

EVARISTO VILLALBA ALEMÁN

**MANIFESTAÇÕES HEMATOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL EM ANIMAIS INFECTADOS COM *Trypanosoma
cruzi*: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

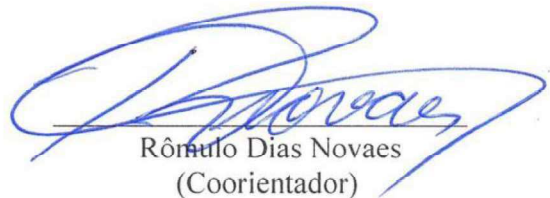
EVARISTO VILLALBA ALEMÁN

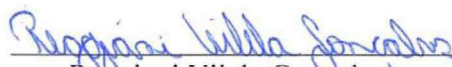
**MANIFESTAÇÕES HEMATOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL EM ANIMAIS INFECTADOS COM *Trypanosoma
cruzi*: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2018


Mariáurea Matias Sarandy Souza


Rômulo Dias Novaes
(Coorientador)


Reggiani Vilela Gonçalves
(Orientadora)

- A meus irmãos não humanos que foram e
ainda continuam sendo escravizados -

AGRADECIMENTOS

À Organização dos Estados Americanos (OEA), ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) e, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo de pós-graduação.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e, ao programa de mestrado em Biologia Animal pela aceitação no programa de mestrado.

À professora ex-diretora do Programa de mestrado em Biologia animal Dra. Gisele Lessa pela sua ajuda e boa disposição durante o processo de matrícula no mestrado.

À professora Reggiani Vilela Gonçalves por me receber em seu laboratório, pela orientação durante o desenho e realização deste projeto, muito grato pelas correções e incentivos.

À professora Mariella Freitas por me receber inicialmente em seu laboratório e pela respectiva coorientação.

A minha mãe na academia Dra. Mariana Muñoz-Romo por seu constante acompanhamento, conselhos e motivação.

A minha família pela incondicionalidade, por sempre me motivar a fazer todas as coisas que me permitam alcançar o sucesso pleno.

A Diego Torres, Estefanny Garcia, Thalia Loyo, Esteban Giraldo, David Justinico, Sergio Barreto, Luciana Altoé, Livia Miranda, e Laís Silva, os amigos que esta experiência me permitiu conhecer, grato por todos os momentos que nós compartilhamos.

A todos os companheiros do laboratório de Patologia Experimental, em especial à Dra. Mariaurea Matias Sarandy minha profunda admiração com sua capacidade para resolver qualquer contrariedade, grato pela paciência, orientação e sua permanente disposição a ajudar.

A meus amigos do Grupo de apoio para a aprendizagem do português para estrangeiros (Falaê), não somente por sua ajuda desinteressada no ensino/melhoria da língua portuguesa, mas também por sua amizade e preocupação para que nós estrangeiros aprendamos e integremo-nos na cultura brasileira.

A todos os professores com os quais tive aulas, obrigado pelo conhecimento transmitido.

A quem direta ou indiretamente contribuiu para que eu alcançasse esta conquista.

CONTEÚDO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVO GERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
REFERENCIAS	4
ARTIGO 1. HAEMATOLOGICAL ALTERATIONS IN NON-HUMAN HOSTS INFECTED WITH <i>Trypanosoma cruzi</i>: A SYSTEMATIC REVIEW	6
ABSTRACT	6
INTRODUCTION	7
MATERIAL AND METHODS	9
Literature research	10
Extraction and data management	10
Bias analysis	11
RESULTS	11
Included studies	11
Qualitative and quantitative analysis	13
Bias analysis	18
DISCUSSION	18
REFERENCES	26
SUPPLEMENTARY FILE S1. COMPLETE SEARCH STRATEGY WITH SEARCH FILTERS AND NUMBER OF STUDIES RECOVERED IN DATABASES PUBMED-MEDLINE AND SCOPUS	35
SUPPLEMENTARY FILE S2. HAEMATOLOGICAL REFERENCE VALUES	37
ARTIGO 2. ALTERAÇÕES MICROESTRUTURAIS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DURANTE INFEÇÕES COM <i>Trypanosoma cruzi</i> EM MAMIFEROS NÃO HUMANOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA	38
RESUMO	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAIS E METODOS	41
Pesquisa da literatura	41
Extração e gerenciamento de dados	41
Critérios de elegibilidade	42

Análise do viés metodológico	42
RESULTADOS.....	42
Estudos incluídos.....	42
Análise dos modelos de infecção	44
Análise de viés	55
DISCUSSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	66
TABELA S1. ESTRATÉGIA DE BUSCA COMPLETA COM FILTROS DE BUSCA E NÚMERO DE ESTUDOS RECUPERADOS NAS BASES DE DADOS PUBMED-MEDLINE E SCOPUS	76

RESUMO

VILLALBA-ALEMÁN, Evaristo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Manifestações hematológicas e morfológicas no sistema nervoso central em animais infectados com *Trypanosoma cruzi*: revisão sistemática.** Orientadora: Reggiani Vilela Gonçalves. Coorientadores: Mariella Bontempo Duca de Freitas e Rômulo Dias Novaes.

