da destruição celular e inflamação local. Além disso, a resposta imune contínua ao antígeno do parasito pode levar a uma inflamação crônica, resultando em fibrose e disfunção tecidual (ROSSI; DE SOUZA; RAMIREZ, 2024).

Entretanto, sabe-se que o dano tecidual ocorre mesmo na ausência do parasito e na presença de células inflamatórias é o cenário mais comum em pacientes crônicos sintomáticos, o que reflete a participação de respostas autoimunes na patogênese da DC. Assim, a teoria da autoimunidade propõe que,

após a fase aguda da infecção, o sistema imunológico do hospedeiro continua a atacar os próprios tecidos, devido a uma resposta imunológica aberrante, seja pela ativação inespecífica de linfócitos T por citocinas pró-inflamatórias (ativação Bystander), por mimetismo molecular ou, até mesmo, por trocas genéticas entre o parasito e o hospedeiro (TEIXEIRA, A. R. L. et al., 2011; BONNEY; ENGMAN, 2015; DE BONA et al., 2018). A Figura 5 ilustra as diferentes teorias de patogênese da DC crônica.

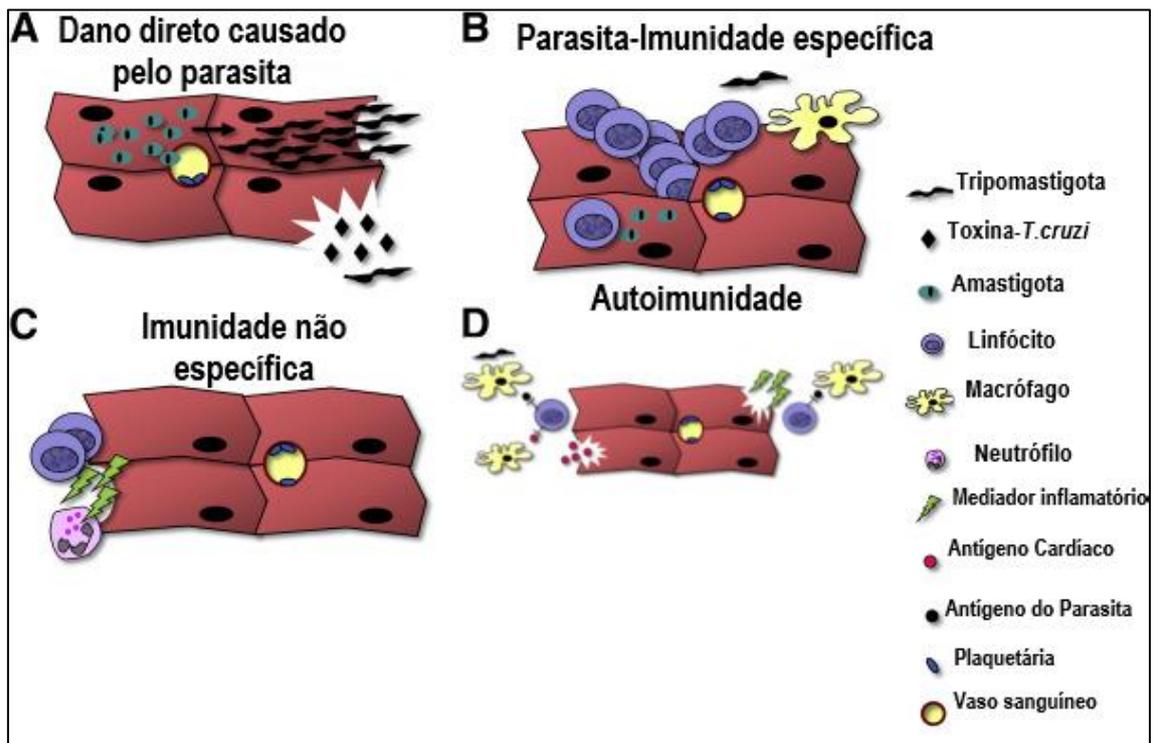


Figura 5. A patogênese da doença de Chagas Persistência parasitária leva a um dano direto causado pelo parasita por lise celular. B: Ocorre a ativação de imunidade específica na tentativa de combate ao parasita, o que pode levar a destruição de miócitos ou seu deslocamento. C Ativação de imunidade não específica, podendo levar a lesões em cardiomiócitos. D: Autoimunidade induzida por mimetismo molecular entre o parasito e autoantígenos ou ativação de células T autorreativas após lise celular por *T. cruzi*. Fonte: Adaptado de Bonney; Engman (2015)

1.10 Resposta imune

A resposta imune na DC é influenciada por fatores do hospedeiro, como genética, status imunológico, idade e coinfeções, e por fatores do parasito, incluindo a virulência da cepa, fatores genéticos e quantidade de inóculo (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Na fase aguda, ocorre uma resposta inflamatória intensa com ativação de células imunológicas, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK.

Os macrófagos fagocitam os parasitos e produzem citocinas pró-inflamatórias, enquanto os neutrófilos liberam enzimas que podem matar o patógeno. As células NK desempenham um papel crucial na destruição das células infectadas através da liberação de citotoxinas. As citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12 são produzidas para ativar macrófagos e promover a produção de óxido nítrico, que tem efeito parasiticida. Entretanto, a produção excessiva de citocinas pode levar a danos teciduais (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2021). Além da produção de citocinas, ocorre a produção de quimiocinas, que estão envolvidas no processo de migração de leucócitos (CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2021).

Durante a fase crônica da DC, a resposta imune é mais complexa, caracterizada por uma resposta adaptativa contínua. Linfócitos T CD4+ e CD8+ desempenham papéis cruciais, com células Th1 continuando a produzir IFN- γ para combater o parasito. Contudo, essa produção persistente pode contribuir para danos teciduais, especialmente no coração. Os Linfócitos T CD8+ são essenciais para a eliminação de células infectadas, mas também podem causar patologia cardíaca através da liberação de granzimas e perforinas (CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2021). Citocinas como IL-10 e TGF- β tentam limitar o dano tecidual, mas sua regulação inadequada pode resultar em inflamação crônica e fibrose.

Assim, a resposta imune na DC é um equilíbrio delicado entre a eliminação do parasito e a prevenção de danos excessivos ao hospedeiro. Na fase aguda, a resposta inflamatória é intensa e direcionada à rápida eliminação do *T. cruzi*. Na fase crônica, a resposta imunológica persistente pode levar às respostas autoimunes e a danos teciduais significativos, particularmente no coração e intestino, resultando nas complicações graves da DC (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018). Podendo na imagem 6 ser observado o perfil imunológico dos estágios cardíacos agudo e crônico da DC.

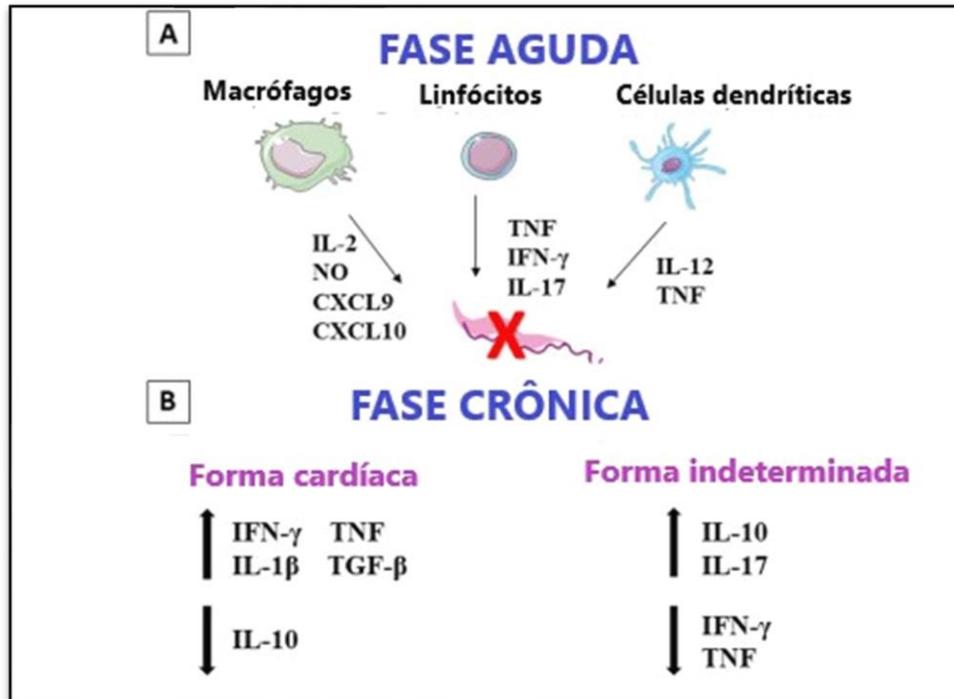


Figura 6. Perfil imunológico dos estágios cardíacos agudo e crônico da doença de Chagas
A: Durante a fase aguda, diferentes mecanismos de respostas são ativados para combate ao parasito, com liberação de citocinas e quimiocinas. Entretanto, a resposta não é efetiva e não consegue eliminar o *T. cruzi* por completo. **B:** Na fase crônica, pacientes sintomáticos apresentam um perfil Th1 de citocinas maior que o perfil Th2, invertendo-se essa relação em pacientes com a forma indeterminada da doença. Fonte: Adaptado de Cristovão-Silva et al (2021).

2 MICROBIOTA INTESTINAL

2.1 Aspectos gerais da microbiota intestinal

O corpo humano abriga diversos grupos de microbiota, incluindo aquelas presentes na pele, cavidade respiratória, conjuntiva, sistema urogenital e trato gastrointestinal (KENNEDY; CHANG, 2020). Esta última é especialmente diversa, composta por cerca de 10-100 trilhões de micro-organismos (URSELL et al., 2012).

No estudo das relações entre microrganismos e seus hospedeiros, é importante distinguir dois conceitos: microbiota e microbioma. A microbiota compreende todos os membros vivos que formam o microbioma, como bactérias, arqueas, fungos, algas e pequenos protozoários. Por sua vez, o microbioma foi definido em 1988 como a comunidade microbiana característica de um habitat razoavelmente bem definido, que apresenta propriedades físico-químicas distintas. O microbioma inclui também metabólitos, ácidos nucleicos, proteínas

e leveduras, sendo que, diferentemente da microbiota, ele não pode ser estudado separadamente (BERG *et al.*, 2020).

A composição da microbiota é dinâmica, havendo diferenças ainda nos períodos iniciais. Em humanos, o tipo de parto (cesárea ou natural) influencia na composição inicial da comunidade bacteriana. Apesar das variações ao longo do desenvolvimento do indivíduo, na fase adulta, ela se estabelece, podendo apresentar variações em aspectos relacionados a habitat, hábitos alimentares, comorbidades e estilo de vida em geral, com funções primordiais relacionadas ao sistema imunológico, metabólico, estrutural e neurológico (HALL; TOLONEN; XAVIER, 2017). Em camundongos, foi demonstrado que a microbiota de camundongos fêmeas prenhas, levou ao desenvolvimento de uma imunidade protetora por anticorpos devido a amamentação (ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).

A diversidade e composição da microbiota apresenta características diferentes ao longo do trato gastrointestinal. À medida que a acidez diminui, a concentração de bactérias aumenta, a estimativa é de 10^1 a no estômago, 10^7 no jejuno e no íleo e entre 10^{11} e 10^{12} no intestino grosso e nas fezes. Os dois filos predominantes na microbiota intestinal de seres humanos são o *Firmicutes* e o *Bacteroides*, representando 90% da população (DRISSI; RAOULT; MERHEJ, 2017).

A importância da microbiota intestinal destaca-se na literatura devido ao seu envolvimento em funções essenciais como a manutenção da homeostase, a estrutura corporal e metabolismo (WANG, J. *et al.*, 2023). Além disso, a microbiota intestinal, composta por uma complexa comunidade de microrganismos simbióticos, desempenha um papel crucial na resposta imunológica do hospedeiro. Esses microrganismos não apenas regulam o sistema imunológico, mas também produzem e secretam moléculas bioativas que atuam contra patógenos invasores (ADAK; KHAN, 2019; CHENG *et al.*, 2019).

O estabelecimento de uma relação simbiótica entre a microbiota e o hospedeiro contribui, desde os primeiros contatos, para o desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro, enquanto a disbiose pode ter impacto no desenvolvimento de diferentes doenças, como obesidade, doenças cardíacas, asma e doenças inflamatórias intestinais. Apesar de serem multifatoriais,

existem os aspectos inflamatórios e aqueles desencadeados pelo decaimento da diversidade da microbiota intestinal (D'AMELIO; SASSI, 2018; LEVY; THAISS; ELINAV, 2016).

De fato, a correlação da microbiota intestinal na imunidade inata vem sendo observada em diversos estudos, com seu papel na resistência à colonização, por meio da secreção de peptídeo microbianos, ativação de inflamassomas ou mesmo através da indução da produção de citocinas como IL-22, IL-17 e IL-10, tendo os microrganismos intestinais um papel nessa indução ou expressão (CHENG *et al.*, 2019; JIAO *et al.*, 2020).

De forma interessante, o Tecido Linfóide Associado ao Trato Gastrointestinal (GALT) tem papel importante no reconhecimento de patógenos na resposta inicial, promovendo a tolerância imunológica à microbiota comensal, a qual tem participação na modulação do GALT (JIAO *et al.*, 2020). Camundongos que apresentam baixa secreção de peptídeos antimicrobianos têm alta mortalidade devido ao aumento da translocação de microrganismos para a via sistêmica, com aumento também de processos inflamatórios (ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).

Fagócitos, como macrófagos e células dendríticas, participam da manutenção da homeostase intestinal, no que tange principalmente a tolerância imunogênica. Assim, a falta da microbiota intestinal levaria a sinalizações insuficientes de células do sistema imune para reposição dos macrófagos para regulação do sistema imune (JIAO *et al.*, 2020). As células B também são mediadores importantes no que se refere à manutenção da homeostase intestinal, ajudando na regulação da secreção de IgA. As células TCD4+, incluindo as células Th17, têm papel fundamental na resposta adaptativa. A depender do estímulo recebido, pode levar a uma resposta inflamatória ou não, de acordo com a colonização bacteriana (WANG, L.; ZHU; QIN, 2019; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).

A disbiose intestinal, decorrente da perda da diversidade de microrganismos, leva a uma composição alterada dos micróbios (BERG *et al.*, 2020). Em um ambiente intestinal em desequilíbrio, a disbiose pode causar um desbalanço entre os antígenos relacionados à microbiota comensal, podendo resultar em uma apresentação inadequada e levar ao desenvolvimento de doenças (JIAO *et al.*, 2020).

Devido ao processo de coevolução entre microrganismos e seus hospedeiros, ocorreram adaptações recíprocas entre seus componentes, estabelecendo relações benéficas, neutras ou patológicas para o hospedeiro (BERG et al., 2020). Estudos mostram que a saúde humana é influenciada por microrganismos e suas interações, as quais podem estar associadas a doenças inflamatórias crônicas, metabólicas, neurológicas e ao câncer (RACKAITYTE; LYNCH, 2020).

Diante disso, o estudo dessas correlações precisa ser realizado de forma aprofundada. No entanto, há dificuldades relacionadas à padronização dos métodos, sendo o sequenciamento e a metagenômica considerados padrões. Outros métodos, como o cultivo em meio de cultura e o uso de animais *germ-free*, também podem ser utilizados (Alou et al., 2020).

2.2 Microbiota intestinal saudável

Embora os avanços científicos tenham permitido melhor compreensão da microbiota intestinal, ainda não há uma taxonomia definida que caracterize uma microbiota saudável. Isso ocorre porque, apesar das similaridades, a composição microbiana de cada indivíduo é única. No entanto indivíduos com alta diversidade de táxons, riqueza de genes microbianos e estabilidade microbiana são associados a comunidades microbianas intestinais saudáveis. Deve-se observar, contudo, que alta diversidade pode estar ligada a trânsito intestinal prolongado, o que requer atenção (FAN; PEDERSEN, 2021).

Bactérias benéficas, também chamadas de probióticas, desempenham um papel fundamental na saúde humana ao promoverem o equilíbrio da microbiota intestinal e fortalecerem o sistema imunológico. Encontradas principalmente no intestino, essas bactérias ajudam na digestão, na absorção de nutrientes e na produção de vitaminas essenciais, como a vitamina K e algumas do complexo B. Além disso, elas competem com microrganismos patogênicos, prevenindo infecções e reduzindo inflamações intestinais (LATIF et al., 2023; MAFTEI et al., 2024). Estudos também mostram que a presença de uma microbiota saudável pode influenciar positivamente no balanço das respostas Th1 e Th2 de um organismo (MACIEL-FIUZA et al., 2023; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).

De interesse para o presente estudo, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides* são gêneros de bactérias benéficas que desempenham papéis cruciais na manutenção da saúde humana, tanto no trato gastrointestinal quanto de maneira sistêmica. A presença equilibrada desses grupos de bactérias está ligada à regulação de respostas inflamatórias e imunológicas, promovendo uma microbiota intestinal resiliente e equilibrada, capaz de prevenir diversas doenças. (DEROVS; LAIVACUMA; KRUMINA, 2019).

2.1.1 *Lactobacillus* sp

O *Lactobacillus* spp é um gênero de bactéria pertencente ao filo *Firmicutes* e à família *Lactobacillaceae*, são gram-positivas e comum no trato gastrointestinal e na boca, tanto do ser humano como de animais. Esse gênero inclui mais de 170 espécies e 17 subespécies, com forma bacilar ou cocobacilar, resistentes ao oxigênio e classificadas como aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015). Uma das características importantes desse gênero é a resistência ao ácido estomacal e à bile, o que permite sua passagem de maneira segura pelo estômago, duodeno, jejuno e intestino grosso (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015).

Diferentes estudos vêm demonstrando o papel de diversas espécies de *Lactobacillus* na saúde associadas à produção de antioxidantes e à capacidade de imunomodulação de células humanas, promovendo uma resposta anti-inflamatória. Dentro deste gênero, se destacam espécies com características probióticas, como *L. casei* e *L. acidophilus* (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015).