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, responsável por promover diversas alterações hematológicas e teciduais que afetam mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo. A espécie possui um ciclo evolutivo digenético. O *T. cruzi* possui uma grande diversidade genética o que lhe dá a habilidade de poder invadir uma ampla variedade de tecidos como o cardíaco, hepático, digestivo, conjuntivo e nervoso causando deficiências fisiológicas generalizadas. Neste estudo nós realizamos mediante revisões sistemáticas a avaliação das principais alterações hematológicas e morfológicas no Sistema Nervoso Central (SNC) que acontecem em mamíferos não humanos durante infecções naturais e experimentais com *T. cruzi*. Foram realizadas duas revisões sistemáticas utilizando bases de dados PubMed e Scopus e, através do Guia Prisma os estudos foram selecionados e submetidos à extração de dados e análise de viés metodológico. A Tabela Arrive, foi utilizada para avaliar o nível de detalhamento científico dos trabalhos. No artigo 1, onde analisamos as alterações hematológicas em animais infectados com *T. cruzi*, dos Trinta e um estudos selecionados, a metade demonstrou uma redução no número de eritrócitos, indicando anemia e, na maioria dos estudos a quantidade total de valores de leucograma aumentou, sugerindo infecção. No artigo 2, analisamos as alterações morfológicas no SNC em indivíduos infectados com *T. cruzi*, os 32 estudos selecionados mostraram que as alterações mais frequentes no SNC são a presença de *T. cruzi* e infiltrado inflamatório mononuclear, principalmente formado por linfócitos. Os principais focos de parasitismo foram as zonas perivasculares no cérebro, cerebelo, e medula espinal. Em geral nossos achados demonstraram que: 1) os parâmetros hematológicos podem direcionar o diagnóstico da doença de Chagas na fase inicial; 2) O encéfalo é o principal alvo de *T. cruzi*, e as alterações inflamatórias no SNC são mais frequentes na fase aguda da infecção; 3) As alterações morfológicas dependem das características da patogenicidade e virulência das cepas de *T. cruzi*; 4) As alterações inflamatórias foram dependentes das cepas indicando que há tropismo diferencial no SNC.

ABSTRACT

VILLALBA-ALEMÁN, Evaristo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Hematological and morphological manifestations in the central nervous system in animals infected with *Trypanosoma cruzi*: systematic review.** Adviser: Reggiani Vilela Gonçalves. Co-advisers: Mariella Bontempo Duca de Freitas and Rômulo Dias Novaes.

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease, responsible for several hematological and tissue changes affecting more than 10 million people worldwide. The species has a digenetic evolutionary cycle. *T. cruzi* is endowed with great genetic diversity which gives it the ability to invade a wide variety of tissues such as the heart, liver, digestive, connective and nervous, causing generalized physiological deficiencies. In this study, we performed systematic reviews of the major hematological and morphological changes in the Central Nervous System (CNS) that occur in non-human mammals during natural and experimental *T. cruzi* infections. Two systematic reviews were carried out through systematic surveys in PubMed and Scopus by publications. Using the Prisma Guide, the studies were selected and submitted to data extraction and methodological bias analysis and, through the Arrive Table, the level of scientific detail of the work was evaluated. In the article 1, wherein analyzing the hematological changes in animals infected with *T. cruzi*, the selected Thirty-one study, half demonstrated a reduction in the number of erythrocytes, indicating anemia and, in most studies the total number of WBC values increased, suggesting infection. Article 2, we analyzed morphological changes in the CNS in subjects infected with *T. cruzi*, the 32 selected studies showed that the more frequent changes in the CNS are the presence of *T. cruzi* and mononuclear inflammatory infiltrate primarily consists of T lymphocytes. The main foci of parasitism were the perivascular zones in the brain, cerebellum, and spinal cord. In general, our findings demonstrated that: 1) hematological parameters can direct the diagnosis of Chagas disease in the initial phase; 2) The brain is the main target of *T. cruzi*, inflammatory changes in the CNS are more frequent in the acute phase of infection; 3) The morphological changes depend of the pathogenicity and virulence of *T. cruzi* strains; 4) Inflammatory changes were dependent on the strains indicating that there is differential tropism in the CNS.

INTRODUÇÃO GERAL

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é uma patologia de origem infecciosa causada pelo hemoparasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), está amplamente distribuída pelo continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, Chile e algumas ilhas das Antilhas (Browne et al., 2017). No entanto, com o influxo maciço de imigrantes latino-americanos para a Ásia, Europa e Oceania na década 1990, foram relatados os primeiros casos da doença de Chagas em países não endêmicos e, nos anos posteriores ocorreu o aumento sucessivos de casos (Schmunis, 2007). A doença de Chagas tem implicações importantes para a saúde pública, e já estima-se que 0,1 % da população esteja infectada em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde mais de 25 milhões de pessoas correm o risco de adquirir a doença e, mais de 10 mil mortes todos os anos (WHO, 2017).

A principal via de transmissão da doença de Chagas é vetorial, mediada por insetos da família Reduviidae (Coura e Viñas, 2010). A transmissão dos parasitos também pode ocorrer por vias não vetoriais como transfusões de sangue (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011), transplantes de órgãos (Márquez et al., 2013), acidentes de laboratório (Dias, 2006), e por ingestão de alimentos contaminados (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012; Domingues et al., 2015).

O *T. cruzi* é um protozoário heteroxênico descrito em 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas. Este parasita pode ser encontrado em três principais formas celulares: em sua forma epimastigota o parasita se replica dentro do estômago do inseto vetor, e posteriormente no intestino, se transforma em tripomastigota. Esta última é a forma que infecta o animal hospedeiro e que depois se move pela corrente sanguínea e infecta células em diferentes tecidos. Após a infecção celular, os tripomastigotas mudam para a forma amastigota e começam a se multiplicar (Eliás et al., 2001; Tyler e Engman, 2001). Eventualmente, alguns parasitas voltam a sua forma tripomastigota para mover-se pela corrente sanguínea e infectar novos órgãos; é neste momento que um inseto hematófago pode alimentar-se de sangue contaminado e repetir o processo infeccioso (Chagas, 1909; Tyler e Engman, 2001; Minning et al., 2009).

A doença de Chagas ocorre em três fases. A fase inicial aguda dura de 4 a 8 semanas, geralmente é assintomática ou pode se manifestar com um quadro febril,

taquicardia, linfadenopatia, esplenomegalia leve, edema e linfocitose (Prata, 2001; Rassi et al., 2010). Os sintomas aparecem de 1 a 2 semana depois da infecção. O parasita pode ser visto com relativa facilidade pelo exame direto do sangue. Sem tratamento, cerca de 5-10% dos pacientes sintomáticos morrem durante esta fase devido a encefalomielite ou insuficiência cardíaca grave (Pinto et al., 2009; Rassi et al., 2010). Após 2 a 4 meses, as manifestações clínicas agudas desaparecem e os parasitas raramente são detectados no sangue periférico. A doença entra na fase crônica, geralmente iniciando com um longo período de latência clínica denominada forma indeterminada, que pode durar de 10 a 30 anos ou ao longo da vida (Andrade et al., 1997; Prata, 2001). Após esse período 30 a 40% dos pacientes desenvolvem a fase crônica sintomática da doença que se manifesta com danos de determinados órgãos, como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso, caracterizando outras formas clínicas (Prata, 2001; Coura e Borges-Pereira, 2011).