De forma interessante, bactérias intestinais possuem mecanismos para modular e até eliminar bactérias não benéficas. Estudos mostraram que *L. reuteri* produz reuterina, uma proteína com capacidade de proteger o hospedeiro contra *Escherichia coli*. Já *Lactobacillus plantum* produz lantipeptídeos com atividade contra bactérias gram-positivas, como *Streptococcus thermophilus* e *Enterococcus faecalis*, conferindo uma vantagem ecológica a essa espécie (DEROVS; LAIVACUMA; KRUMINA, 2019). Embora raramente o *Lactobacillus* possa se tornar patogênico, há relatos de infecções oportunistas ocasionais, dependendo da espécie, como é o caso da bacteremia causada por *L. jensenii* ou *L. rhamnosus* (KULLAR *et al.*, 2023).

As diferentes espécies de *Lactobacillus* possuem diferentes suscetibilidades ao uso de antimicrobianos. A saber, o gênero *L.acidophilus* é resistente à penicilinas e vancomicina, enquanto as espécies *L.rhamnosus* e *L. casei* são resistentes ao metronidazol e à vancomicina (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015).

2.2.2 *Bifidobacterium* spp

O gênero *Bifidobacterium*, pertencente ao filo Actinobacteria e à família Bifidobacteriaceae, inclui 47 espécies de bactérias gram-positivas, reconhecidas por suas propriedades benéficas à saúde humana (LUO *et al.*, 2018; TURRONI *et al.*, 2018). Embora sua presença no intestino de adultos seja menor, com uma abundância relativa de 2 a 14%, ele é dominante nos primeiros períodos de vida, especialmente na fase lactante, quando representa de 60 a 70% da microbiota (ARBOLEYA *et al.*, 2016).

Espécies de *Bifidobacterium*, como *B. breve*, *B. bifidum* e *B. adolescentis*, têm sido amplamente estudadas por seus efeitos positivos em condições de saúde, incluindo distúrbios depressivos, obesidade e doenças intestinais. Essas espécies contribuem para a homeostase intestinal, reforçando a barreira intestinal e estimulando o sistema imunológico, com raros casos de patogenicidade oportunista, como em *B. dentium* (TURRONI; VAN SINDEREN; VENTURA, 2011). Desta forma, a presença de *Bifidobacterium* pode influenciar positivamente ou negativamente seu hospedeiro, a depender da dieta adotada (Luo *et al.*, 2018).

Bifidobacterium é associado a respostas imunomoduladoras, homeostasia e ação anti-inflamatória. Seus metabólitos, como acetato, lactato e ácido linoleico conjugado, têm funções imunoprotetoras e anti-inflamatórias (GAVZY *et al.*, 2023). Em modelos de infecção por *Plasmodium berghei*, a administração de *B. longum* mostrou-se capaz de reduzir a parasitemia e modular a imunidade intestinal, conferindo proteção contra o patógeno (FITRI *et al.*, 2023).

Quanto à resistência antimicrobiana, análises de 50 cepas de *Bifidobacterium* de diferentes espécies demonstraram suscetibilidade à vancomicina e beta-lactâmicos, e resistentes ao metronidazol (38% das

amostras) e à gentamicina (100%) (MODESTO; CHECCUCCI; MATTARELLI, 2021; MOUBARECK *et al.*, 2005).

2.2.3 *Bacteroides* sp

O gênero *Bacteroides*, pertencente ao filo Bacteroidetes e à família Bacteroidaceae, inclui cerca de 20 espécies e é caracterizado como gram-negativo, anaeróbio estrito, encapsulado e não formador de esporos. Exclusivo da microbiota intestinal de mamíferos, *Bacteroides* possui um papel multifacetado no organismo hospedeiro podendo ser comensal, mutualista, ou patogênico (PAQUIN-PROULX *et al.*, 2017; WEXLER, H. M., 2007; ZAFAR; SAIER, 2021). Espécies como *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. uniformis* e *B. fragilis* têm importância clínica significativa, sendo esta última a mais frequentemente isolada em contextos patológicos. Quando *B. fragilis* e outras espécies escapam do intestino, podem causar doenças graves, como bacteremia e abscessos em diversos órgãos (WEXLER, A. G.; GOODMAN, 2017; WEXLER, H. M., 2007).

O gênero *Bacteroides* está presente na microbiota intestinal desde os primeiros dias de vida, com maior concentração em indivíduos nascidos por parto normal. Essas bactérias se adaptam às condições ambientais e aos nutrientes disponíveis, desempenhando um papel importante no sistema imunológico do hospedeiro ao competir com outros microrganismos. Um exemplo é sua capacidade de limitar a entrada e colonização de patógenos, como *Clostridium perfringens* (WEXLER, A. G.; GOODMAN, 2017).

Além disso, *Bacteroides* pode fornecer nutrientes para outras bactérias, como *Bifidobacterium longum*. Observa-se também que a concentração de *Bacteroides* tende a ser menor na microbiota de indivíduos obesos, onde há um aumento do filo Firmicutes, sugerindo uma influência no equilíbrio metabólico da microbiota intestinal (WEXLER, A. G.; GOODMAN, 2017).

2.3 Microbiota intestinal em camundongos

O modelo experimental murino é utilizado em diferentes estudos para avaliar a modulação da microbiota, como em doenças parasitárias, doenças autoimunes e intestinais, devido a ser um modelo de fácil acesso e representativo.

Estudos demonstram que os filos de bactérias mais comumente encontrados no intestino grosso tanto de seres humanos como de camundongos são os Firmicutes e Bacteroidetes; no entanto, pode haver variações nas espécies representantes de cada um desses filos (BLEICH; FOX, 2015). Assim como ocorre em seres humanos, foi observada que a diversidade da microbiota intestinal de camundongos é influenciada por aspectos ambientais, genéticos, alimentação e idade (ORG *et al.*, 2015).

Camundongos de diferentes habitats apresentam diversidades distintas, entretanto a coabitação leva a uma convergência parcial desse perfil. Firmicutes e Bacteroidetes foram de fato os filos predominantes nos grupos avaliados, enquanto os principais gêneros foram *Lactobacillus*, *Blautia*, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* e *Clostridioides*. O estudo também demonstrou maior estabilidade na microbiota dos animais C57BL/6 do que BALB/c, sendo observado que os animais doentes apresentavam diminuição do filo Firmicutes e aumento do filo Bacteroidetes (GUO *et al.*, 2022).

2.4 Impacto do uso de antimicrobianos

Ao longo dos anos, os estudos vêm confirmando que o uso de antibióticos impacta a composição e a diversidade da microbiota do hospedeiro (DETHLEFSEN; MCFALL-NGAI; RELMAN, 2007; JANDHYALA *et al.*, 2015; JERNBERG *et al.*, 2007; TIRELLE *et al.*, 2020). Por esse motivo, muitos estudos usam animais previamente tratados com antibióticos específicos ou com coquetel de antimicrobianos para estudar seu impacto na composição ou na resposta a determinados processos (BECATTINI; TAUR; PAMER, 2016; HORNE *et al.*, 2019; MU; ZHU, 2019).

Interessantemente, um estudo que avaliou o uso de três diferentes antibióticos (enrofloxacino, vancomicina e sulfato de polimixina B para depleção da microbiota, verificou que animais tratados por três semanas não apresentaram alterações de peso e nem alterações histológicas. Entretanto os animais tratados com vancomicina apresentaram maior volume cecal. O estudo observou que citocinas pró inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6, além de IL-10, tiveram aumento em todos os grupos que receberam antibiótico em relação ao grupo controle, com maior efeito nos grupos tratados com

enrofloxacina eficaz contra bactérias gram-negativas. Ademais, observou-se que o uso de vancomicina e enrofloxacina diminuíram a diversidade, o que não foi detectado nos animais tratados com polimixina B (SUN et al., 2019).

Desde 2017, houve um aumento nos estudos relacionados a microbiota intestinal e uso de antibiótico, tanto em relação ao seu uso como modulador da microbiota como resistência a antibióticos (ZYOUNG *et al.*, 2023).

2.5 Microbiota intestinal e sua relação com doenças parasitárias

Devido ao crescente interesse da comunidade científica em compreender a relação entre a microbiota e diversas patologias, como doenças inflamatórias intestinais, diabetes e asma (BARCIK *et al.*, 2020; DONG *et al.*, 2019; IATCU; STEEN; COVASA, 2022), torna-se fundamental investigar a interação entre a microbiota intestinal e doenças parasitárias. Estudos nesta área são cruciais para elucidar os mecanismos subjacentes e potencialmente desenvolver novas estratégias terapêuticas.

Em revisão da literatura realizada por Leung et al., 2018, os autores destacaram o fato de que a interação entre a microbiota e parasitos pode se desenvolver de forma positiva ou não, promovendo, por exemplo, o aumento da produção de mucinas que auxilia na expulsão de helmintos do intestino ou permitir a ação de parasitos que degradam a barreira intestinal, como o *Toxoplasma gondii*. Os estudos também vêm demonstrando que a interação parasito-microbiota pode, além de alterar a quantidade e composição do muco, também pode ativar inflamações, receptores *Toll-Like* TLRs e também as respostas adaptativas. Isso vai influenciar a persistência parasitária e o crescimento do patógeno, tanto de helmintos como de protozoários (LEUNG; GRAHAM; KNOWLES, 2018).

De maneira mais direta, pode-se avaliar a interação da microbiota intestinal e parasitos que habitam esse mesmo ambiente. A giardíase, por exemplo, é uma infecção causada por protozoário extracelular que coloniza o intestino delgado de seu hospedeiro. Em revisão de literatura, os autores concluíram que a presença da *Giardia lamblia* causava uma modificação na composição da microbiota, influenciando o desenvolvimento de células T (FINK; SINGER, 2017). Estudo realizado com amostras de fezes de crianças

demonstrou que a infecção por giárdia leva ao aumento da diversidade bacteriana, mas com redução da quantidade total de bactérias(GOMES, N. *et al.*, 2023).

A avaliação da infecção por giárdia em animais demonstrou que, a depender do local de origem dos mesmos, o desenvolvimento da infecção ocorre de forma diferente, assim como animais *germ-free* são mais suscetíveis à infecção (FINK; SINGER, 2017). No sentido inverso, em modelos murinos tratados previamente com antibióticos, verificou-se que a disbiose foi acentuada pela presença da *G. lamblia*, afetando tanto microrganismos aeróbicos como anaeróbicos, com aumento de aeróbicos do filo Proteobacteria e diminuição de anaeróbicos dos filios Firmicutes e Meloinabacteria(BARASH *et al.*, 2017).

Mesmo infecções causadas por parasitos que não habitam o intestino também são influenciadas por tais bactérias, como é o caso da malária. A esse respeito, verificou-se que ocorre alterações da microbiota durante a infecção por *Plasmodium*, com diminuição de filios como Firmicutes e Proteobacteria. O parasito alterou a resposta imune do hospedeiro por meio da ação sobre as bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (OMONDI; CANER, 2022).

Apesar de muitos estudos serem realizados para entendimento da microbiota do vetor, estudos realizados com animais infectados com *Leishmania* spp mostram que diferenças metabólicas entre linhagens de camundongos resistentes ou não à infecção estão associadas a uma diferença de composição da microbiota, onde em animais resistente, há um aumento de *Gammaproteobacteria*, e em animais suscetíveis, aumento de *Clostridia* (LAMOUR *et al.*, 2015).

A avaliação em camundongos infectados com *L. braziliensis* e com *S. aureus* mostrou aumento de IFN- γ correlacionado com o agravamento da doença (SINGH *et al.*, 2023). Interessantemente, estudo em humanos com leishmaniose cutânea foi possível verificar alterações na diversidade bacteriana como o aumento de Staphylococcaceae e Streptococcaceae, associado ao aumento de inflamação local, com aumento dos filios de Firmicutes e Proteobacteria e diminuição de outros filios como Actinobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria, demonstrando correlação entre a infecção e a modulação da micorbiota (JAIMES *et al.*, 2024).

2.6 Microbiota intestinal e sua relação com o *Trypanosoma cruzi*

A avaliação da microbiota intestinal e/ou do microbioma pode ser realizada por diferentes métodos. Entre eles, o sequenciamento de última geração é considerado o padrão-ouro, pois permite a avaliação da diversidade da microbiota intestinal, por meio do sequenciamento de amplicons e da análise completa de genomas. Esse método, embora rápido e complexo, é mais caro e sofre com a falta de padronização de protocolos.

Outros métodos moleculares de interesse incluem PCR, qPCR, hibridização in situ por fluorescência (FISH) e o sequenciamento de 16S rRNA, que possibilitam a descrição da composição taxonômica específica do local. No entanto, esses métodos também carecem de padronização (ALOU et al., 2020).

Como alternativa, destaca-se o cultivo de microrganismos por diferentes abordagens, como o uso de meio de extrato de levedura, hidrolisado de caseína e ácidos graxos, culturas de alto rendimento e coculturas para o isolamento de microrganismos anteriormente não cultivados. Esses métodos também requerem padronização (ALOU et al., 2020).

A maioria das pesquisas que avaliam a interação microbiota-*Tc* se focam apenas na relação estabelecida com a microbiota intestinal do inseto vetor. Poucos estudos avaliaram a influência da microbiota do hospedeiro vertebrado. Em revisão sistemática, Teotônio et al., 2019, foram capazes de identificar apenas oito estudos que avaliavam aspectos da microbiota intestinal e a infecção pelo *Tc* no hospedeiro mamífero (TEOTÔNIO et al., 2019).

De interesse, um desses estudos demonstrou que a ausência de microbiota em camundongos *germ-free* resulta em maior parasitemia e mortalidade dos animais (SILVA et al., 1987). Em contraste, estudo posterior não observou diferenças estaticamente significativas em relação à mortalidade e parasitemia durante a infecção por *Tc* cepa Y em camundongos *germ-free* e convencionais (DUARTE et al., 2004). O mesmo grupo de pesquisadores também avaliou a influência de bactérias predominantes no intestino murino e seu impacto na infecção por *Tc*. Nos grupos com *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides vulgatus* e *Peptostreptococcus* sp, verificou-se aumento tanto da sobrevivência dos animais como da produção de IFN- γ e TNF- α . Já a presença de

E.coli não alterou de maneira significativa a sobrevivência dos grupos avaliados (DUARTE *et al.*, 2005).

Dois outros estudos avaliaram aspectos da microbiota em pacientes com DC. Ao analisar a microbiota das fezes, oral e da pele de crianças infectadas com *Tc*, antes e após o tratamento com BNZ, foi possível observar que, anteriormente ao tratamento, havia uma maior proporção de algumas bactérias do filo *Firmicutes* e diminuição de representantes de *Bacteroides*. Já após o tratamento, foi observada a reconstituição da microbiota intestinal; no entanto, ainda se verificavam algumas alterações da microbiota oral e da pele (ROBELLO *et al.*, 2019).

À medida que a infecção passa para a fase crônica e os sintomas do Trato gastrointestinal surgem, alterações da microbiota também se tornam evidentes. Por exemplo, pacientes com megacólon chagásico mostram diferença em relação a microrganismos anaeróbios e fungos no jejuno proximal em amostras coletadas antes e após procedimento cirúrgico (GUIMARÃES QUINTANILHA *et al.*, 2000).

Ademais, a análise da microbiota do megaesôfago, comparativamente à microbiota do esôfago de pessoas saudáveis, apresenta maior variabilidade bacteriana, com predominância de *Streptococcus* e *Veillonela*. De interesse, doenças secundárias em pacientes com infecção crônica podem surgir como resultado da disbiose do trato gastrointestinal, como infecções pulmonares, displasia da mucosa esofágica e até câncer (TEOTÔNIO *et al.*, 2019).

Assim, as mudanças na microbiota associadas à DC podem comprometer todo o funcionamento do organismo, incluindo a resposta metabólica. Estudo realizado em camundongos demonstrou que a existência de perturbações na microbiota fecal associadas à infecção por *T. cruzi* resulta em alterações no ácido linoleico dietético, que é modificado no ambiente intestinal por bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*. As alterações encontradas, tanto na microbiota como no metaboloma, podem favorecer a persistência do parasito no intestino, com ocorrência de alterações no lúmen gastrointestinal (MCCALL *et al.*, 2018).

Recentemente, avaliaram-se alterações no microbioma causadas pela infecção por *Tc* em animais BALB/c e C57BL/6 infectados com a cepa Tulahuen, sendo observados aumento da carga parasitária, e alterações nas citocinas anti

inflamatórias como IL-10 e IL-4 em animais BALB/c e aumento de IFN- γ , TNF- α e IL-6 C57BL/6. Isso evidencia como as alterações na microbiota estão associadas à resposta imune do hospedeiro (CASTAÑEDA *et al.*, 2023).

Desta forma, além dos estudos serem escassos e abordarem pontualmente o impacto da interação microbiota intestinal e Tc em mamíferos, também é possível observar discordância entre os resultados. Portanto, são necessários mais estudos em mamíferos para elucidar os mecanismos associados à presença e atuação de bactérias comumente encontradas na microbiota intestinal, visando um melhor entendimento da patogênese da DC, visando uma abordagem clínica mais adequada e uma análise mais profunda do impacto do uso de antimicrobianos no curso da infecção.

3. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas continua sendo uma preocupação significativa de saúde pública em várias regiões do mundo, especialmente na América Latina. Apesar dos avanços no entendimento da doença e no desenvolvimento de tratamentos, a patogênese da doença de Chagas ainda não é completamente compreendida. Estudos recentes indicam que a microbiota intestinal pode desempenhar um papel crucial na resposta imunológica do hospedeiro e na progressão de diversas doenças infecciosas. A interação entre a microbiota intestinal e *T. cruzi* pode influenciar a gravidade da infecção e a resposta do hospedeiro, justificando a necessidade de uma investigação mais aprofundada sobre essa relação.

A modulação da microbiota intestinal com o uso de antibióticos representa uma abordagem promissora como modelo para estudar a patogênese da doença de Chagas. Antibióticos podem alterar significativamente a composição e a função da microbiota, proporcionando um modelo experimental para observar como essas mudanças afetam a infecção pelo parasito. Estudos preliminares sugerem que a microbiota intestinal pode influenciar a resposta inflamatória e a imunidade do hospedeiro, impactando diretamente a replicação e a disseminação do protozoário. Ao manipular a microbiota intestinal com antibióticos, podemos ajudar a elucidar os mecanismos pelos quais a microbiota influencia a doença de Chagas, potencialmente identificando novos alvos terapêuticos.

Assim, a compreensão da relação entre a microbiota intestinal e a patogênese da doença de Chagas pode abrir caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. Se for comprovado que a modulação da microbiota pode alterar o curso da infecção, isso pode levar à implementação de terapias combinadas que incluam probióticos, prebióticos ou antibióticos específicos como adjuvantes ao tratamento convencional. Além disso, esses estudos podem fornecer percepções sobre a prevenção de complicações crônicas associadas à doença de Chagas, que ajudarão a melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Portanto, investigar a patogênese da doença de Chagas por meio da modulação da microbiota intestinal com o uso de antibióticos é uma vertente promissora e justificada por poder contribuir significativamente para a saúde pública e a medicina tropical.

4. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é investigar o impacto da modulação da microbiota intestinal por antimicrobianos no desenvolvimento e progressão da doença de Chagas em modelo murino.

4.1 Objetivos específicos

- Determinar o impacto do uso de coquetel antimicrobiano na redução e alteração da microbiota intestinal de camundongos;
- Avaliar se a microbiota reduzida, mediada pelo uso de antibióticos, interfere na carga parasitária nos tecidos do intestino e coração, resposta imune e alterações teciduais dos animais;
- Comparar o impacto da modulação da microbiota sobre a infecção de duas cepas distintas de *T. cruzi* - Colombiana (DTU I) e CL. Brener (DTU VI)
- Correlacionar as diferentes populações bacterianas da microbiota intestinal aos elementos de patogênese da doença de Chagas.

5. METODOLOGIA

5.1 Grupo experimental

Para o estudo, foram utilizados 65 camundongos fêmeas isogênicas da linhagem BALB/c, com idades entre 6-8 semanas de vida. Os animais foram divididos em 13 grupos experimentais, com cinco camundongos cada, conforme ilustrado na Figura 7. Os camundongos foram adquiridos do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM/UnB) e acompanhados durante todo o período experimental, conforme protocolo nº 129/2019 aprovado pelo comitê de ética. Durante o experimento, os animais tiveram acesso à água *ad libitum* e foram alimentados com ração Presence® específica para ratos e camundongos de uso laboratorial, registrada no Ministério da Agricultura, sendo mantidos em ciclo claro-escuro de 12:12 h.

Foram estabelecidos grupos de controle e tratamento para o experimento. Os grupos controles incluíam camundongos não manipulados e foram acompanhados até os diferentes momentos de eutanásia, conforme ilustrado na Figura 7. Outro grupo controle incluiu camundongos tratados com um coquetel de antibióticos por 21 dias, seguindo o protocolo de Villarino(2016), sem infecção, seguidos de eutanásia conforme cronograma pré-estabelecido.

Os grupos experimentais incluíram camundongos infectados com 10^5 parasitos das cepas Colombiana ou CL Brener, previamente passados por 2 vezes em camundongos para garantir a infectividade. Os grupos também foram subdivididos conforme a administração de um coquetel de antibióticos por 21 dias, seguido da infecção, sendo acompanhados por períodos de 30 ou 100 dias.

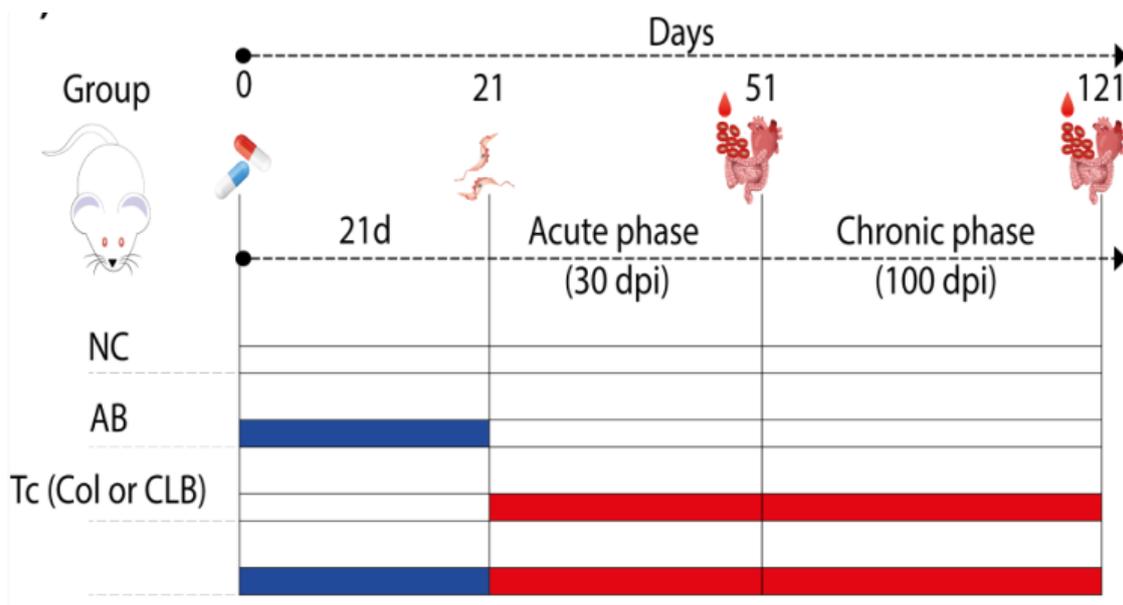


Figura 7. Grupos experimentais. Para avaliar o impacto do tratamento com antibióticos na doença de Chagas, os camundongos receberam um coquetel de antibióticos por 21 dias (azul). Subsequentemente, os camundongos foram infectados com as cepas Colombiana ou CL Brener de *T. cruzi* (vermelho) e monitorados por mais 30 dias (fase aguda) ou 100 dias (fase crônica). Amostras de sangue, tecido cardíaco e intestino grosso foram coletadas nos dias 21 para animais controles sem infecção e eutanasiados após o fim do uso do coquetel de antibiótico, 51 e 121.

5.2 Tratamento antimicrobiano

Objetivando reduzir drasticamente a microbiota intestinal dos animais de estudo, foi estabelecido um tratamento com antimicrobianos durante 21 dias antecedendo a infecção. A concentração de antibióticos utilizados foi baseada em estudo prévio (VILLARINO *et al.*, 2016).

Os antibióticos foram ressuspensos conforme necessário, e o coquetel antimicrobiano foi preparado em quantidade suficiente para dois dias de ingestão. Este coquetel foi fornecido aos animais *ad libitum* por meio da água de consumo, que era substituída a cada dois dias para garantir a eficácia e estabilidade dos medicamentos.

O coquetel de antimicrobianos foi preparado nas seguintes concentrações de medicamentos:

- Neomicina 0,5mg/mL (Sigma);
- Metronidazol 0,5mg/mL (Sigma);
- Ampicilina 0,5mg/mL (Teuto);
- Gentamicina 0,5mg/mL (Genmol);

- Vancomicina 0,25mg/mL (Teuto).

5.3 Infecção com *Trypanosoma cruzi* e coleta de amostras

A infecção dos animais foi realizada por via intraperitoneal com 1×10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, das cepas Colombiana ou cepa CL Brener. Foi avaliada a parasitemia por meio de teste de gota estendida, com sangue retirado da cauda, entre o 8º e 14º dias pós infecção (dpi).

A eutanásia dos animais foi realizada mediante uso de anestésico inalatório isoflurano. Uma vez sedados, realizou-se a punção cardíaca com seringa de 1mL para a coleta do sangue, que foi utilizado na extração de DNA e na separação do soro. Posteriormente, foi realizada a coleta do coração e da metade distal do intestino grosso, conforme o tempo de infecção ou equivalência dos grupos controles, a saber 30 e 100 dias e 21 dias, para o grupo apenas com coquetel de antibióticos.

Os primers utilizados para detectar o nDNA de *Trypanosoma cruzi*, foram baseados em Duffy *et al.*, 2009 o *forward* (5'-GCAGTCGGCKGATCGTTTTTCG-3' e *Reverse*:5'-TTCAGRGTGTTTGGTGTCCAGTG-3'. A eficiência da curva padrão foi de 90,56%. As condições de amplificação foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 65°C por 15 s e 72°C por 10 s. O volume de primer utilizado em cada reação foi primer 0,4µM.

5.4 Avaliação da composição da microbiota intestinal

Para avaliação da quantidade total de bactérias intestinais, foi realizada amplificação dos genes de domínio específico 16S rRNA bacteriano. Foi utilizado primer universal descrito na literatura e confirmado por análise bioinformática pelo logaritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Adicionalmente, *primers* direcionados a regiões específicas do DNA de gêneros bacterianos predominantes no intestino, foram selecionados a partir da literatura (FERRIS; MUYZER; WARD, 1996; HUIJSDENS *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2009; BURGOS *et al.*, 2010; NAKAYAMA; OISHI, 2013). As bactérias utilizadas na padronização foram *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus casei*, *Bacteroides fragilis*. A concentração do DNA das bactérias foi padronizada em 100ng/µL.

Todos os *primers* foram padronizados utilizando o termociclador Stepone plus® e Go taq® qPCR master mix, da PROMEGA®. A construção da curva

padrão foi feita a partir de diluições seriadas de DNA de cada bactéria (de 100 a 0,0001ng de DNA). Todas as curvas padrões apresentaram eficiência entre 90,6% e 104,97% e R² entre 0,991 e 0,999.

Tabela 1 Primers utilizados para quantificação de bactérias

Nome	Gene alvo	Sequência	Condições	Referência
Bacteria universal	16S rRNA	Forward: 5'- ATG GCT GTC GTC AGC T-3' Reverse: 5'- ACG GGC GGT GTG TAC-3'	55°C-30s (40x) 72°C- 10s Primer 0,4µM	Ferris et al. (1996)
<i>Lactobacillus spp</i>	16S rRNA	Forward: 5'- TGG AAA CAG ATG CTA ATA CCG-3' Reverse: 5'- GTC CAT TGT GGA AGA TTC CC -3'	61°C- 20s (40x) 72°C- 10s Primer 0,3 µM	Kang et al. (2009)
<i>Bifidobacterium spp</i>	16S rRNA	Forward: 5'- AAG GTT CGA TTC TGG CTC AG-3' Reverse: 5'- CAT CCG GCA TTA CCA CCC-3'	66°C- 30s (40x) 72°C- 50s Primer 0,15 µM	Nakayama T and Oishi K(2013)
<i>Bacteroides spp</i>	16S rRNA	Forward: 5' AGT AAC ACG TAT CCA ACC TG-3' Reverse: 5'GAC CAA TAT TCC TCA CTG CT-3'	61°C- 60s (40x) 72°C- 10s Primer 0,3 µM	Nakayama T and Oishi K(2013)

Cada placa de qPCR incluía amostras em branco (água *RNase/DNase Free*) controle negativo e controle positivo (DNA de camundongos não infectados e infectados, respectivamente) para validar os resultados. Para garantir a consistência entre placas, dois pontos na curva foram incluídos em cada placa como calibradores. Um fator de correção entre os experimentos foi aplicado para compensar quaisquer diferenças nas medições, seguindo o método descrito por RUIJTER *et al.*, 2015.

5.5 Eutanásia dos animais

Todos os instrumentos e materiais utilizados eram descartáveis ou previamente esterilizados. O DNA das amostras teciduais foi extraído usando o

kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. Nenhum esforço foi feito para separar o tecido do camundongo do componente bacteriano, evitando selecionar as bactérias que estavam em estreita associação com o tecido murino.

5.6 Citometria de fluxo

A resposta imune celular foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o kit *BD cytometric bead array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit*, por citometria de fluxo. Foi utilizado o citômetro de fluxo Fortessa LSR II (BD *Biosciences*), utilizando o programa Diva para aquisição dos dados, e o software FCAP 3.0 (BD *Biosciences*®, EUA) foi usado para a análise dos dados. Para a obtenção dos valores, uma curva de concentração foi inserida ao experimento a partir da diluição seriada 1/2 de um padrão de 5.000 pg/mL de cada citocina. Os resultados foram apresentados em pg/mL.

5.7 Dosagem de anticorpos por ELISA

As amostras de soro foram analisadas para detectar anticorpos específicos contra o parasito e autoanticorpos utilizando ELISA. Os níveis de IgM foram quantificados durante a fase aguda, enquanto os níveis de IgG foram avaliados na fase crônica, conforme descrito por Wesley et al. (2019). Em resumo, placas de ELISA foram revestidas com 50µL por poço de antígenos do parasito, proteínas cardíacas ou intestinal. Para os antígenos de coração e intestino, utilizou-se uma quantidade de 0,4µg por poço, enquanto para o antígeno de Tc, foram utilizados 0,75µg. As amostras de soro foram diluídas a 1:100 em solução de leite a 2% em PBS e aplicadas nas placas.

Anticorpos secundários (anti-IgM ou IgG de camundongo; Sigma-Aldrich®), conjugados à fosfatase alcalina, foram usados em uma diluição de 1:1.000. A reação foi revelada usando o substrato p-nitrofenil fosfato (pnPP), e as leituras de densidade óptica (OD) foram obtidas a 450 nm com um espectrofotômetro BioTek GENE 5®. Os valores de corte foram determinados para cada antígeno como a média mais três vezes o desvio padrão (MÉDIA + 3 × DP) de 10 controles negativos. Amostras com ODs excedendo 10% acima do valor de corte foram consideradas positivas, enquanto aquelas com ODs 10% abaixo do valor de corte foram classificadas como negativas.

5.8 Análise histológica

Para avaliar a presença de ninhos de amastigotas e lesão tecidual, foram realizados exames histológicos, conforme descrito por Wesley et al., 2019. Amostras de tecido cardíaco e do intestino grosso de animais infectados e não infectados foram coletadas e conservados em formol 10% tamponado até o momento do processamento. A confecção das lâminas ocorreu no laboratório de histologia da Faculdade de Medicina da UnB. Após as identificações, os cassetes foram colocados no processo de desidratação com seguidas passagem em álcool 70%, 80%, 90% e álcool absoluto, seguido de clareamento utilizando xilol 3 vezes seguidas e de impregnação em parafina por 3 vezes. Finalizada essa etapa, realizou-se o procedimento de inclusão, seguida por corte e coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).

Após o preparo das lâminas, ocorreu a análise quanto à presença de ninhos de amastigotas e quanto a infiltrados inflamatórios. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX51, modelo U-LH100HG (Olympus®), na objetiva de 40X ou 100X. No total, foram avaliados 15 campos de cada lâmina, sendo as alterações encontradas, classificadas a partir de adaptações dos critérios utilizados por Castro-Sesquen et al.(2011). A considerar de 0 a 0,3= normal; 0,4 a 1,0= leve; 1,1 a 2= moderado; 2,1 a 3= severo. Os valores referem-se à média do grau de intensidade visto nos 15 campos analisados.

5.9 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis. Aquelas com distribuição normal foram submetidas à análise de variância (PROC GLM), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey a um nível de significância de 5%. A análise de correlação de Pearson (PROC PRINCOMP) foi realizada para examinar as relações entre as variáveis medidas, e a figura foi gerada utilizando o pacote R core (WEI ET AL., 2017; R CORE TEAM, 2019). A análise de componentes principais foi conduzida sobre todos os dados brutos usando o procedimento PROC PRINCOMP. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS® (versão 9.3, Cary, Carolina do Norte) a um nível de significância de 5%. Os dados são apresentados como médias e desvio padrão.

6. RESULTADOS

6.1 O coquetel de antibióticos induz eficazmente uma redução duradoura na microbiota intestinal

Para elucidar o impacto da microbiota intestinal na modulação da DC, nosso estudo utilizou um coquetel de antibióticos de amplo espectro. Notavelmente, observou-se uma mudança na consistência fecal, com aumento do teor de umidade das fezes após o tratamento antimicrobiano de 21 dias, o que indicou alterações na microbiota intestinal.

A análise por qPCR do DNA extraído da amostra intestinal revelou uma redução significativa ($p < 0,0001$) na abundância total de bactérias logo após a interrupção do uso de antibióticos (21 dias), que se manteve por até 100 dias após a cessação do tratamento (Figura 8A). Além disso, a avaliação de três gêneros bacterianos promotores de saúde (*Lactobacillus* sp., *Bacteroides* sp. e *Bifidobacterium* sp.) demonstrou uma redução perceptível em suas populações ao longo do período do estudo nos camundongos submetidos ao coquetel de antibióticos ($p < 0,0001$).

6.2 Impacto da infecção por *Trypanosoma cruzi* na microbiota intestinal em camundongos com microbiota modulada pelo uso de antibióticos

Após a conclusão do regime de tratamento para modulação da microbiota intestinal, os animais foram inoculados com formas tripomastigotas das cepas Colombiana ou CL Brener de Tc. A análise quantitativa da carga bacteriana total revelou que a infecção pela cepa Colombiana resultou em um aumento superior a 27 vezes na população bacteriana em animais previamente tratados com antibióticos, observado tanto nas fases aguda quanto crônica da infecção. Já a cepa CL Brener induziu um aumento significativo de 15 vezes na carga bacteriana durante a fase aguda, mas esse aumento não foi observado durante a fase crônica (Figura 8B).

Ao examinar os gêneros bacterianos específicos promotores de saúde (Figura 8C-E), padrões distintos foram observados entre as cepas Colombiana e CL Brener. Aos 30 dias pós-infecção (dpi), a cepa Colombiana levou a um aumento significativamente a quantidade de *Bacteroides* sp. ($p = 0,0271$) e

Bifidobacterium sp. ($p = 0,0001$), enquanto a CL Brener induziu um aumento na população de *Lactobacillus sp.* ($p < 0,0001$). Além disso, aos 100 dpi, a infecção com a cepa Colombiana em animais tratados resultou em um aumento significativo ($p = 0,0001$) em *Bifidobacterium sp.* Resultados relativo aos grupos infectados sem modulação da microbiota podem ser observados no Apêndice A figura 1.