O *T. cruzi* é um parasita com uma alta diversidade genética e fenotípica, com mais de 6000 cepas classificados em 7 unidades discretas de tipagens (DTU's) ou genótipos (Brenière et al., 2016). As diversidades genéticas dos parasitas geralmente têm um impacto profundo em suas características epidemiológicas, biológicas e médicas, o que pode ser determinante na complexidade da doença que ocasionam (Tibayrenc et al., 2010). Entre estas características determinantes pode estar a capacidade de acometer uma ampla variedade de tecidos como cardíaco, digestivo, nervoso periférico e nervoso central e, células imunológicas como os leucócitos, assim como as subseqüentes alterações fisiológicas que podem acontecer.

OBJETIVO GERAL

Realizar um levantamento, através de revisão sistemática, das principais alterações hematológicas e morfológicas no sistema nervoso central que acontecem em mamíferos não humanos durante infecções naturais e experimentais com *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar artigos científicos publicados em duas bases de dados (Pubmed e Scopus) que relatam sobre principais alterações hematológicas em hospedeiros não humanos infectados natural e experimentalmente com *T. cruzi*.

Analisar artigos científicos publicados em duas bases de dados (Pubmed e Scopus) que relatam sobre e alterações morfológicas no Sistema Nervoso Central (SNC) durante infecções naturais e experimentais com *T. cruzi* em mamíferos não humanos.

Através de ferramentas específicas de revisão sistemática, avaliar qualitativa e quantitativamente os trabalhos selecionados.

Realizar uma análise do viés dos trabalhos selecionados, principalmente no que diz respeito a metodologias utilizadas bem como a escrita do trabalho através de ferramentas específicas da revisão sistemática.

Comparar os dados hematológicos extraídos para cada grupo de mamíferos com os valores normais estabelecidos para cada espécie estudada.

Comparar as diferentes alterações morfológicas no SNC para todos os grupos de mamíferos não humanos infectados com *T. cruzi*.

Comparar o tropismo no SNC das diferentes cepas de *T. cruzi*.

REFERENCIAS

- Andrade, Z. A., Andrade, S. G., Sadigursky, M., Wenthold Jr, R. J., Hilbert, S. L., and Ferrans, V. J. (1997). The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 57(3), 328-336.
- Bonaldo, M.C., Souto-Padron, T., de Souza, W., Goldenberg, S. (1988). Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Journal of Cell Biology*, 106, 1349-58.
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004792.
- Browne, A. J., Guerra, C. A., Alves, R. V., Da Costa, V. M., Wilson, A. L., Pigott, D. M., Hay, S. I., Lindsay, S. W., Golding, N., and Moyes, C. L. (2017). The contemporary distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in humans, alternative hosts and vectors. *Scientific data*, 4, 170050.
- Chagas, C. (1909). 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218.
- Coura, J. R., and Borges-Pereira, J. (2011). Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 641-645.
- Coura, J. R., and Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465(n7301_suppl), S6-S7.
- Dias, J. C. (2006) Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(4), 370–375.
- Domingues, C. S., Haroim, D. J., Souza, C. S. F., Cardoso, F. O., Mendes, V. G., Previtali-Silva, H., Abreu-Silva, A. L., Pelajo-Machado, da Costa, M., S. C. G., and Calabrese, K. S. (2015). Oral outbreak of Chagas disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental evaluation of a patient's strain. *PLoS ONE*, 10(10), 1–18.
- Elias, M. C. Q., Marques-Porto, R., Freymüller, E., and Schenkman, S. (2001) Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Molecular and biochemical parasitology*, 112, 79-90.
- Kleffmann, T., Schmidt, J., Schaub, G.A., (1998). Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45, 548-55.

Márquez, E., Crespo, M., Mir, M., Pérez-Sáez, M. J., Quintana, S., Barbosa, F., and Pascual, J. (2013). Chagas' disease and kidney donation. *Nefrologia*, 33(1), 128-33.

Minning, T. A., Weatherly, D. B., Atwood, J., Orlando, R., and Tarleton, R. L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC genomics*, 10, 1-15.

Lemos, M., Fermino, B. R., Simas-Rodrigues, C., Hoffmann, L., Silva, R., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., and Souto-Pradón, T. (2015). Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-17.

Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, 1(2), 92-100.

Pinto, A. Y. D. N., Ferreira Jr, A. G., Valente, V. D. C., Harada, G. S., and Valente, S. A. D. S. (2009). Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Revista panamericana de salud pública*, 25, 77-83.

Rassi Jr, A., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402.

Shikanai-Yasuda, M. A., and Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845–52.

Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 75–85.

Tibayrenc M., Barnabé C., and Telleria J. (2010). Reticulate Evolution in: Medical and Epidemiological Implications. In: J. Telleria., and M. Tibayrenc. (eds). American trypanosomiasis: Chagas disease One hundred years of research. Burlington (pp. 475–88). Cambridge, United States: Elsevier.

Tyler, K. M., and Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472-481.

WHO. World Health Organization. (2017, June 6). Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology. Retrieved from <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>.