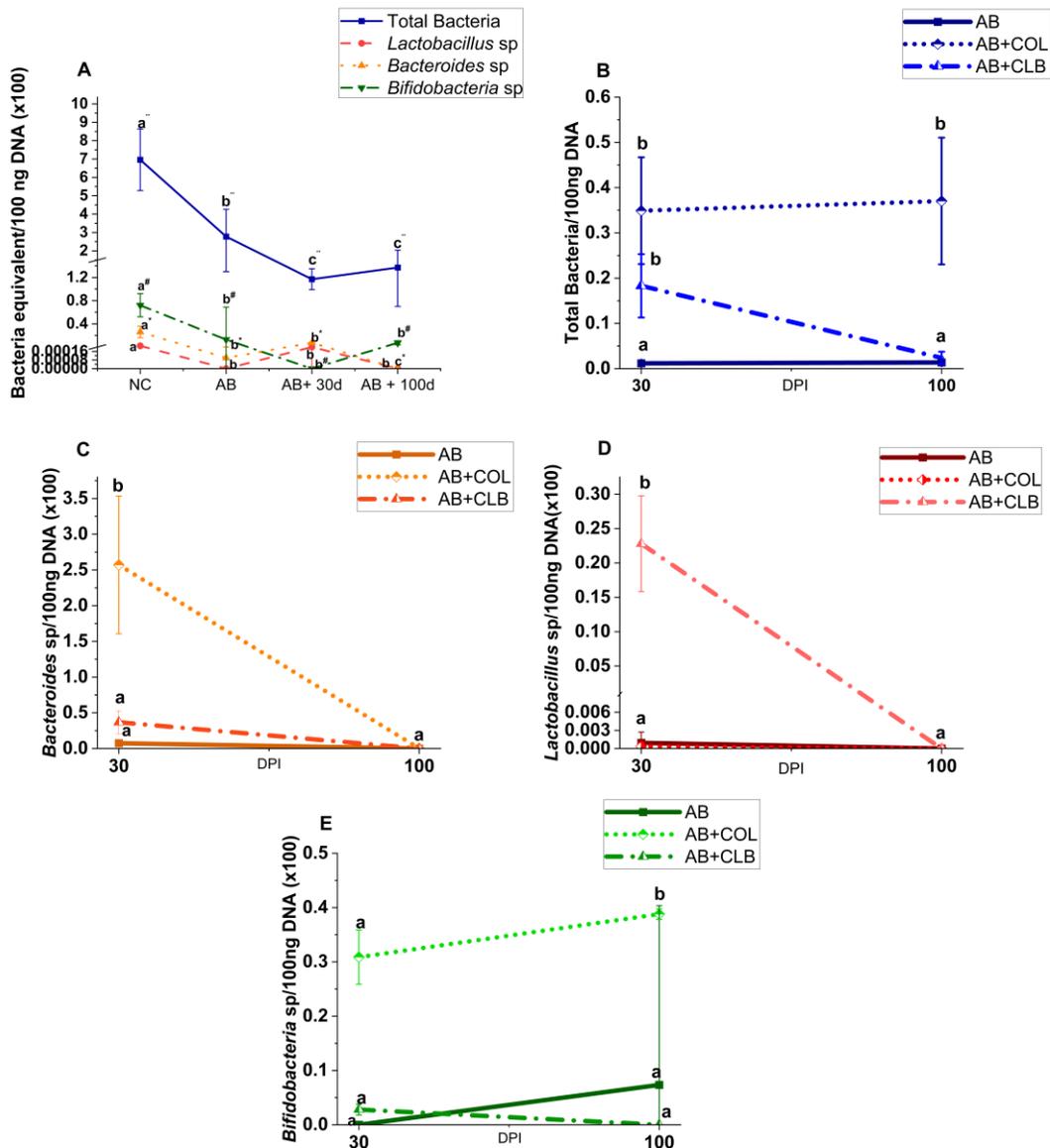


Figura 8. Eficácia do coquetel de antibióticos e impacto da infecção por *Trypanosoma cruzi* na microbiota intestinal de camundongos tratados. A) Quantificação absoluta das populações totais de bactérias, *Lactobacillus sp.*, *Bacteroides sp.* e *Bifidobacterium sp.* em camundongos não infectados e tratados com antibióticos. B-E) Avaliação quantitativa das populações bacterianas em camundongos tratados com antibióticos e infectados com *T. cruzi*: B) bactérias totais; C) *Bacteroides sp.*; D) *Lactobacillus sp.*; e E) *Bifidobacterium sp.* NC: controle negativo (não tratado e não infectado). AB: animais que receberam o coquetel de antibióticos.

COL: cepa Colombiana de *T. cruzi*. CLB: cepa CL Brener de *T. cruzi*. Designações de letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas dentro do respectivo grupo ($p \leq 0,05$).

6.3 Alterações dependentes da cepa na carga parasitária após a depleção da microbiota intestinal

A avaliação da carga parasitária de *Tc* no tecido cardíaco revelou uma redução inicial de cerca de 60% na carga parasitária em animais infectados com a cepa Colombiana, mediada pela administração de antibióticos ($p < 0,0001$; Figura 9A). No entanto, essa redução na parasitemia foi transitória, pois a carga parasitária retornou a níveis superiores aos dos animais infectados não tratados, aumento em 200 vezes aos 100 dpi nos animais submetidos ao tratamento com coquetel de antibióticos ($p < 0,0001$). Um padrão semelhante foi observado ao analisar a quantificação de parasitas no tecido intestinal dos animais (Figura 9B), mostrando uma redução inicial de aproximadamente 30% na carga parasitária, seguida de um aumento de 2,5 vezes aos 100 dpi, ($p < 0,0001$). Notavelmente, o tratamento com o coquetel de antibióticos resultou em uma carga parasitária sustentada durante ambas as fases aguda e crônica da infecção.

No contexto dos grupos infectados com a cepa CL Brener, nossos achados indicam que, aos 30 dpi, a aplicação de terapia antimicrobiana resultou em uma redução significativa de três vezes na carga parasitária no tecido cardíaco (Figura 9C; $p < 0,0001$), concomitante a um aumento de seis vezes na abundância de parasitas no tecido intestinal (Figura 9D; $p < 0,0001$). No entanto, aos 100 dpi, os efeitos da modulação parecem ter diminuído, pois não exerciam mais qualquer influência discernível sobre a carga parasitária em nenhum dos tecidos avaliados.

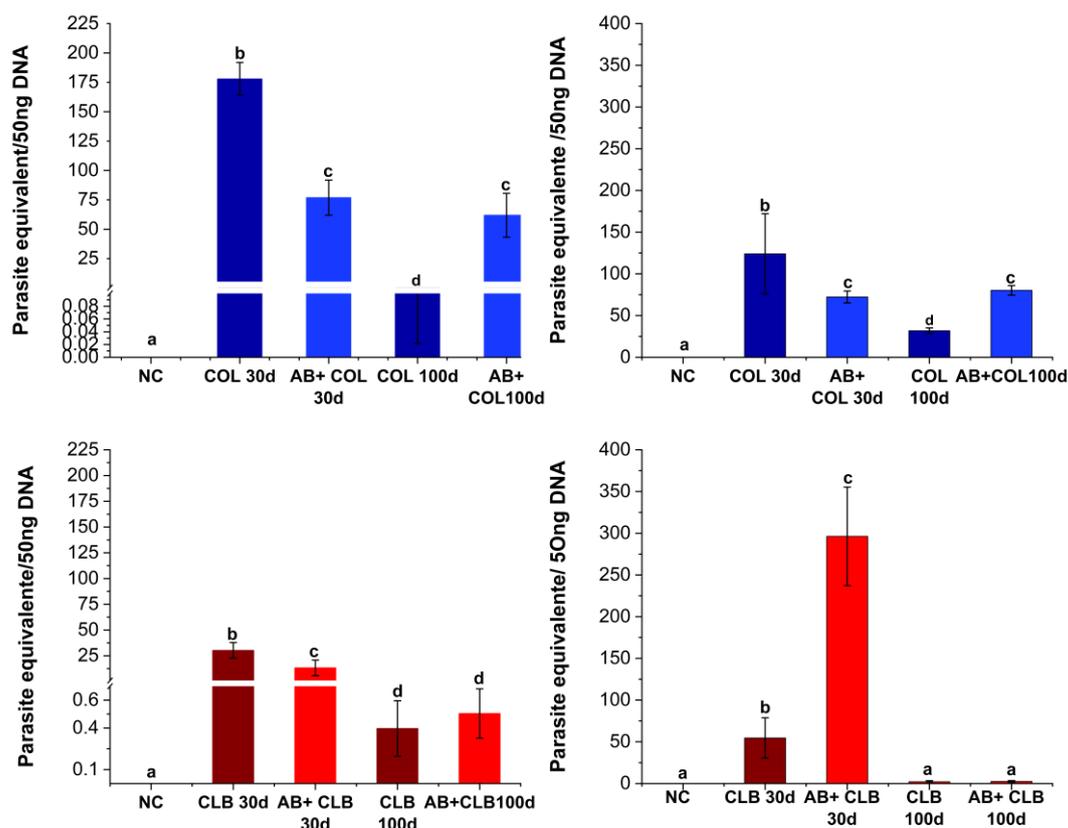


Figura 9. A estratégia de antibióticos mediada pela microbiota impacta a carga de *Trypanosoma cruzi*. Quantificação da carga parasitária no tecido cardíaco (A, C) e no tecido intestinal (B, D) de camundongos submetidos ao tratamento com coquetel de antibióticos por 21 dias e, posteriormente, infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* (COL, azul) ou a cepa CL Brener (CLB, vermelho). A avaliação foi realizada tanto aos 30 dpi quanto aos 100 dpi. Os seguintes grupos foram analisados: NC: grupo controle negativo (camundongos não tratados e não infectados); COL30d: camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 30 dpi; AB+COL30d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 30 dpi; COL100d: camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 100 dpi; AB+COL100d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 100 dpi; CLB30d: camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 30 dpi; AB+CLB30d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 30 dpi; CLB100d: camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 100 dpi; AB+CLB100d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 100 dpi. Letras alfabéticas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,0001$).

6.4 O tratamento com antibióticos tem impacto limitado na resposta imune ao *Trypanosoma cruzi*

Na fase experimental subsequente, avaliamos a ativação da resposta imune ao *Tc* em animais submetidos à terapia com antibióticos. Contrariando as expectativas, a modulação da microbiota exerceu uma influência mínima tanto na imunidade inata quanto na adaptativa em camundongos infectados. A produção de citocinas Th1, Th2 e Th17 em camundongos tratados e infectados

permaneceu consistente com a observada nos controles somente infectados, independentemente da cepa de *Tc* utilizada.

Discrepâncias estatisticamente significativas foram identificadas exclusivamente nos níveis de IL-10 aos 30 dias pós-infecção (dpi) e de IFN- γ aos 100 dpi (Figura 10 A-D). Aos 30 dpi, os animais que receberam o coquetel de antibióticos e foram infectados com a cepa CL Brener exibiram um aumento de 10 vezes na produção de IL-10 em comparação com o grupo apenas infectado ($p < 0,0001$). No entanto, essa alteração não foi evidente em camundongos infectados com a cepa Colombiana. Em relação ao IFN- γ aos 100 dpi, os animais com a modulação da microbiota apresentaram aumento da produção de citocinas em animais infectados com a cepa Colombiana, enquanto foi observada uma redução de mais de 80 vezes em camundongos infectados com a cepa CL Brener. Resultados relativo aos grupos infectados para as demais citocinas dosadas encontram-se no Apêndice A figura 2.

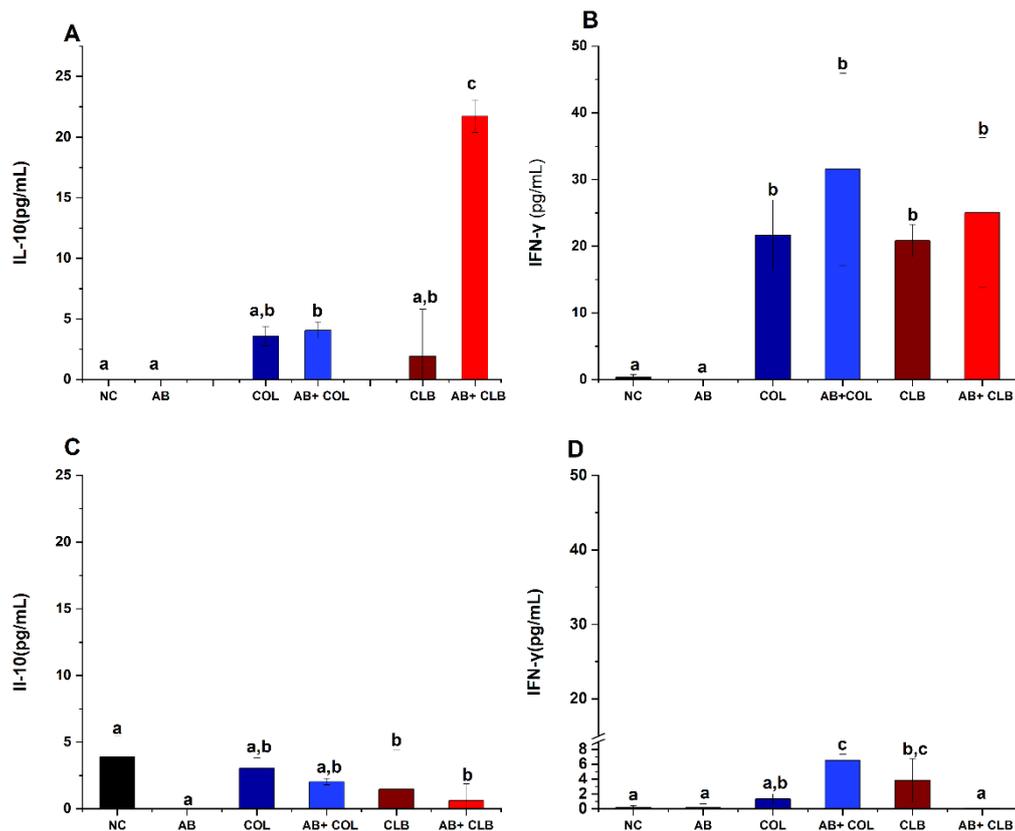


Figura 10. Produção de Citocinas em Camundongos Infectados com *Trypanosoma cruzi* e Tratados com Antimicrobianos. A citometria de fluxo foi utilizada para quantificar A) IL-10 aos 30 dias pós-infecção (dpi), B) IFN- γ aos 30 dpi, C) IL-10 aos 100 dpi e D) IFN- γ aos 100 dpi em diferentes grupos experimentais. NC: grupo controle negativo (camundongos não tratados e não infectados); AB: grupo tratado com antibióticos; COL30d: camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 30 dpi; AB+COL30d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 30 dpi; COL100d: camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 100 dpi; AB+COL100d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 100 dpi; CLB30d: camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 30 dpi; AB+CLB30d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 30 dpi; CLB100d: camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 100 dpi; AB+CLB100d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 100 dpi. Letras alfabéticas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,0005$).

Em relação à resposta imune adaptativa, a administração de antibióticos não afetou os títulos de anticorpos contra o parasito nem os autoanticorpos direcionados aos tecidos cardíacos e intestinais durante a fase aguda (Figura 11 A-C). Durante a fase crônica da infecção (Figura. 11 D-F), os resultados variaram dependendo da cepa de *T. cruzi*. Especificamente, a depleção da microbiota levou a um aumento de duas vezes na produção de anticorpos anti-*Tc* em

camundongos infectados com a cepa Colombiana ($p < 0,0006$). Para anticorpos contra o tecido intestinal houve, uma redução de duas vezes na produção de anticorpos nos grupos com a microbiota modulada ($p < 0,0001$), enquanto os anticorpos contra o tecido cardíaco foram reduzidos em mais de 50% nos animais com a microbiota modulada ($p < 0,05$). Em animais tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener, não foram detectadas modificações substanciais aos 100 dpi.