ARTIGO 1. HAEMATOLOGICAL ALTERATIONS IN NON-HUMAN HOSTS INFECTED WITH *Trypanosoma cruzi*: A SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT

American trypanosomiasis is a neglected tropical disease whose spectrum has not been quite understood, including the impact of *Trypanosoma cruzi* infection on the haematological parameters of different vertebrate hosts. Thus, this study was designed to compare the pattern of haematological changes induced by *T. cruzi* infection in order to identify possible species-specific differences among taxons. We also aimed at evaluating the use of this parameter as a tool for diagnosis during the acute phase, when symptoms are usually masked. For this purposes, we performed a systematic search on PubMed and Scopus databases to retrieve original studies published until August, 2016. Thirty one studies were selected using Prisma strategy, which were then submitted to data extraction and methodological bias analysis. Half of the studies showed that the number of erythrogram decreased in infected animals, indicating anaemia. In 68.2% of the studies, the total amount of leukogram values increased, suggesting infection. The main methodological limitations were insufficient information for *T. cruzi* strains identification, inoculation routes and parasitological characterization. Most of the mammalian species analysed, them showed the same pattern of haematological changes following *T. cruzi* infection, indicating that haematological parameters might direct the diagnosis of Chagas disease in the initial phase.

Keywords: Haematology; Chaga's disease; *Trypanosoma cruzi*; erythrocytes; leucocytes

INTRODUCTION

Human American and African trypanosomiases are major tropical diseases, infecting millions of people every year, and yet are widely neglected worldwide (Kennedy, 2013; Bern, 2015). The hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* causes the American trypanosomiasis or Chagas disease, which is transmitted primarily through contact with feces of hematophagous triatomine insects (Chagas, 1909; Santana et al. 2012). The highest disease incidence is in Latin America (Pan American Health Organization, 2006; Pan American Health Organization, 2014). Transmission of parasites also occurs through non-vector pathways such as blood transfusion (Moraes-Souza and Ferreira-Silva, 2011), organ transplantation (Márquez et al. 2013), laboratory accidents (Dias, 2006), and by ingestion of contaminated food (Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012; Domingues et al. 2015).

During its life cycle, *T. cruzi* is usually found in three different infective forms: epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes (Chagas, 1909; Tyler and Engman, 2001). As an epimastigote, the parasite replicates inside the insect vector stomach, and later in the intestine, thus becoming a trypomastigote. The latter infects the host animal and moves through the bloodstream to infect different tissues. Trypomastigotes then change into amastigotes and begin to multiply (Elias et al. 2001; Tyler and Engman, 2001). Eventually, some parasites return to their trypomastigote form to move through the bloodstream and infect new organs, which is when a hematophagous insect can feed on contaminated blood and repeat the infectious process (Chagas, 1909; Tyler and Engman, 2001; Minning et al. 2009).

The signs and symptoms caused by Chagas disease have two successive stages: acute and chronic (Rassi et al. 2010). The acute phase usually last from 2-4 weeks. The main symptoms are redness, edema and fever (Coura and Viñas, 2010; Rassi et al. 2010). After this phase, the parasite number in the bloodstream usually decreases and the symptoms disappear, causing a latency state that lasts indefinitely (Prata, 2001). In some cases, the disease develops, originatins the chronic phase, characterized by tissue damage in parasite multiplication. Heart, brain, esophagus and colon are the most affected tissues showing necrosis and physiological impairments (Coura and Dias, 2009; Rassi et al. 2010). Chagas disease is the leading cause of non-ischemic cardiomyopathy worldwide (Feldman and McNamara, 2000) due to cardiac chambers

enlargement, congestive heart failure, dysrhythmias and thromboembolism (Marin-Neto et al. 2007; Bern, 2015).

In addition to humans, *T. cruzi* parasitosis has been identified in a wide variety of domestic and wild mammals, such as bats, anteaters, marsupials, carnivorous, rodents, rabbits, primates, pigs and caprines (Barretto, 1964; Deane, 1964; Añez et al. 2009; Herrera, 2010). Dogs are their main domestic reservoir (Montenegro et al. 2002) whereas bats were recently shown to be an important wild reservoir, with a hypothesis that states that *T. cruzi* has a long history of co-evolution shared with bats (Stevens et al. 1999; Hamilton et al. 2012). Other groups of vertebrates are refractory to *T. cruzi* due to antigenic incompatibility, lack of recognition and/or cell signaling or inadequate levels of systemic temperature (Herrera, 2010). Experimental studies show that infected hosts with different *T. cruzi* strains show different parasite levels and immune responses according to parasite-host evolutionary interactions and to a wide variety of parasite genotypes (Roellig et al. 2010; Duz et al. 2014).

An effective way to evaluate the health of an individual infected with *T. cruzi* is by using haematological parameters analysis (Beldomenico et al. 2008; Stockham and Scott, 2013) through morphological and quantitative analysis. In addition, haemoglobin concentration can diagnose anemia produced by blood loss, hematopoiesis suppression or bone marrow pathologies (Van Hove et al. 2000). White blood cells or leukocytes are the performers of the immune response, thus intervening in the defence of the body against foreign substances or infectious agents (Teske, 2011). Alterations in the number of leukocytes usually reflect virus, bacteria or protozoa infections, and allergic reactions to medications, bone marrow damage, cancer or autoimmune disorders (Stockham and Scott, 2013). Among them, neutrophils are the main immune cells that fight the pathogens at infection site, where they recognize and eliminate the invading microorganisms through cytotoxic mechanisms (Mayadas et al. 2014). Lymphocytes are the effectors of innate and acquired immunity, and they proliferate in response to antigenic stimuli. Therefore, circulating levels of lymphocytes may be used as indicators of the immunological response (Beldomenico et al. 2008; Dotiwala et al. 2016). Monocytes eliminate invading microorganisms or cellular debris by phagocytosis. The number of peripheral monocytes is usually increased during subacute and chronic inflammatory responses caused by bacterial and protozoa infections (Weiss and Souza, 2011). Eosinophils are

multifunctional effector cells with proinflammatory and destructive abilities implicated in tissue homeostasis, modulation of the adaptive immune response and innate immunity to certain microorganisms (Kita, 2011), whereas basophils release chemical mediators that alter the vascular structure and recruit other inflammatory cells to the site of infection (Obata et al. 2007). Therefore, total leukocyte counting is important to the immunological status as their numerical and morphological variation may reflect nutritional deficiencies, functional bone marrow changes and works as an important marker for parasitic infections (Stockham and Scott, 2013).

Studies with experimental animal models provide the empirical basis for determining the major haematological parameters usually analysed in parasitic infections (Cardoso and Brener, 1980; Pung et al. 1988). However, as preclinical studies usually involve small, heterogeneous experiments, their findings sometimes cannot contribute directly for improvements on human health (Hooijmans and Ritskes-Hoitinga, 2013; Van Lwijk et al. 2014). A systematic review is intended to show preclinical evidence in an objective manner, unlike widely used narrative reviews (Uman, 2011). To our knowledge, this is the first study to provide new, reliable evidence on the major haematological alterations during the development of *T. cruzi* infection in different species. These findings may increase the knowledge of Chagas disease signs and have a potential value to understand the relevance of the host-parasite interactions, in order to identify a pattern of haematological alteration and possible species-specific differences (Olifiers et al. 2015). We also aimed at investigating the relevance of these alterations on the infection diagnosis during the initial asymptomatic phase, as well as determining the main *T. cruzi* strains, type of infections, inoculum and inoculation routes used in studies on American trypanosomiasis, and the methodological bias found in the selected studies.

MATERIAL AND METHODS

The systematic review was adhered to the PRISMA guidelines (Kilkenny et al. 2010) (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis), including search strategy, selection criteria, extraction and data analysis.

Literature research

We completed a comprehensive bibliographic search using the electronic database PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) and Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>) on August 31, 2016 at 8:00 p.m. The keywords for filters for three criteria were Chagas disease, haematology and animal model (Supplementary file S1). The hierarchical distribution of the MESH terms was the strategy used to develop the filter on the Pubmed platform. We applied a standardized filter in the Scopus platform for animal studies and the same Pubmed search strategy was adapted and used. We only included experimental studies published in English, Portuguese and Spanish. Views, comments, notes and unpublished studies were not included.

We selected only studies that met all of the eligibility criteria listed below:

1. Studies on mammals experimentally or naturally infected with *Trypanosoma cruzi*;
2. Studies with at least one control group infected with *T. cruzi* and not receiving any type of treatment (e.g., drug treatment);
3. Experimental subjects with no functional alterations due to lesions or other manipulations, and non-genetically modified;
4. Studies in which at least two of the major haematological parameters of erythrocytes (total erythrocyte counting, hematocrit and hemoglobin dosage) and at least two leukocytes (total and differential leukocyte countings) were measured.

Extraction and data management

Selection by abstract: two independent reviewers (E.V. and D.L.J.C.) selected eligible studies based on title and abstract analysis. In the case of disagreements, another group of reviewers (R.V.G., M.B.F., M.M.S. and R.D.N.) decided whether the study fulfilled the inclusion and exclusion criteria.

To discard the subjectivity in the data collection and selection process, the information was independently extracted by four reviewers (R.V.G., M.B.F., M.M.S. and R.D.N.) and analysed separately. Data from each study were extracted and tabulated using standardized information such as publication characteristics (title,

author, year and country); experimental model (animal species, sex, age, weight, number of animals and experimental groups); infection characteristics (*Trypanosoma cruzi* strain, inoculation route, inoculum quantity, time of evolution of parasitemia) and haematological parameters (hemoglobin, hematocrit, total erythrocyte counting, leukocytes, lymphocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils and basophils). We asked the authors, by email, to provide the papers in cases that they were not easily available. Data were subsequently compared and conflicting information were identified and corrected after discussion among the reviewers.

Bias analysis

The quality of the articles was analysed according to the criteria described in the research "Animal Research Reporting of in Vivo Experiments" (ARRIVE). These criteria are based on brief descriptions of the essential characteristics of all studies using animal models such as theoretical and methodological basis, research objective, improvement of analytical methods, statistical design, sample calculations and result measures (Kilkenny et al. 2010). Considering that this systematic review aimed at evaluating important aspects of the publications referenced, we developed a table summarizing all investigated aspects as well as their relevance, in addition to describing positive and negative aspects of the retrieved studies.

RESULTS

Included studies

The PRISMA diagram illustrates the selection process of the studies (Fig. 1). The initial research resulted in 1053 studies; 313 were duplicates. After reading the title and abstract, we excluded 373 studies with subjects not related to the chosen topic. From these, 72 studies were related to *Trypanosoma* vectors, 59 were excluded for not addressing haematological aspects, 18 were not in English, Portuguese or Spanish and three consisted of non-original (revision) research articles. After this initial selection, the remaining 367 articles were then completely read and 341 articles were excluded for using other *Trypanosoma* species (312), other types of pathogens (14) and without haematological data (15). Therefore, 26 studies were included in this systematic review. The bibliographical references of the 26 selected articles were analysed and

five studies were added in accordance with the inclusion criteria, which brought us to a total of 31 studies (Fig.1).