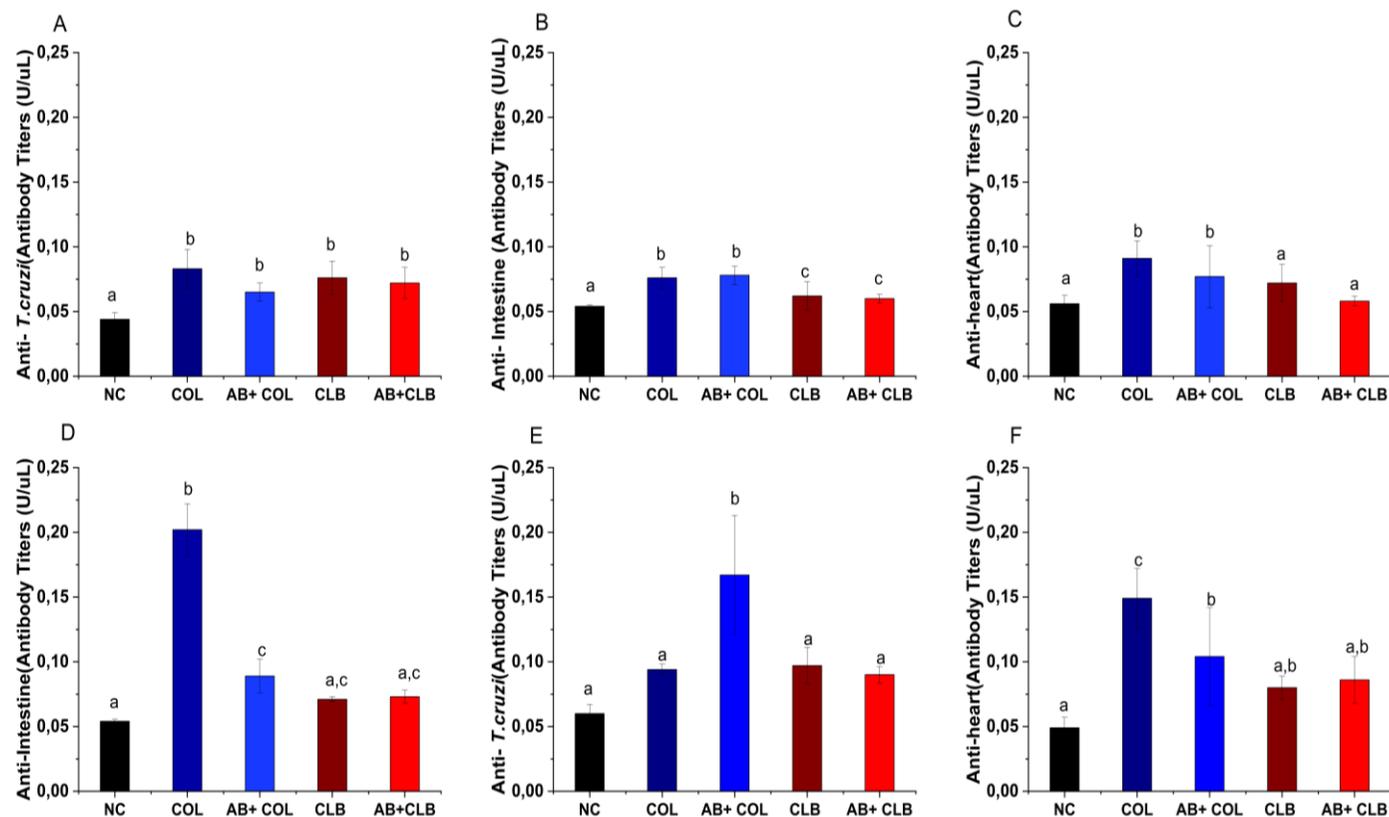


Figura 11. Avaliação de anticorpos em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* e Tratados com Antimicrobianos. Títulos específicos de anticorpos contra *T. cruzi* e autoanticorpos cardíacos e intestinais foram determinados em A-C) 30 dias pós-infecção (dpi) e D-F) 100 dpi. NC: grupo controle negativo (camundongos não tratados e não infectados); AB: grupo tratado com antibióticos; COL30d: camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 30 dpi; AB+COL30d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 30 dpi; COL100d: camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 100 dpi; AB+COL100d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 100 dpi; CLB30d: camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 30 dpi; AB+CLB30d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 30 dpi; CLB100d: camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 100 dpi; AB+CLB100d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 100 dpi. Letras alfabéticas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,0005$)

6.5 Efeito do tratamento com antibióticos na inflamação cardíaca e intestinal em doença de Chagas experimental

Para avaliar mais detalhadamente o impacto da modulação com antibióticos na integridade tecidual em camundongos infectados, analisamos a presença de ninhos de amastigotas e a gravidade da infiltração inflamatória, hemorragia e necrose nos tecidos cardíacos e do intestino grosso. Apesar da confirmação da infecção por *Tc* em ambos os tecidos por qPCR, não foram detectados ninhos de amastigotas em nenhum dos órgãos dos animais infectados com qualquer cepa do parasita, independentemente da modulação da microbiota com antibióticos em ambas as fases da infecção.

O exame histológico revelou infiltrados inflamatórios focais e difusos, variando de intensidade leve a grave. Necrose focal e hemorragia foram observadas especialmente no tecido cardíaco dos animais infectados, como mostrado na Figura 12 A-F. A análise dos infiltrados inflamatórios revelou uma reação mais pronunciada no tecido cardíaco em comparação ao tecido intestinal, tanto na fase aguda quanto crônica da infecção (Figura 12G). Importante destacar que as diferenças observadas no padrão de inflamação foram atribuídas principalmente à cepa infectante do parasito, ao invés da modulação da microbiota com antibióticos. Animais com a microbiota modulada apresentaram um aumento significativo na inflamação do tecido intestinal apenas na fase crônica da infecção pela cepa Colombiana ($p = 0,01$) em comparação com os não tratados.

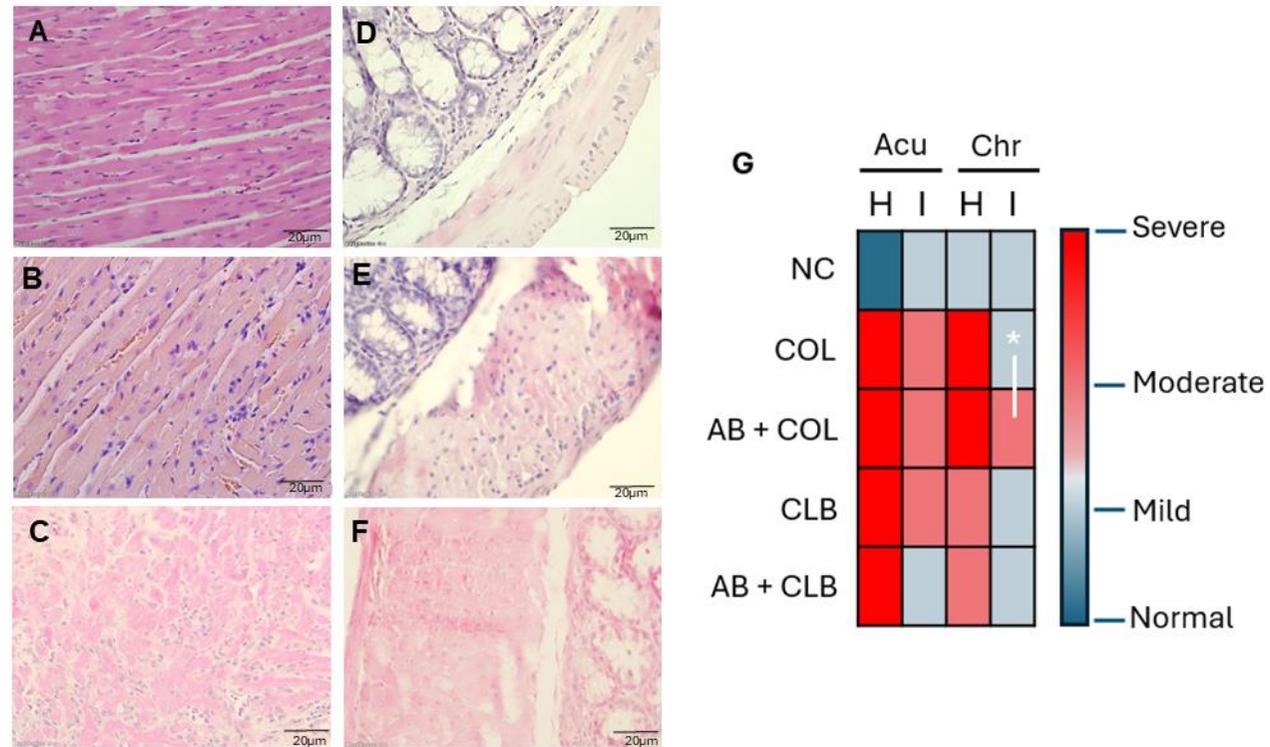


Figura 12.. Resposta inflamatória em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* após tratamento com antibióticos. Seções histológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) revelam a arquitetura cardíaca e intestinal normal em camundongos do grupo controle não infectados e não tratados (A, D). Em camundongos infectados por *T. cruzi* tratados com antibióticos, imagens representativas mostram: (B) inflamação moderada com infiltrados inflamatórios difusos e focais no coração; (C) infiltrados inflamatórios difusos graves com dano parenquimal associado no coração; (E) inflamação leve no intestino; e (F) inflamação moderada com alterações no parênquima intestinal. (G) A infiltração de leucócitos nos tecidos cardíaco e intestinal foi avaliada durante as fases aguda (Acu) e crônica (Chr) da infecção, utilizando uma análise em mapa de calor. A gravidade da inflamação foi classificada como: 0-0,2 (normal, azul escuro), 0,3-1,0 (leve, azul claro), 1,1-2,0 (moderada, vermelho claro) e 2,1-3,0 (grave, vermelho escuro). A barra de escala representa 10 μ m. NC: grupo controle não infectado; COL: cepa Colombiana de *T. cruzi*; AB+COL: cepa Colombiana de *T. cruzi* tratada com antibióticos; CLB: cepa CL Brener de *T. cruzi*; AB+CLB: cepa CL Brener de *T. cruzi* tratada com antibióticos. H: coração. I: intestino. p = 0,01

6.6 Análise de correlação

A análise isolada de diversos marcadores de patogênese na DC indica um impacto mínimo da modulação da microbiota pelo uso de antibióticos em vários dos parâmetros avaliados. No entanto, um modelo complexo que incorpora correlações temporais revela padrões e tendências distintas que não são aparentes na análise univariada.

Em animais infectados com a cepa Colombiana a 30 dpi (Figura. 13 A-B), animais com a microbiota modulada apresentaram novos padrões de correlação bacteriana, sugerindo um perfil de disbiose alterado em comparação com animais infectados não tratados. A modulação de *Bifidobacterium* sp. foi particularmente notável, pois impactou significativamente a carga parasitária intestinal e a produção de anticorpos que visam tanto os tecidos intestinais quanto o *T. cruzi*. Esta bactéria, juntamente com *Bacteroides* sp., exibiu uma correlação positiva com os níveis de IL-10. Além disso, o tratamento antimicrobiano levou a um aumento significativo na correlação positiva entre a carga parasitária cardíaca e os níveis de IFN- γ . Inversamente, foi observada uma correlação negativa entre os autoanticorpos cardíacos e os níveis de IFN- γ . Notavelmente, a relação entre a carga parasitária cardíaca e os autoanticorpos intestinais, previamente observada em animais sem modulação da microbiota, deixou de ser evidente. Em vez disso, a carga parasitária cardíaca exibiu uma influência direta na inflamação intestinal, que também foi modulada pela abundância de *Lactobacillus*.

Após a progressão para a fase crônica, animais com a microbiota modulada apresentaram fortalecimento das correlações existentes e introduziram novas associações entre os parâmetros analisados em animais infectados com a cepa Colombiana (Figura 13C-D). A abundância de *Bifidobacterium* sp. continuou a ser um fator significativo nas correlações observadas entre os animais tratados.

Este microrganismo foi associado a respostas imunes aumentadas aos antígenos cardíacos, levando a uma maior inflamação cardíaca. A carga bacteriana total e a abundância de *Bacteroides* também contribuíram para esses processos inflamatórios. De interesse, a inflamação cardíaca não estava mais significativamente correlacionada com IL-10 ou anticorpos anti-Tc. O IFN- γ

exibiu uma correlação negativa com *Bacteroides* e a carga parasitária cardíaca, indicando que níveis reduzidos de IFN- γ estavam associados a cargas parasitárias elevadas neste órgão.

Em camundongos infectados com a cepa CL Brener, a depleção da microbiota intestinal alterou significativamente a dinâmica das interações parasito-hospedeiro, tornando-as significativamente mais complexas durante as fases aguda e crônica da infecção. Em 30 dpi (Figura. 13E-F), o tratamento com antibiótico influenciou claramente a inflamação cardíaca, fortalecendo as correlações com a carga parasitária, a produção de anticorpos anti-Tc e anti-coração, *Bacteroides* e a quantidade de populações bacterianas totais. Além disso, as correlações envolvendo IL-10 tornaram-se estatisticamente significativas, com uma diminuição na contagem de bactérias totais e na abundância de espécies de *Lactobacillus*, sendo associada a níveis aumentados de IL-10. Além disso, IL-10 exibiu uma correlação positiva com anticorpos anti-Tc, que foram influenciados pela carga parasitária intestinal.

A análise de animais infectados com a cepa CL Brener em 100 dpi (Figura 13G-H) revelou padrões de correlação únicos em comparação com os grupos infectados não tratados e tratados e infectados com a cepa CL Brener. As populações bacterianas examinadas não apresentaram correlações significativas com marcadores da doença. No entanto, surgiram novas interações. Por exemplo, uma diminuição da carga de Tc intestinal foi associada a um título elevado de anticorpos anti-cardíacos, enquanto a carga parasitária cardíaca poderia influenciar a produção de anticorpos anti-Tc e a inflamação intestinal. Esta última também dependia dos níveis de IL-10, anticorpos anti-Tc e anti-intestino.

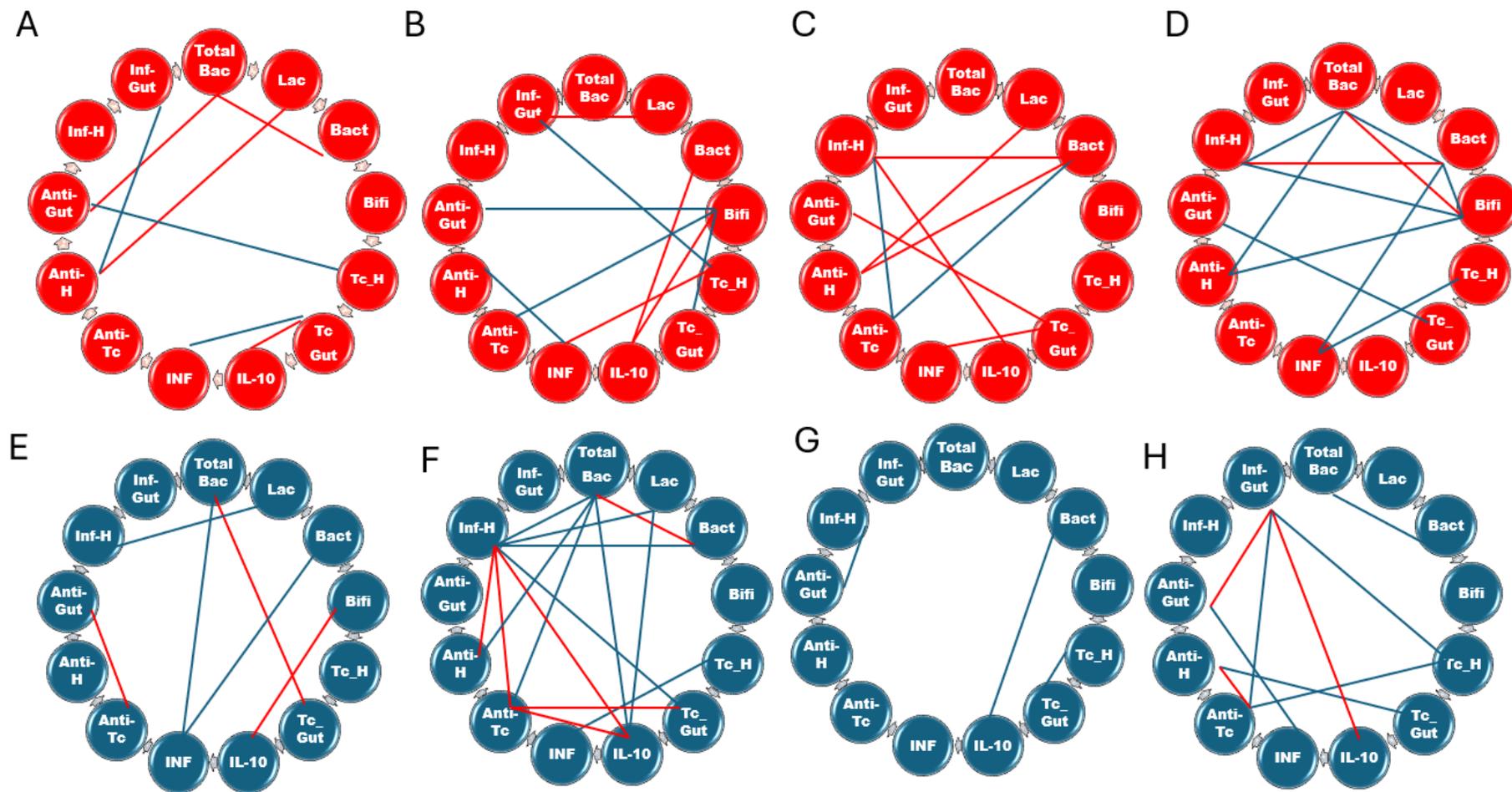


Figura 13. Análise de rede de correlação de Pearson dos parâmetros microbiota e associados ao hospedeiro durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos tratados com antibióticos. As redes de interação exibem matrizes de correlação para: (A) camundongos infectados pela cepa

Colombiana não tratados aos 30 dpi, (B) camundongos infectados pela cepa Colombiana tratados com antibióticos aos 30 dpi, (C) camundongos infectados pela cepa Colombiana não tratados aos 100 dpi e (D) camundongos infectados pela cepa Colombiana tratados com antibióticos aos 100 dpi. Os painéis (E) a (H) apresentam as matrizes de correlação correspondentes para camundongos infectados pela cepa CL Brener, com (E) representando camundongos não tratados aos 30 dpi, (F) camundongos infectados pela cepa CL Brener tratados com antibióticos aos 30 dpi, (G) camundongos infectados não tratados aos 100 dpi e (H) camundongos infectados pela cepa CL Brener tratados com antibióticos aos 100 dpi. Os parâmetros incluem: TotalBac (população bacteriana total), Lac (*Lactobacillus* sp.), Bact (*Bacteroides* sp.), Bif (*Bifidobacterium* sp.), Tc_H (carga parasitária cardíaca), Tc_Gut (carga parasitária intestinal), IL-10 (interleucina-10), IFN- γ (interferon-gama), Anti-Tc (títulos de anticorpos anti-*T. cruzi*), Anti-H (títulos de anticorpos anti-coração), Anti-Gut (títulos de anticorpos anti-intestino), Inf_H (inflamação cardíaca), Inf_Gut (inflamação intestinal). A rede de interação foi construída com correlações que apresentaram nível de significância $\leq 0,05$. **Linhas vermelhas** indicam correlações positivas, e **linhas azuis** indicam correlações negativa

6.7 Componentes principais do impacto de antibióticos na doença de Chagas

A análise de Componentes Principais revelou tendências relevantes no comportamento variável durante a progressão da doença em camundongos infectados por Tc, tanto nos animais com modulação da microbiota quanto sem modulação da microbiota (Figura 14). Os dois primeiros componentes principais representaram 69,9% e 84,6% da variação observada em camundongos somente infectados e tratados-infectados, respectivamente. No grupo sem alteração da microbiota, emergiram três *clusters* distintos. O primeiro *cluster* demonstrou uma associação positiva entre bactérias totais, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e IL-10. O segundo *cluster* abrangeu a carga parasitária no coração e intestino, juntamente com inflamação associada e IFN- γ . O gênero *Bacteroides* foi identificado na região de sobreposição entre o primeiro e o segundo *clusters*. O terceiro *cluster* estava no quadrante oposto ao segundo e incluía anticorpos contra Tc e autoanticorpos.