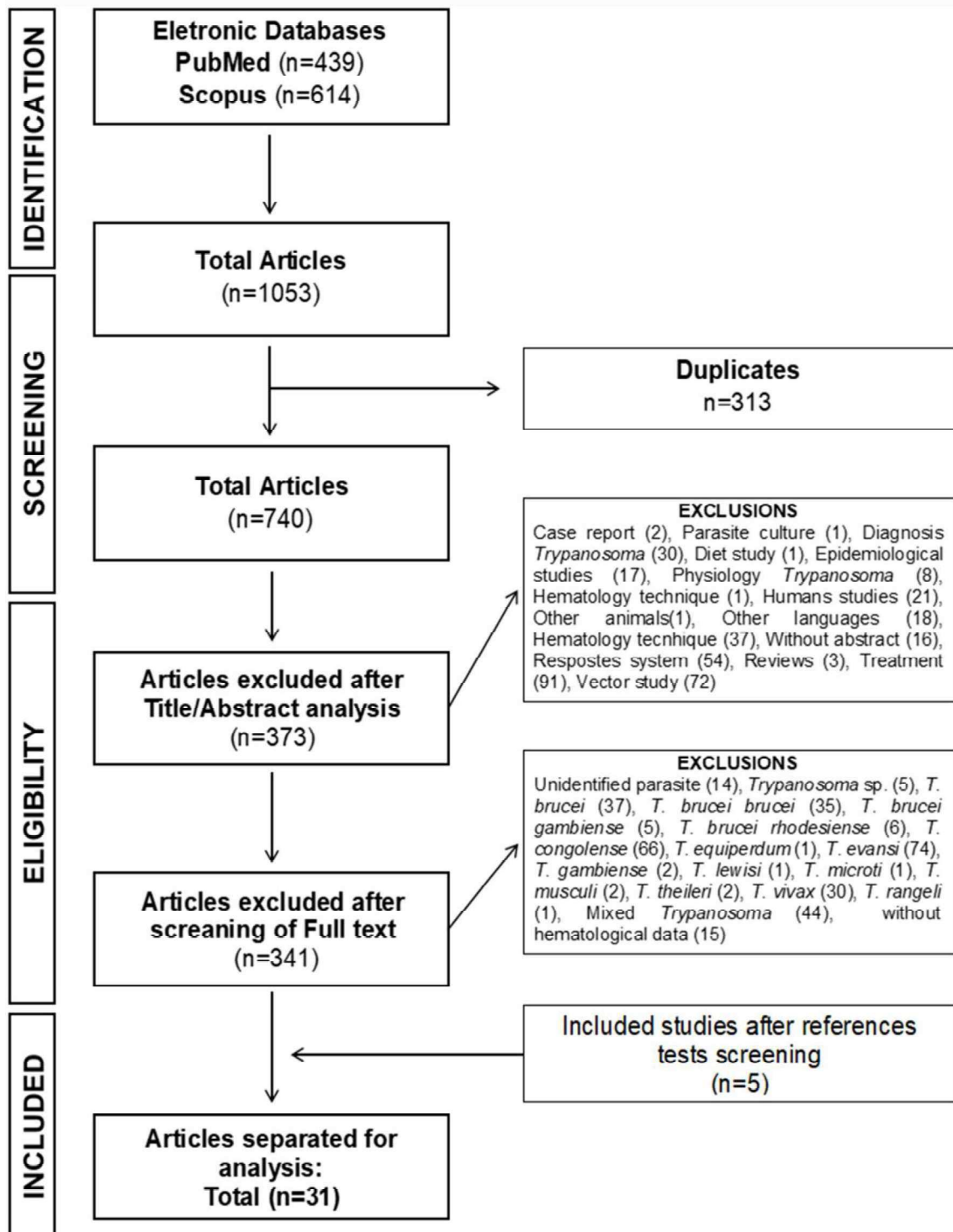


Fig. 1. PRISMA diagram. Different phases of selection of studies for conducting qualitative and quantitative analyses. Flow diagram of the systematic review literature search results. Based on “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement”. www.prisma-statement.org From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009).

Qualitative and quantitative analysis

The selected studies were performed in four different countries, most of them in Brazil (n=25) followed by the United States (n=3). The most used animals were mice (48%), followed by rats (29%). The most used *T. cruzi* strains were Y (54%) followed by CL (10%), although 12.9% of the studies do not specify this in their articles. Tests to confirm infection (parasitological characterization) were not described in 6.5% of the studies, the route of inoculation was not provided in 19.35% and the inoculum concentration is absent in 12.9% of them (Table 1). The results for the different haematological parameters varied according to the animal species. For mice, there was a decrease in erythrocyte values [4,6,7,8,9], hematocrit [6,7,9] and hemoglobin [6,7,8,9,10,11] and a significant increase in leukocyte levels [2,7,8,9,12,13,14,15,16] mainly in the lymphocyte proportion [2,13,14,16,17], neutrophils [2,13,15], monocytes [2,13], and eosinophils [2,13,15] when compared to the standard values for these species (Supplementary file S2). In infected rats, the hematocrit [18, 9] and hemoglobin [19] values remained within the normal range the standard values for these species (Supplementary file S2). In infected rats, the hematocrit [18, 9] and hemoglobin [19] values remained within the normal range described for these species. However, the number of leukocytes [19,20,21,22] had a significant increase when compared to the reference values, with special emphasis on monocytes [19,20,23,24] (Table 1 and Supplementary file S2). When dogs were used as model, erythrocyte, hematocrit and hemoglobin levels remained within normal reference values after *T. cruzi* infection [3,25,26]. Similarly, leukocytes remained in the normal range for dogs, with increases only in the proportions of lymphocytes and eosinophils [3,26]. In our selection, we found a study with monkeys [27] and two with coatis [5,28]. The study with monkeys showed a significant increase in the number of leukocytes, especially lymphocytes, with values above the reference reported for primates (Table 1 and Supplementary file S2). In coatis, the authors reported an increase in the amount of leukocytes [5,28] with slightly elevated values for neutrophils [5] and lower values for monocytes [5] (Table 1 and Supplementary file S2). In general, 50% of the studies measuring haematological parameters associated with erythrocytes showed erythropenia (Fig. 2a and 2b), and 68.2% of the studies that estimated leukocyte values showed leucocytosis. In 25.8% of the studies, the parasitemia level was not shown. Fig. 2c and 2d schematically shows all the results of haematological parameters

ils); ♂: Male; ♀: Female;?: Uninformed; N:

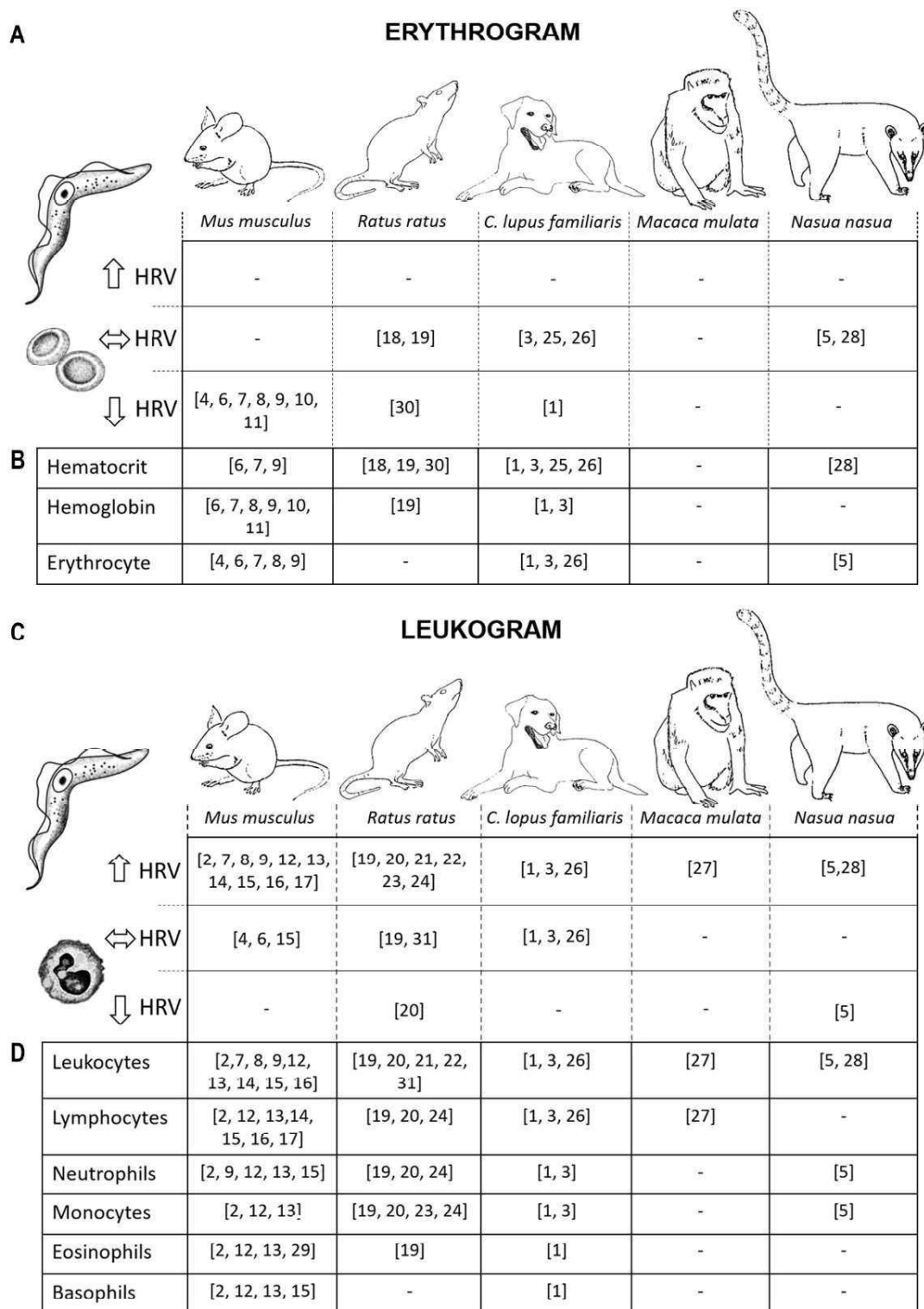


Fig. 2. Schematic representation of studies in different species showing fluctuations in the haematological reference values (HRV), according to total erythrogram (a) erythrogram specific parameters (b); total leukogram (c) leukogram specific parameters (d) in non-human mammals infected with *T. cruzi*.

analysed in the different non-human mammals infected with *T. cruzi* mentioned above.

Bias analysis

All studies showed a title coherent with the content and abstracts containing literature review, objectives, methods, main results and final remarks. Ethics committee approval was reported in 48.3%. Experimental design is shown in 87% (n=27), however, none of them reported measures to minimize bias. Regarding the experimental animal, all studies reported the species name. Sex, weight and age were reported in 93.5% (n=29), 45.1% (n=14) and 70.9% (n=22) of the studies, respectively. The detailed description of the statistical analysis was reported in 87.0% (n=27). Only 15 studies reported modifications to the experimental protocol by adverse events. No study reported on the decision about the number of animals used (Table 2).

DISCUSSION

In this study, we conducted a systematic review to identify the main haematological parameters analysed in non-human mammals infected with *T. cruzi* and evaluated the possible relevance of these analyses to study the development of Chagas disease. Despite the great heterogeneity of the studies, in general, the presence of *T. cruzi* in the organisms promoted no changes or a decrease in blood erythrocytes and an increase in leukocytes, which may represent anemia and severe infection. Studies in humans have shown that some patients diagnosed in the acute phase developed the indeterminate chronic form of Chagas disease, which is asymptomatic and does not require treatment, as it may remain stable for 20 or more years (Maya et al. 2010; Rassi et al. 2010). An early diagnose, however, which might be facilitated by alterations in the haematological patterns, may prevent the further development of the disease. In contrast, a delayed diagnose, confirmed only in the chronic phase, may cause irreversible lesions in several organs and systems (Rassi et al. 2010; Martins-Melo et al. 2012).

The detection of parasites in the peripheral blood, as well as serological tests, direct microscopy, blood culture, Polymerase Chain Reaction (PCR) and immunological (Gascón et al. 2008) are tools with definitive evidence of *T. cruzi* infection.





In addition, these analyses may indicate the parasite strain infectivity, the tissue parasitism degree and the immune response efficiency against the parasite (de Castro et al. 2000). Our study showed that 6.5% of the studies neglected this information.

For many years, different studies have attempted to associate the haematological parameters to the parasitological profile and the histopathological changes of Chagas disease (Guedes et al. 2012; Ferraz et al. 2014). Although haematological data do not show a strong association with parasitemia, parasite load or organ damage, it may provide additional information to assess the impact of Chagas disease on the host organism as a whole (Moreno et al. 2007; Lopes et al. 2015; Santana et al. 2015). Haematological analysis is simple, affordable test and may play a role as a complementary tool to evaluate the Chagas disease evolution and the effectiveness of the etiological treatment of *T. cruzi* infection (Kaushansky and Shattil, 2007; Stockham and Scott, 2013). On the other hand, the relevance and applicability of these parameters to characterize Chagas disease require a more comprehensive analysis of the spectrum of haematological changes induced by the infection, (Malvezi et al. 2004; Guedes et al. 2012), especially considering the variability of haematological characteristics in different host species.