Após a depleção da microbiota, essas associações sofrem uma reconfiguração substancial, com uma sobreposição notável entre os componentes dos clusters 1 e 2. Essa reorganização permite a observação de uma associação mais próxima entre a carga parasitária intestinal, *Lactobacillus* e IL-10, enquanto a quantidade de bactérias totais e *Bifidobacterium* se integram aos elementos do *cluster* 2. Importante destacar que os anticorpos permanecem separados, formando um grupo independente dentro do terceiro *cluster*.

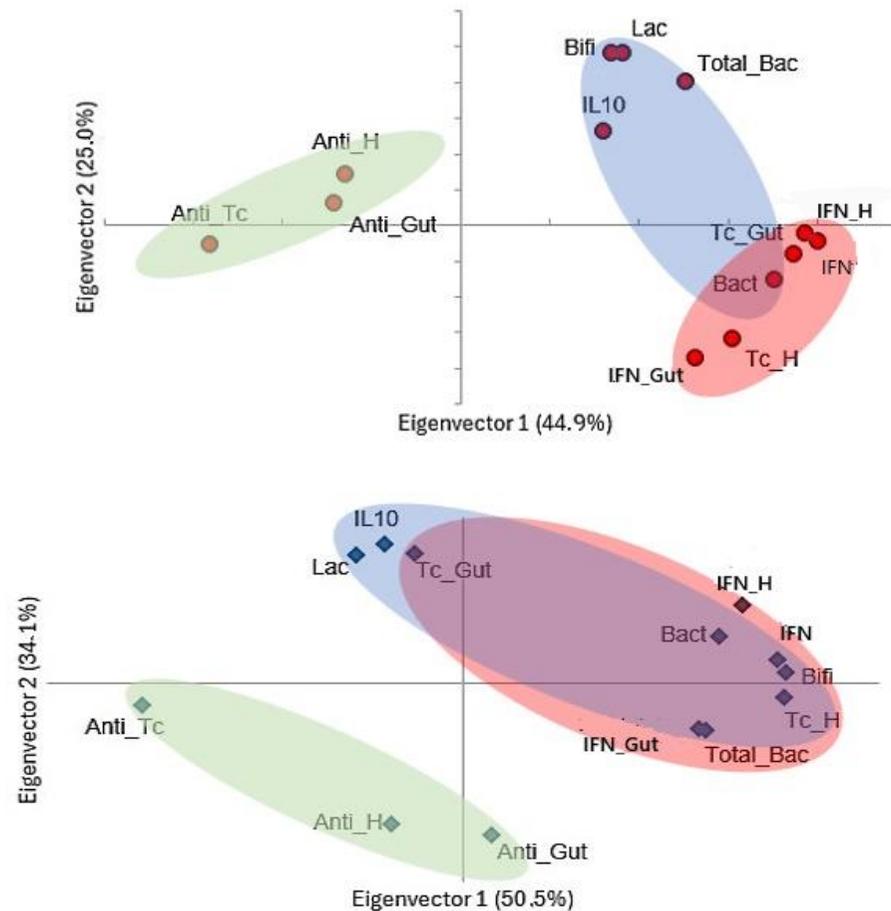


Figura 14. Análise de componentes principais de marcadores de patogênese em um modelo murino de doença de chagas sob tratamento com antibióticos. Camundongos infectados por *T. cruzi* parte superior e camundongos infectados por *T. cruzi* tratados com coquetel antibiótico parte inferior. Os valores entre parênteses indicam a variância explicada por cada componente principal (autovetor). Elementos semelhantes agrupados em clusters são destacados por elipses coloridas. TotalBac (população bacteriana total), Lac (*Lactobacillus* sp.), Bact (*Bacteroides* sp.), Bif (*Bifidobacterium* sp.), Tc_H (carga parasitária cardíaca), Tc_Gut (carga parasitária intestinal), IL-10 (interleucina-10), IFN (interferon-gama), Anti-Tc (títulos de anticorpos anti-*T. cruzi*), Anti-H (títulos de anticorpos anti-coração), Anti-Gut (títulos de anticorpos anti-intestino), Inf_H (inflamação cardíaca), Inf_Gut (inflamação intestinal).

7. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, a maioria dos estudos sobre a patogênese da Doença de Chagas (DC) focou principalmente na interação direta entre o hospedeiro e o parasita (ROSSI; DE SOUZA; RAMIREZ, 2024; TEIXEIRA, A. R. L. et al., 2011), muitas vezes negligenciando o contexto ecológico mais amplo e complexo em que essa interação ocorre. Esse contexto inclui uma variedade diversa de organismos simbióticos e patogênicos, particularmente a microbiota intestinal, que desempenha papéis críticos nos processos de saúde e doença. Dado que o papel da microbiota intestinal na patogênese da DC permanece amplamente inexplorado, este estudo utilizou a modulação da microbiota intestinal através de coquetéis de antibióticos, demonstrando que tal depleção pode alterar as correlações entre o parasita, a resposta imune do hospedeiro e a inflamação tecidual, com esses efeitos variando conforme a cepa infectante específica.

De forma interessante, estudos têm demonstrado que a infecção desempenha um papel importante na recolonização da microbiota intestinal, podendo levar à perda da resistência à colonização e ao aumento de patógenos (STECHER; HARDT, 2008), como no caso de enteropatógenos (KHAN et al., 2021).

A seguir, discutiremos de maneira mais detalhada os resultados encontrados no presente estudo

7.1 Eficiência do uso de antimicrobianos na modulação da microbiota intestinal

O uso de antibióticos como ferramenta para modular a microbiota e, subsequentemente, influenciar a resposta imune surgiu como uma abordagem convincente em modelos de doenças infecciosas (GONG *et al.*, 2022; VILLARINO *et al.*, 2016). Essa estratégia complementa outros métodos estabelecidos de modulação da resposta imune, como técnicas de engenharia genética que geram modelos animais knockout (KO) ou transgênicos. Embora a modulação mediada por antibióticos induza mudanças mais amplas e menos direcionadas na microbiota, levando a efeitos indiretos e incontroláveis tanto nas respostas imunes inatas quanto adaptativas (CAMPBELL *et al.*, 2023; EKMEKCIU *et al.*, 2017) essa abordagem é menos trabalhosa e mais econômica

em comparação com a complexidade envolvida na geração de modelos de engenharia. Desse modo, a modulação da microbiota por meio do uso de antibióticos facilita estudos práticos de curto prazo, visando examinar não apenas a resposta imune, mas também as interações multifacetadas entre o patógeno, a microbiota e o hospedeiro.

Em nosso estudo, a terapia com coquetel de antibióticos resultou em um esgotamento significativo da microbiota intestinal, incluindo gêneros comensais como *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. Esses achados corroboram a eficácia do protocolo descrito por Villarino *et al.*, 2016, na manipulação de populações bacterianas e demonstram que coquetéis de antibióticos podem ser tão eficazes em estudos que consideram os efeitos da depleção da microbiota (TIRELLE *et al.*, 2020).

A disbiose persistiu muito além da cessação do tratamento com antibióticos, destacando o impacto duradouro dos agentes antimicrobianos no ecossistema microbiano intestinal. De fato, o efeito combinatório de múltiplos antibióticos pode contribuir para a interrupção prolongada, como evidenciado por (PALLEJA *et al.*, 2018), que observou uma redução persistente na riqueza do microbioma humana seis meses após o tratamento com meropenem, gentamicina e vancomicina. Além disso, o espectro do antibiótico pode afetar diferencialmente a recuperação microbiana, potencialmente levando a alterações duradouras na microbiota intestinal (SCHWARTZ; LANGDON; DANTAS, 2020).

7.2. Análise univariada do Impacto do uso de antimicrobianos em animais infectados com o *Trypanosoma cruzi*

7.2.1 Carga parasitária na infecção pelo *T.cruzi*

A análise univariada avaliou o impacto dos antimicrobianos sobre a carga parasitária. Embora a persistência do parasito seja uma das principais teorias da patogênese da DC, ela nem sempre reflete cargas parasitárias elevadas detectáveis. Durante a fase aguda, a carga parasitária é mais facilmente detectada, enquanto na fase crônica sua detecção é intermitente. Contudo, aumentos na carga parasitária são importantes na reativação da doença, especialmente em casos de imunossupressão ou transmissão congênita (DE

SOUSA *et al.*, 2024). Ainda assim, a correlação entre gravidade da DC e alta carga parasitária permanece pouco clara, em parte devido a fatores como a autoimunidade, que precisam ser considerados (SANTI-ROCCA *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, a carga parasitária variou de acordo com a cepa do parasito, o órgão alvo e o tempo de infecção. Em animais infectados com a cepa Colombiana, notou-se uma manutenção da quantidade de parasitos ao longo do tempo experimental, diferindo do curso natural dessa infecção. Isso pode indicar que a eliminação de algumas populações bacterianas impeça o sistema imune de controlar a carga parasitária de maneira adequada, como observado em modelos experimentais semelhantes (DUARTE, R. *et al.* *et al.*, 2005; FLÁVIA NARDY; FREIRE-DE-LIMA; MORROT, 2015).

De fato, sabe-se que a microbiota intestinal desempenha um papel central na modulação da resposta imune, afetando a interação entre o hospedeiro e o *T. cruzi*. Alterações na microbiota, como aquelas induzidas por antimicrobianos, podem comprometer a produção de metabólitos imunomoduladores, como ácidos graxos de cadeia curta, considerados mediadores na comunicação entre o microbioma intestinal e o sistema imunológico (MORRISON; PRESTON, 2016; RANJBAR *et al.*, 2021; RATAJCZAK *et al.*, 2019)

Além disso, é possível que a microbiota possa influenciar a patogênese da DC por meio da modulação da imunidade de barreira e da manutenção da homeostase tecidual. A depleção de bactérias benéficas poderia favorecer a translocação de parasitos que habitam o intestino para diferentes tecidos, exacerbando a inflamação e aumentando a carga parasitária em órgãos-alvo, como por meio de uma barreira de muco mais penetrável (FEKETE *et al.*, 2021)

7.2.2 Resposta imune a infecção pelo *T.cruzi*

A resposta imune na DC é estabelecida por forte ativação do sistema imune para combate inicial dos parasitas, com ativação de citocinas pro inflamatórias, IFN- γ e TNF- α , (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Esses estudos foram corroborados pelas dosagens de citocinas realizadas pelo nosso grupo, que evidenciaram maiores alterações em animais de fase crônica com a microbiota modulada. Na forma cardíaca, predomina um ambiente pró-inflamatório enquanto na fase indeterminada observa-se um ambiente imune mais regulado, com produção maior de IL-10 e IL-17, e estudos com animais

knockout demonstram o impacto da supressão de citocinas no curso da infecção por *T.cruzi*. (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

De forma interessante, nosso estudo revelou aumento nos níveis IFN- γ em animais de fase crônica com a microbiota modulada infectados com a cepa Colombiana, enquanto animais infectados com a cepa CL Brener apresentaram redução dessa citocina. Duarte, R et al 2005 verificaram que, em animais gnotobióticos, ocorre alteração da resposta imune para perfil pró-inflamatório, entretanto essa alteração é dependente do componente bacteriano, já que monoassociações induziram predominantemente uma resposta imune específica do tipo Th1 (DUARTE, R. et al. *et al.*, 2005)

Adicionalmente, os aspectos genéticos devem ser considerados na resposta imunológica. Dependendo da linhagem, animais BALB/c apresentaram maiores valores de citocinas pró-inflamatórias (como IFN- γ e IL-6) e de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) em resposta à infecção, quando comparados aos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Tulahuen (CASTAÑEDA *et al.*, 2023). Os metabólitos encontrados nas fezes podem ajudar a compreender a persistência do parasita no trato gastrointestinal, como produtos do metabolismo do ácido linoleico, que alteram as respostas inflamatórias intestinais, promovendo a diminuição da expressão de TNF- α (MCCALL *et al.*, 2018).

Outro fator importante pode ser relacionado a cepa uma vez que nosso estudo encontrou diferença na produção de IL-10 a depender da cepa e fase da infecção, contrapondo o estudo de Duarte et al., 2004, onde não houve diferença nessa produção em camundongos convencionais ou *germ-free* infectados com a cepa Y (DUARTE *et al.*, 2004).

A produção de autoanticorpos também é um aspecto relevante para compreender a progressão da DC. No presente estudo, foi evidenciado que, na fase aguda, não houve alterações significativas devido à modulação da microbiota intestinal. No entanto, na fase crônica observou-se um aumento de produção de anti- Tc e uma redução de autoanticorpos contra o coração e intestino o que vai de encontro ao estudo de Duarte et al., 2005, onde as medições dos níveis totais de IgG refletem uma mudança em direção a uma resposta Th1 (DUARTE, R. et al., 2005).

O equilíbrio entre a persistência da infecção e a resposta imune do hospedeiro é crucial para o estabelecimento e a progressão da cardiomiopatia, sendo importante levar em consideração os diferentes aspectos relacionados a resposta imune (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WESLEY, Moisés *et al.*, 2019).

7.3. Padrões e tendências observados nos modelos de análises complexas

A redução da microbiota mediada por antibióticos alterou significativamente as relações entre os marcadores de patogênese da doença, como evidenciado pela análise de componentes principais, que foi conduzida sem estratificação por cepa ou tempo. Em animais infectados não tratados, a carga de Tc, IFN- γ e *Bacteroides* - uma bactéria implicada em processos inflamatórios tanto benéficos quanto prejudiciais (KHALEDI *et al.*, 2024) foram agrupados, sugerindo um papel sinérgico na inflamação. Inversamente, a carga bacteriana total, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e IL-10 foram agrupados, indicando uma resposta anti-inflamatória e homeostática. Os anticorpos que visam Tc e antígenos do hospedeiro demonstraram um papel dúbio, potencialmente contribuindo tanto para o reparo tecidual quanto para a inflamação (ROSSI; DE SOUZA; RAMIREZ, 2024; WATANABE COSTA; DA SILVEIRA; BAHIA, 2016), destacando a complexa interação entre a resposta imune e a progressão da doença.

Após o tratamento antimicrobiano, alterações nas contagens bacterianas totais e de *Bifidobacterium* levaram ao seu deslocamento para o cluster pró-inflamatório, implicando uma possível perda de seus papéis imunomoduladores e anti-inflamatórios (KHALEDI *et al.*, 2024). Além disso, a carga parasitária no intestino começou a se associar com elementos anti-inflamatórios, como *Lactobacillus* e IL-10, potencialmente indicando que a persistência do parasita no intestino é menos patogênica do que sua disseminação para outros tecidos, como o coração. Notavelmente, os anticorpos continuaram a aparecer separados dos eixos pró e anti-inflamatórios, sugerindo que a depleção da microbiota não altera significativamente seu papel na patogênese da DC (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; MCCALL *et al.*, 2018; KWAKYE-NUAKO; MIDDLETON; MCCALL, 2024).

Análise adicional da produção de anticorpos revelou que o tratamento com antibióticos afetou os anticorpos específicos para o parasita e autoanticorpos apenas durante a fase crônica, provavelmente devido à ação local e não sistêmica dos anticorpos IgM secretados pelos linfócitos B residentes da mucosa intestinal em resposta às mudanças da microbiota. Em contraste, os anticorpos IgG são capazes de translocar além do intestino para agir em outros tecidos (STERLIN *et al.*, 2020).

Essas descobertas fornecem uma visão abrangente dos efeitos da redução da microbiota intestinal em animais infectados com Tc. No entanto, o uso de diferentes cepas de Tc levou a variações nas respostas imunes e correlações entre os parâmetros analisados, tanto com quanto sem intervenção antibiótica, como evidenciado por perfis bacterianos distintos entre Colombiana e CL Brener. Essas diferenças específicas da cepa podem estar ligadas à composição proteica distinta e à abundância de vesículas extracelulares (EVs) secretadas por cada cepa de Tc (NOGUEIRA *et al.*, 2015), que poderiam mediar interações específicas com a comunidade bacteriana. Essa hipótese é apoiada pelo papel do trato gastrointestinal como um reservatório principal de Tc, onde tanto o parasita quanto as EVs derivadas do hospedeiro modulam ativamente o ambiente de infecção local - incluindo o microbioma intestinal - influenciando assim as respostas imunes e a progressão da doença (ROSSI *et al.*, 2024).

Portanto, essas diferenças específicas da cepa destacam as interações complexas entre o parasita, a imunidade do hospedeiro e o microbioma intestinal, que são moldadas pelas características genéticas e bioquímicas únicas de cada cepa de Tc (GUHL; RAMÍREZ, 2011; HORNE *et al.*, 2019; MEDINA-RINCÓN *et al.*, 2021; ZINGALES; BARTHOLOMEU, 2021), com potenciais implicações terapêuticas que apoiam uma abordagem personalizada para o manejo da DC. A variabilidade nessas interações, agravada pelos diversos modelos experimentais e pelo número limitado de estudos nesta área (TEOTÔNIO *et al.*, 2019), dificultou a comparação direta de nossos resultados com achados previamente relatados. As sessões subsequentes explorarão os efeitos específicos do tratamento antimicrobiano na dinâmica hospedeiro-parasita para cada uma das cepas de Tc utilizadas neste estudo.

7.1 Camundongos Infectados com a Cepa Colombiana

Em animais tratados e infectados com a cepa Colombiana, a carga bacteriana total permaneceu estável durante todo o período experimental. No entanto, houve uma redução significativa na abundância das populações de *Bacteroides* e *Lactobacillus* em 100 dpi, sugerindo um aumento compensatório em outros gêneros bacterianos. O fenômeno do deslocamento da população bacteriana após a administração de antibióticos é bem documentado, muitas vezes resultando na proliferação de espécies potencialmente patogênicas (BERNABÈ *et al.*, 2023; LAUBITZ *et al.*, 2021).

Nestes animais, a intervenção antibiótica precoce levou a uma redução da carga parasitária tanto no intestino quanto no coração em 30 dpi. Nossos achados divergem dos relatados por Vieira *et al.* e Duarte *et al.* (DUARTE *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 1987), que observaram que em camundongos infectados com a cepa Y, a perda da microbiota natural exacerba ou não tem efeito na carga parasitária.

Notavelmente, o parasitismo intestinal foi inversamente correlacionado com a abundância de *Bifidobacterium*, um gênero previamente implicado na atividade antiprotzoária contra *Giardia lamblia* e *Plasmodium berghei* (FITRI *et al.*, 2023; FONSECA *et al.*, 2019). O parasitismo cardíaco, por outro lado, foi negativamente correlacionado com a produção de IFN- γ , uma citocina pró-inflamatória com conhecida atividade anti-Tc (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018; KOH *et al.*, 2023; WILLIAMS *et al.*, 2020), em um modelo em que a presença do parasita desencadeia a produção de IFN- γ , reduzindo subsequentemente os números de parasitas (DENG; GRAHAM; CHEN, 2023).

A longo prazo (100 dpi), a microbiota modulada pelo tratamento antibiótico levou a cargas parasitárias que permaneceram elevadas em níveis característicos da fase aguda da infecção, desviando-se da progressão típica da doença (ROSSI; DE SOUZA; RAMIREZ, 2024). Nesse contexto, a carga parasitária aumentada foi associada a uma menor produção de IFN- γ em comparação com os níveis observados durante a fase aguda, indicando que os níveis de citocina eram insuficientes para controlar a replicação do parasita. É importante notar que foi demonstrado que a supressão da microbiota intestinal

induzida por antibióticos pode reduzir os níveis sistêmicos de IFN-I através da via cGAS-STING-IFN-I (ERTTMANN *et al.*, 2022).

Quanto à resposta imune humoral, a importância de *Bifidobacterium* é novamente evidente no grupo de camundongos tratados e infectados em 30 dpi. Nesse grupo, uma maior abundância de *Bifidobacterium* correlaciona-se com uma redução na produção de anticorpos contra Tc, bem como contra antígenos intestinais e, em menor extensão, contra antígenos cardíacos ($p = 0,06$). Essa observação está alinhada com a conhecida capacidade das bifidobactérias de promover o desenvolvimento de uma resposta tolerogênica a vários antígenos (GAVZY *et al.*, 2023), provavelmente facilitada por sua associação positiva com a citocina anti-inflamatória IL-10. Em apoio a isso, foi demonstrado que componentes de superfície de *B. longum* podem estimular células mononucleares de sangue periférico a secretar IL-10 (MEDINA *et al.*, 2007).

Durante a fase crônica, uma maior abundância de *Bifidobacterium* foi associada à redução dos títulos de autoanticorpos cardíacos e a uma inflamação cardíaca atenuada. Adicionalmente, a diminuição das populações de *Bacteroides* foi relacionada à melhoria na inflamação cardíaca. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram o impacto da composição da microbiota intestinal em processos inflamatórios em vários órgãos além do intestino (DEROVS; LAIVACUMA; KRUMINA, 2019; MARANO *et al.*, 2023). Embora esses resultados possam sugerir um possível efeito cardioprotetor da terapia antibiótica em camundongos infectados com a cepa Colombiana, estudos de acompanhamento a longo prazo são necessários para confirmar essa hipótese, especialmente considerando o aumento observado na carga parasitária nesses animais, junto com uma resposta inflamatória comparável àquela observada em controles positivos infectados e não tratados.

Inversamente, a inflamação intestinal foi exacerbada em 100 dpi em camundongos tratados com antibióticos, coincidindo com uma inversão da correlação entre a inflamação intestinal e a produção de anticorpos anti-Tc em comparação com os controles infectados não tratados. Essa observação sugere um possível papel da mimetização molecular, em que anticorpos IgG levantados contra o parasita podem reagir de forma cruzada com proteínas intestinais (BERN, 2015; BONNEY *et al.*, 2019; MESSENGER; MILES; BERN, 2015). Esse processo pode ser ainda mais amplificado pelos níveis aumentados de IFN- γ

sistêmico observados nesses animais (BO *et al.*, 2018; ZEBRACK; ANDERSON, 2003).

7.2 Camundongos Infectados com a Cepa CL Brener

O tratamento antimicrobiano de camundongos infectados com a cepa Tc CL Brener teve um impacto limitado na composição bacteriana geral em comparação com os controles não infectados. A exceção foi o aumento significativo da abundância de *Lactobacillus* em 30 dpi. Contrariamente a relatos anteriores que demonstram os efeitos anti-inflamatórios deste gênero bacteriano (CHEN *et al.*, 2021; JO *et al.*, 2016; YOSHIKAWA *et al.*, 2021), nossos achados indicam que a expansão da abundância de *Lactobacillus* em camundongos tratados em CD aguda está associada à diminuição da produção de IL-10. Essa discrepância pode ser atribuída ao contexto único da infecção por Tc, onde um ambiente pró-inflamatório é crucial para combater o parasita (BONNEY *et al.*, 2019; MESSENGER; MILES; BERN, 2015). Os estudos anteriores citados provavelmente empregaram modelos não infectados, limitando sua aplicabilidade em contextos de doenças infecciosas.

A carga bacteriana total foi um fator significativo nas correlações observadas com as respostas imunes do hospedeiro. Uma diminuição na abundância bacteriana total foi associada a uma exacerbação da inflamação. Estudos anteriores demonstraram o papel crucial da microbiota intestinal na regulação da expressão de NF- κ B, um fator de transcrição envolvido na ativação de vários genes relacionados à inflamação e cuja modulação está implicada no desenvolvimento de várias patologias, incluindo doenças cardiovasculares e autoimunes (HOU *et al.*, 2022).

No contexto do combate ao Tc, a terapia antimicrobiana prévia em camundongos infectados por Tc resultou em aumento do parasitismo intestinal em 30 dpi. Sabe-se que distúrbios específicos da microbiota intestinal podem promover alterações no metabolismo do ácido linoleico, o que pode imunomodular a resposta imune do hospedeiro para favorecer a persistência do parasita no organismo hospedeiro (HOSSAIN *et al.*, 2020). Notavelmente, a carga parasitária elevada foi associada a níveis aumentados de anticorpos anti-Tc, entretanto não foi encontrada diferença estatística. Esses anticorpos, juntamente com autoanticorpos cardíacos, podem contribuir para a inflamação

cardíaca observada nos animais infectados. No entanto, dado que este é um estágio inicial da infecção, é plausível que a auto-reatividade possa desempenhar um papel protetor em vez de um papel prejudicial, pois os autoanticorpos IgM foram implicados na recuperação do tecido danificado (MATSUDA *et al.*, 2021; TRIER; HOUEN, 2023).

À medida que a DC progride para sua fase crônica e a carga parasitária diminui naturalmente, a administração de antibióticos resulta em uma correlação negativa entre a carga parasitária cardíaca e os anti-Tc, bem como entre a carga parasitária intestinal e os autoanticorpos cardíacos. Esse perfil imunológico alterado pode contribuir para processos auto-reativos contínuos que são prejudiciais ao tecido cardíaco do hospedeiro. No entanto, não foi observada uma exacerbação da resposta inflamatória nos animais tratados com antibióticos, possivelmente devido ao estágio relativamente inicial da infecção crônica em que os camundongos foram avaliados.

8. CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou a relevância da microbiota intestinal na patogênese da doença de Chagas. O uso de coquetel antimicrobiano reduziu a carga bacteriana total e alterou gêneros específicos, como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, com variações dependentes da cepa e fase da infecção. A carga parasitária foi impactada na fase aguda, estabilizando-se na crônica, enquanto a resposta imune mostrou alterações limitadas e dependentes da cepa. Em animais infectados com a cepa *Colombiana*, observou-se maior dosagem de autoanticorpos e impacto inflamatório no tecido cardíaco. Esses achados sugerem que a disbiose influencia o controle da infecção e o equilíbrio das respostas imunológicas, destacando a necessidade de análises multifatoriais para compreender o papel da microbiota intestinal na doença de Chagas.

9. PERSPECTIVAS

Futuros estudos visando avaliar os efeitos específicos de antibióticos individuais na modulação da microbiota e suas contribuições para a progressão da DC podem fornecer *insights* essenciais para a patogênese desta condição. Além disso, a pesquisa deve se concentrar em elucidar os mecanismos precisos pelos quais alterações específicas na microbiota influenciam a imunidade do hospedeiro e os resultados da doença considerando o papel significativo da microbiota nas respostas imunes do hospedeiro, nossos achados no modelo murino podem ter importantes implicações para a DC humana. Embora as diferenças entre os microbiomas murino e humano exijam uma interpretação cuidadosa, os efeitos observados da modulação da microbiota sobre os parâmetros imunológicos e a progressão da doença podem sugerir novas vias terapêuticas. Investigar esses mecanismos em modelos humanos pode esclarecer se intervenções direcionadas à microbiota, como probióticos, prebióticos ou regimes antibióticos personalizados, podem servir como estratégias adjuvantes para melhorar os resultados da doença em pacientes com Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 9, n. August, p. 1929, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>

ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 473–493, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>

ALOU, M. T. *et al.* State of the art in the culture of the human microbiota: New interests and strategies. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 1–21, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00129-19>

ARAÚJO-JORGE, T. C. de; CASTRO, S. L. de. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. [S. l.: s. n.], 2000. Available at: <https://doi.org/10.7476/9788575413937>

ARBOLEYA, S. *et al.* Gut bifidobacteria populations in human health and aging. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. AUG, p. 1–9, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01204>

AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0307312101>

BARASH, N. R. *et al.* Giardia alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. **Infection and Immunity**, [s. l.], 2017. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00948-16>

BARCIK, W. *et al.* The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. **Immunity**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 241–255, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.007>

BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E. G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 458–478, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.003>

BERG, G. *et al.* Microbiome d1. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**. 2020;8(1):1–22. efinition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–22, 2020.

BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>

BERNABÈ, G. *et al.* Antibiotic Treatment Induces Long-Lasting Effects on Gut Microbiota and the Enteric Nervous System in Mice. **Antibiotics**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1–15, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061000>

BLEICH, A.; FOX, J. G. The mammalian microbiome and its importance in laboratory animal research. **ILAR Journal**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 153–158, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv031>

BO, M. *et al.* Interferon regulatory factor 5 is a potential target of autoimmune response triggered by Epstein-Barr virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in rheumatoid arthritis: Investigating a mechanism of molecular mimicry. **Clinical and Experimental Rheumatology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 0376–0381, 2018.

BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back, looking ahead. **American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 185, n. 6, p. 1537–1547, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.023>

CAMPBELL, C. *et al.* Crosstalk between Gut Microbiota and Host Immunity: Impact on Inflammation and Immunotherapy. **Biomedicines**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020294>

CASTAÑEDA, S. *et al.* Microbiome Alterations Driven by Trypanosoma cruzi Infection in Two Disjunctive Murine Models . **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–16, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00199-23>

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** [S. l.: s. n.], 1909. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0074-02761909000200008>

CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1866, n. 5, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165689>

CHEN, X. *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG Reduces β -conglycinin-Allergy-Induced Apoptotic Cells by Regulating Bacteroides and Bile Secretion Pathway in Intestinal Contents of BALB/c Mice. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 55–55, 27 dez. 2020.

CHENG, H. Y. *et al.* Interactions between the gut microbiota and the host innate immune response against pathogens. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. MAR, p. 1–11, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00607>

CRISTOVÃO-SILVA, A. C. *et al.* Chagas disease: Immunology of the disease at a glance. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 62, n. August, p. 15–22, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.10.001>

D'AMELIO, P.; SASSI, F. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. **Calcified Tissue International**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 415–425, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>

DE BONA, E. *et al.* **Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy?** [S. l.: s. n.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>

DE SOUSA, A. S. *et al.* Chagas disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 403, n. 10422, p. 203–218, 2024. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01787-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01787-7)

DENG, S.; GRAHAM, M. L.; CHEN, X. M. The Complexity of Interferon Signaling in Host Defense against Protozoan Parasite Infection. **Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–22, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens12020319>

DEROVIS, A.; LAIVACUMA, S.; KRUMINA, A. Targeting microbiota: What do we know about it at present? **Medicina (Lithuania)**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 1–15, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/medicina55080459>

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on humang-microbe mutualism and disease. **Nature**, [s. l.], v. 449, n. 7164, p. 811–818, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature06245>

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, [s. l.], v. 25, n. spe, p. 7–86, 2016. Available at: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>

DOMINGUES, C. S. *et al.* Host Genetics Background Influence in the Intra-gastric *Trypanosoma cruzi* Infection. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. November, p. 1–20, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.566476>

DONG, L. N. *et al.* Role of intestinal microbiota and metabolites in inflammatory bowel disease. **Chinese Medical Journal**, [s. l.], v. 132, n. 13, p. 1610–1614, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000290>

DRISSI, F.; RAOULT, D.; MERHEJ, V. Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 106, p. 182–194, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.03.006>

DUARTE, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Influence of predominant bacteria from indigenous digestive microbiota on experimental infection in mice. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 111, n. 2, p. 87–96, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.06.002>

DUARTE, Rinaldo *et al.* Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 741–748, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45657-0>

ECHAVARRÍA, N. G. *et al.* Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Current Problems in Cardiology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 100507, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2019.100507>

EKMEKCIU, I. *et al.* Immune responses to broad-spectrum antibiotic treatment and fecal microbiota transplantation in mice. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. APR, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00397>

ERTTMANN, S. F. *et al.* The gut microbiota prime systemic antiviral immunity via the cGAS-STING-IFN-I axis. **Immunity**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 847-861.e10, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.04.006>

FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 55–71, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>

FEKETE, E. *et al.* *Giardia* spp. and the Gut Microbiota: Dangerous Liaisons. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. January, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618106>

FINK, M. Y.; SINGER, S. M. **The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis**. [S. l.: s. n.], 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.001>

FITRI, L. E. *et al.* Bifidobacterium longum Administration Diminishes Parasitemia and Inflammation During Plasmodium berghei Infection in Mice. **Journal of Inflammation Research**, [s. l.], v. 16, n. March, p. 1393–1404, 2023. Available at: <https://doi.org/10.2147/JIR.S400782>

FLÁVIA NARDY, A.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2015, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/178947>

FONSECA, J. F. *et al.* Probiotic effect of Bifidobacterium longum 51A and Weissella paramesenteroides WpK4 on gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Journal of Applied**

Microbiology, [s. l.], v. 127, n. 4, p. 1184–1191, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1111/jam.14338>

FRANCISCO, A. F. *et al.* Comparing in vivo bioluminescence imaging and the Multi-Cruzi immunoassay platform to develop improved Chagas disease diagnostic procedures and biomarkers for monitoring parasitological cure. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 1–16, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010827>

GAVZY, S. J. *et al.* Bifidobacterium mechanisms of immune modulation and tolerance. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 15, n. 2, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2291164>

GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. Lactobacillus species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 60, n. Suppl 2, p. S98–S107, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>

GOMES, C. *et al.* American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 81, p. 81–84, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.021>

GOMES, N. *et al.* Uncovering the effects of Giardia duodenalis on the balance of DNA viruses and bacteria in children's gut microbiota. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 247, n. September, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107018>

GONG, Y. *et al.* Antibiotic Changes Host Susceptibility to Eimeria falciformis Infection Associated with Alteration of Gut Microbiota. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 90, n. 10, p. 1–11, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1128/iai.00229-22>

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 164–169, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2019.04.008>

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Trypanosoma cruzi I diversity: Towards the need of genetic subdivision? **Acta Tropica**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 1–4, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.002>

GUIMARÃES QUINTANILHA, A. *et al.* Chagasic megacolon and proximal jejunum microbiota. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, [s. l.], 2000. Available at: <https://doi.org/10.1080/003655200750023606>

HALL, A. B.; TOLONEN, A. C.; XAVIER, R. J. **Human genetic variation and the gut microbiome in disease**. [S. l.: s. n.], 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.63>

HORNE, R. *et al.* Microbe and host interaction in gastrointestinal homeostasis. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 236, n. 5, p. 1623–1640, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05218-y>

HOSSAIN, E. *et al.* Mapping of host-parasite-microbiome interactions reveals metabolic determinants of tropism and tolerance in Chagas disease. *Science Advances*, v. 6, n. 30, 24 jul. 2020.

HOU, K. *et al.* Microbiota in Health and Diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 7, n. 135, 23 abr. 2022.

IATCU, C. O.; STEEN, A.; COVASA, M. Gut microbiota and complications of type-2 diabetes. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2022. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu14010166>

JAIMES, J. *et al.* Prokaryotic and eukaryotic skin microbiota modifications triggered by Leishmania infection in localized Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 1–25, 2024. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012029>

JANDHYALA, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>

JERNBERG, C. *et al.* Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. **ISME Journal**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 56–66, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.3>

JIAO, Y. *et al.* Crosstalk Between Gut Microbiota and Innate Immunity and Its Implication in Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. February, p. 1–15, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00282>

JO, S.-G. *et al.* Lactobacillus curvatus WiKim38 isolated from kimchi induces IL-10 production in dendritic cells and alleviates DSS-induced colitis in mice. *Journal of microbiology*, v. 54, n. 7, p. 503–509, 28 jun. 2016.

KENNEDY, M. S.; CHANG, E. B. The microbiome: Composition and locations. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, [s. l.], v. 176, p. 1–42, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.08.013>

KHALEDI, M. *et al.* The role of gut microbiota in human metabolism and inflammatory diseases: a focus on elderly individuals. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 1–24, 2024. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01744-5>

KOH, C. C. *et al.* Cytokine Networks as Targets for Preventing and Controlling Chagas Heart Disease. **Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens12020171>

KULLAR, R. *et al.* Lactobacillus Bacteremia and Probiotics: A Review. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1–14, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040896>

KWAKYE-NUAKO, G.; MIDDLETON, C. E.; MCCALL, L. I. Small molecule mediators of host-T. cruzi-environment interactions in Chagas disease. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 20, n. 3 March, p. 1–24, 2024. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012012>

LAMOUR, S. D. *et al.* Metabolic, immune, and gut microbial signals mount a systems response to Leishmania major infection. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 318–329, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1021/pr5008202>

LATIF, A. *et al.* Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. August, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>

LAUBITZ, D. *et al.* Dynamics of gut microbiota recovery after antibiotic exposure in young and old mice (A pilot study). **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 1–12, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030647>

LEUNG, J. M.; GRAHAM, A. L.; KNOWLES, S. C. L. **Parasite-microbiota interactions with the vertebrate gut: Synthesis through an ecological lens**. [S. l.: s. n.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00843>

LEVY, M.; THAISS, C. A.; ELINAV, E. Metabolites: Messengers between the microbiota and the immune system. **Genes and Development**, [s. l.], v. 30, n. 14, p. 1589–1597, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.284091.116>

LIDANI, K. C. F. *et al.* The complement system: A prey of Trypanosoma cruzi. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. APR, p. 1–14, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>

LÓPEZ-GARCÍA, A.; GILABERT, J. A. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: A systematic review. **Tropical Medicine and International Health**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 689–698, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1111/tmi.13915>

LUO, J. *et al.* The primary biological network of Bifidobacterium in the gut. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 365, n. 8, p. 1–7, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsle/fny057>

MACIEL-FIUZA, M. F. *et al.* Role of gut microbiota in infectious and inflammatory diseases. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. March, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1098386>

MAFTEI, N. M. *et al.* The Potential Impact of Probiotics on Human Health: An Update on Their Health-Promoting Properties. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–29, 2024. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020234>

MARANO, G. *et al.* The Microbiota–Gut–Brain Axis: Psychoneuroimmunological Insights. **Nutrients**, [s. l.], v. 15, n. 6, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu15061496>

MARIN-NETO, J. A. *et al.* **Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Diagnóstico e Tratamento de Pacientes com Cardiomiopatia da Doença de Chagas**. [S. l.: s. n.], 2022. v. 11 *E-book*.

MATSUDA, Y. *et al.* Characteristics of Immunoglobulin M Type Antibodies of Different Origins from the Immunologic and Clinical Viewpoints and Their Application in Controlling Antibody-Mediated Allograft Rejection. **Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 4, 1 jan. 2021.

MCCALL, L. I. *et al.* Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–15, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006344>

MEDINA-RINCÓN, G. J. *et al.* Molecular and clinical aspects of chronic manifestations in chagas disease: A state-of-the-art review. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 11, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens10111493>

MEDINA, M. *et al.* Differential immunomodulatory properties of Bifidobacterium logum strains: Relevance to probiotic selection and clinical applications. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 150, n. 3, p. 531–538, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03522.x>

MESSENGER, L. A.; MILES, M. A.; BERN, C. Between a bug and a hard place: Trypanosoma cruzi genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 995–1029, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1056158>

MODESTO, M.; CHECCUCCI, A.; MATTARELLI, P. **Identification of Bifidobacteria by the Phosphoketolase Assay**. [S. l.: s. n.], 2021. ISSN 19406029.v. 2278 Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1274-3_12

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 189–200, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>

MOUBARECK, C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 38–44, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh495>

MU, C.; ZHU, W. Antibiotic effects on gut microbiota, metabolism, and beyond. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 23–24, p. 9277–9285, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10165-x>

MWANGI, V. I. *et al.* Resisting an invasion: A review of the triatomine vector (Kissing bug) defense strategies against a *Trypanosoma* sp infection. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 238, n. November 2022, p. 106745, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106745>

NICOLE HARTWIG TRIER; GUNNAR HOUEN. Antibody Cross-Reactivity in Auto-Immune Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 17, p. 13609–13609, 2 set. 2023.

NOGUEIRA, P. M. *et al.* Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–16, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>

OMONDI, Z. N.; CANER, A. An Overview on the Impact of Microbiota on Malaria Transmission and Severity: Plasmodium–Vector–Host Axis. **Acta Parasitologica**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 1471–1486, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00631-4>

ORG, E. *et al.* Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. **Genome Research**, [s. l.], 2015. Available at: <https://doi.org/10.1101/gr.194118.115>

PALLEJA, A. *et al.* Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1255–1265, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0257-9>

PAQUIN-PROULX, D. *et al.* Bacteroides are associated with GALT iNKT cell function and reduction of microbial translocation in HIV-1 infection. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 69–78, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/mi.2016.34>

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)

QUEIROGA, T. B. D. *et al.* Virulence of *Trypanosoma cruzi* Strains Is Related to the Differential Expression of Innate Immune Receptors in the Heart. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. July, p. 1–14, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.696719>

RACKAITYTE, E.; LYNCH, S. V. The human microbiome in the 21st century. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 19–21, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18983-8>

RANJBAR, R. *et al.* Immunomodulatory roles of microbiota-derived short-chain fatty acids in bacterial infections. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 141, p. 111817, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111817>

RATAJCZAK, W. *et al.* Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived shortchain fatty acids (SCFAs). **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 1–12, 2019. Available at: https://doi.org/10.18388/abp.2018_2648

RIBEIRO, V. *et al.* **Current trends in the pharmacological management of Chagas disease.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.004>

RIOS, A. *et al.* Can sexual transmission support the enzootic cycle of *trypanosoma cruzi*? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], 2018. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170025>

ROBELLO, C. *et al.* The fecal, oral, and skin microbiota of children with Chagas disease treated with benznidazole. **PLoS ONE**, [s. l.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212593>

ROSSI, I. V. *et al.* *Trypanosoma cruzi* interaction with host tissues modulate the

composition of large extracellular vesicles. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–12, 2024. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55302-3>

ROSSI, I. V.; DE SOUZA, D. A. S.; RAMIREZ, M. I. The End Justifies the Means: Chagas Disease from a Perspective of the Host–Trypanosoma cruzi Interaction. **Life**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1–23, 2024. Available at: <https://doi.org/10.3390/life14040488>

RUIJTER, J. M. *et al.* Removal of between-run variation in a multi-plate qPCR experiment. **Biomolecular Detection and Quantification**, [s. l.], v. 5, p. 10–14, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.07.001>

SANTI-ROCCA, J. *et al.* A multi-parametric analysis of Trypanosoma cruzi infection: Common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08086-8>

SCHWARTZ, D. J.; LANGDON, A. E.; DANTAS, G. Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome. **Genome Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–12, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00782-x>

SHIKANAI YASUDA, M. A. Emerging and reemerging forms of trypanosoma cruzi transmission. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 1–16, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760210033>

SILBERSTEIN, E. *et al.* A novel nanoluciferase-based system to monitor Trypanosoma cruzi infection in mice by bioluminescence imaging. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 1–21, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195879>

SINGH, T. P. *et al.* Regulatory T cells control Staphylococcus aureus and disease severity of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 220, n. 12, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20230558>

STERLIN, D. *et al.* The antibody/microbiota interface in health and disease. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 3–11, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0192-y>

SUÁREZ, C. *et al.* Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. **Research and Reports in Tropical Medicine**, [s. l.], v. Volume 13, n. June, p. 25–40, 2022. Available at: <https://doi.org/10.2147/rrtm.s278135>

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], 2011. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>

TEIXEIRA, S. M.; EL-SAYED, N. M.; ARAÚJO, P. R. The Genome and Its Implications. **Advances in Parasitology**, [s. l.], v. 75, p. 209–230, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00010-1>

TEOTÔNIO, I. M. S. N. *et al.* Intestinal microbiota – A modulator of the Trypanosoma cruzi-vector-host triad. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 137, n. September, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103711>

TIRELLE, P. *et al.* Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02018-9>

TORRICO, F. *et al.* New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 1129–1140, 2021. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30844-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30844-6)

TURRONI, F. *et al.* Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria.

Trends in Microbiology, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 339–350, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.001>

TURRONI, F.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 37–44, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.010>

URSELL, L. K. *et al.* Defining the human microbiome. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 70, n. SUPPL. 1, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>

VELÁSQUEZ-ORTIZ, N.; RAMÍREZ, J. D. Understanding the oral transmission of *Trypanosoma cruzi* as a veterinary and medical foodborne zoonosis. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 132, n. May, p. 448–461, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.024>

VIEIRA, E. C. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in germfree, gnotobiotic, and conventional mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 385–387, 1987. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651987000600009>

VILLARINO, N. F. *et al.* Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 113, n. 8, p. 2235–2240, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1504887113>

WANG, J. *et al.* Gut-Microbiota-Derived Metabolites Maintain Gut and Systemic Immune Homeostasis. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1–26, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells12050793>

WANG, L.; ZHU, L.; QIN, S. Gut Microbiota Modulation on Intestinal Mucosal Adaptive Immunity. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2019, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/4735040>

WATANABE COSTA, R.; DA SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. MAR, p. 1–9, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00388>

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, n. AUG, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01856>

WEXLER, A. G.; GOODMAN, A. L. An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. April, p. 1–11, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>

WEXLER, H. M. *Bacteroides*: The good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 593–621, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>

WILLIAMS, T. *et al.* Induction of effective immunity against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 1–18, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00908->

World Health Organization. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed on June 10, 2024).

YOSHIKAWA, M. *et al.* Dectin-2 mediates phagocytosis of *Lactobacillus paracasei* KW3110 and IL-10 production by macrophages. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97087-9>

ZAFAR, H.; SAIER, M. H. Gut *Bacteroides* species in health and disease. **Gut Microbes**,

[s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–20, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158>

ZAGO, M. P. *et al.* TcI isolates of *Trypanosoma cruzi* exploit the antioxidant network for enhanced intracellular survival in macrophages and virulence in mice. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 1842–1856, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00193-16>

ZEBRACK, J. S.; ANDERSON, J. L. The role of infection in the pathogenesis of cardiovascular disease. **Progress in cardiovascular nursing**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 42–49, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.0889-7204.2003.01421.x>

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 492–506, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

ZINGALES, B. *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, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

ZINGALES, B. *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, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

ZINGALES, B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta tropica**, [s. l.], v. 68, p. 159–173, 1997. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X97000880>

ZINGALES, B.; BARTHOLOMEU, D. C. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Impact on transmission cycles and chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 116, n. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760210193>

ZINGALES, B.; MACEDO, A. M. Fifteen Years after the Definition of *Trypanosoma cruzi* DTUs: What Have We Learned? **Life**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1–27, 2023. Available at: <https://doi.org/10.3390/life13122339>

ZYOUD, S. H. *et al.* Global trends in research related to the links between microbiota and antibiotics: a visualization study. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–12, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34187-8>

APÊNDICE A

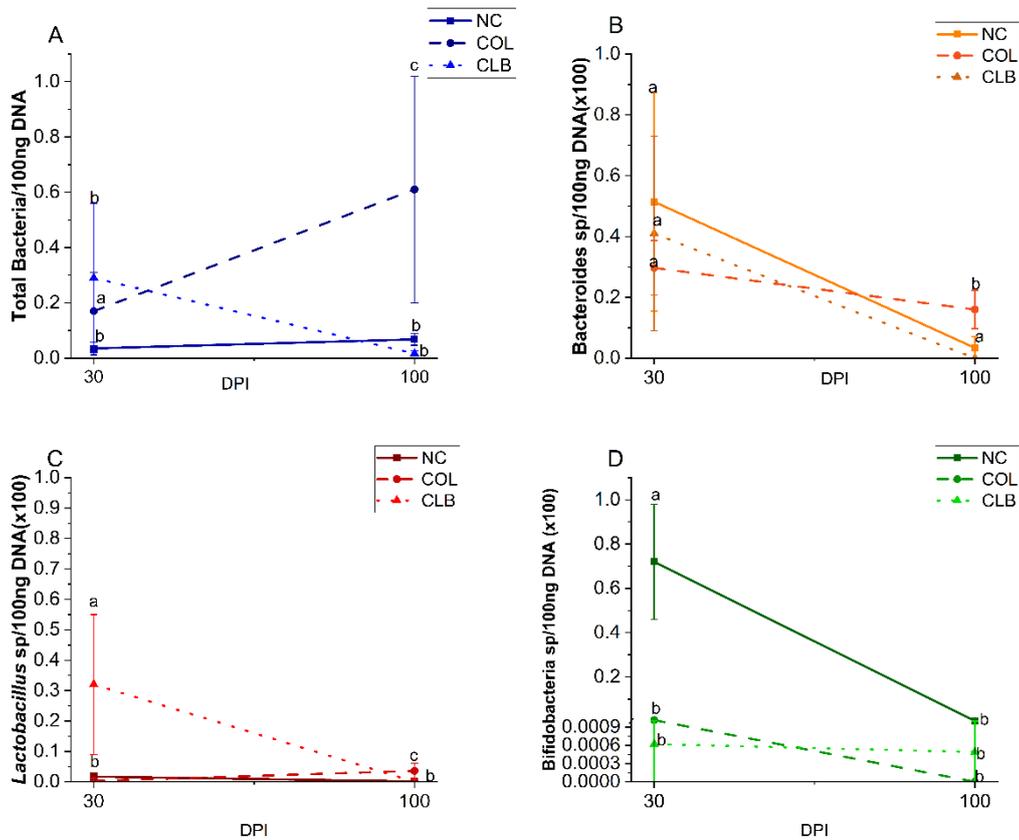


Figura 1. Avaliação de bactérias gênero específico em animais sem modulação da microbiota e com infecção por *Trypanosoma cruzi*. A) bactérias totais; B) *Bacteroides* sp.; C) *Lactobacillus* sp.; e D) *Bifidobacterium* sp. NC: controle negativo (não tratado e não infectado). COL: cepa Colombiana de *T. cruzi*. CLB: cepa CL Brener de *T. cruzi*. Designações de letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas dentro do respectivo grupo ($p \leq 0,05$).

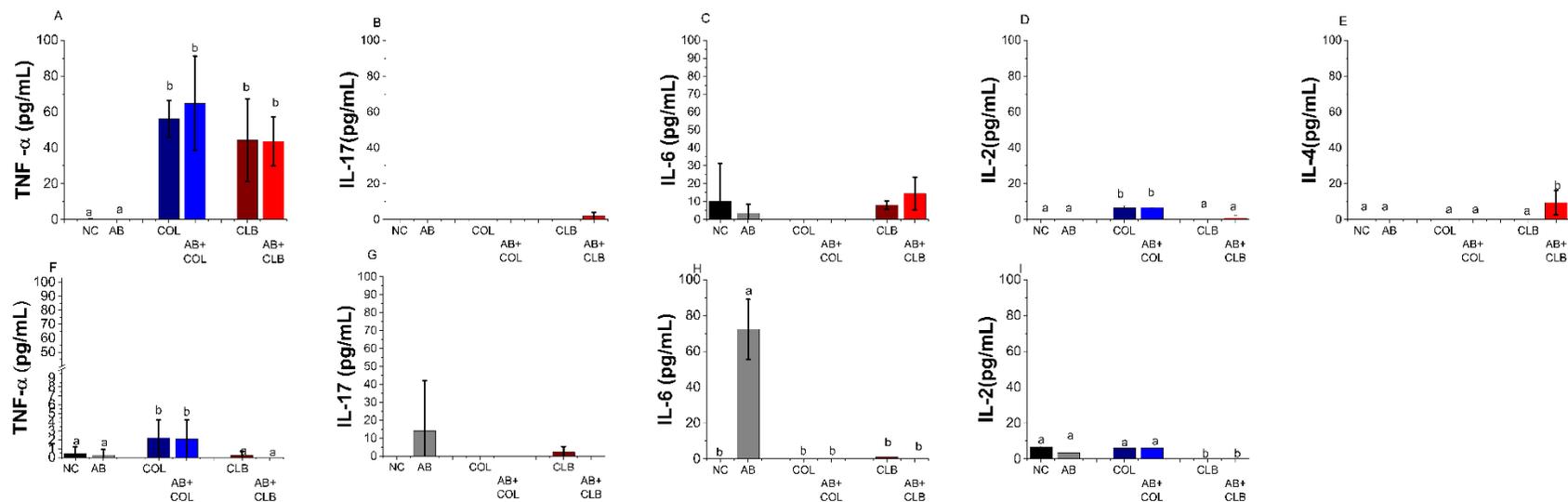


Figura 2. Produção de Citocinas em Camundongos Infectados com *Trypanosoma cruzi* e Tratados com Antimicrobianos. A citometria de fluxo foi utilizada para quantificar A) TNF- α aos 30 dias pós-infecção (dpi), B) IL-17 aos 30 dpi, C) IL-6 aos 30 dpi e D) IL-2 aos 30 dpi, E) IL-4 aos 30dpi, F) TNF- α aos 100 dias pós-infecção (dpi), G) IL-17 aos 10 dpi, H) IL-6 aos 100 dpi e I) IL-2 aos 100 dpi em diferentes grupos experimentais. NC: grupo controle negativo (camundongos não tratados e não infectados); AB: grupo tratado com antibióticos; COL30d: camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 30 dpi; AB+COL30d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 30 dpi; COL100d: camundongos infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 100 dpi; AB+COL100d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* aos 100 dpi; CLB30d: camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 30 dpi; AB+CLB30d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 30 dpi; CLB100d: camundongos infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 100 dpi; AB+CLB100d: camundongos tratados com antibióticos e infectados com a cepa CL Brener de *T. cruzi* aos 100 dpi. Letras alfabéticas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,0005$). Não foi detectada a presença de IL-4 na fase crônica em nenhum animal, não houve diferença estatística detectadas no grupos descritos nas letras B,C,G e I.