Carlos Chagas, in his pioneering study, was the first to describe the development of anemia in patients diagnosed with trypanosomiasis (Chagas, 1909). *T. cruzi* infection is also associated with severe haematological abnormalities that may contribute to mortality (Martins-Melo et al. 2012). Studies in inoculated rats with different *T. cruzi* strains showed anemia, thrombocytopenia (Cardoso and Brener, 1980, Marcondes et al. 2000) and neutropenia, followed by neutrophilia and eosinopenia within the 2nd and the 5th weeks of infection (Repka et al. 1985). However, the mechanisms underlying these haematological changes are not fully understood (Marcondes et al. 2000, Malvezi et al. 2004), but bone marrow suppression in hematopoiesis may be involved (Marcondes et al. 2000).

In this review, 50% of the studies in different species reported anemia. Changes in hemoglobin and percentage of total erythrocytes are common in diseases caused by bacteria or protozoa (Stockham and Scott, 2013). Similar results from studies not included here were found in murine (Repka et al. 1985; Thomsen et al. 1986), coatis (Silva et al. 1999; Herrera et al. 2001; Herrera et al. 2004) and dogs (Klein and Camacho, 1997; Rashid et al. 2008) infected with *Trypanosoma*, which also showed a

decrease in hematocrit and high anemia incidence. Anemia in bacterial, protozoan and viral infections may occur due to erythrocyte reduced lifespan or destruction by autoantibodies, decreased bone marrow activity and decreased erythrocyte precursors due to *T. cruzi* cytotoxicity (Marcondes et al. 2000; Kook et al. 2001), or by cytokines secreted by leucocytes or macrophages as a consequence of the inflammatory response of the organism (Marcondes et al. 2000; Tatakihara et al. 2015). Studies in rodents reveal that *T. cruzi* infection can induce the secretion of a hemolysin capable of inducing the destruction of erythrocytes in many species of animals, including humans (Andrews e Whitlow, 1989; Mendonça, et al. 2017).

Another haematological alteration shared by most studies we analysed was the decreased number of leukocytes. During parasite infection, molecules produced by the host immune system and molecules produced by *T. cruzi* induce the hematopoietic system to increase the production of defense cells (Tribulatti et al. 2005), thus demonstrating a positive correlation between parasitemia level and leukocyte counting. However, this leukocytosis may vary according to the animal models genetics and the parasite strain used (Domingues et al. 2015).

Regarding the distribution of different types of leukocytes in all evaluated animal models, a more significant increase occurred in the number of lymphocytes and monocytes, although in dogs only eosinophils were increased. Similar studies have shown the characterization of several isolates of *T. cruzi* and all of them showed the same tendency in the proportion of altered leukocytes (Bonilla et al. 1973; Rivera et al. 2000). These changes might be associated with different variations in haematological profiles during parasitemia, which might be a species-specific characteristic and may also vary with age and health status. Although the role of lymphocytes in parasite control is still not well known, a possible participation involves CD4 T lymphocytes in the production of cytokines such as interferon- γ (IFN- γ), which positively regulates the release of nitric oxide by macrophages, thus controlling the parasites replication through the synthesis of immunoglobulins isotopes that fight against the immunogen (Brener and Gazzinelli, 1997; Zhu et al. 2009; Green et al. 2013). In fact, IFN- γ directs the differentiation of CD4 T lymphocytes into Th1 lymphocytes, active to dendritic cells, macrophages, natural killer lymphocytes, interleukin-12, amplifying the destruction of microorganisms (Schoenborn and Wilson, 2007; Artis and Spits, 2015).

These cells of the monocytic lineage are directly involved in the parasite control during the first stages of acute infection with *T. cruzi* (Fabrino et al. 2004). In addition, a high migration of monocyte-derived macrophages has been observed in infected tissues during the acute phase and is believed to act as an inflammatory mediator (Melo and Machado, 2001; Melo et al. 2003a). These inflammatory macrophages, triggered by the chagasic infection, show a consistent increase in their organelle system and nuclear components, which usually distinguish them from other resident macrophages (Melo and Machado, 2001; Melo et al. 2003b). Another significant feature is the increased formation of cytoplasmic lipid bodies, intracellular domains involved in the inflammatory mediator production (Tribulatti et al. 2005).

Regarding the role of eosinophils during Chagas disease, there is evidence indicating an antiparasitic effect (Guedes et al. 2009). In the presence of antibodies and components of the complement system, eosinophils may release lipid mediators, such as leukotriene C4 (Shaw et al. 1984; Shi, 2004), which is an activating factor of platelets, liposins and granular cationic proteins. All these mediators can cause dysfunction and destruction of other cells membranes, facilitating its task as parasite eliminators (Shi, 2004; Acharya and Ackerman, 2014).

Taken together, the results gathered in this systematic review reveal a high level of scientific evidence and a great contribution on the global estimate of the importance of haematological analyses to Chagas disease. In this context, both blood parasitemia and hematocrit analysis were found to be important for the diagnose and the level of infection evaluation. In addition, the analysis of haematological parameters also seems important to evaluate the physiological condition of the infected individual. The selection process was based on widely accepted and recommended practices for systematic reviews. Publication bias is a relevant issue highlighted in our work. Therefore, we used the ARRIVE Guide, which allowed us testing the degree of reliability of the studies individually and later collectively. After this analysis, we realized that aspects related to the experiments organization were neglected, including lack of randomization and double-blind studies. These points raise additional concerns that may compromise the results in some studies.

These factors highlight the need to enhance experimental designs and current guidelines in reporting animal experiments to ensure an adequate level of scientific evidence. Finally, the methodologies and evaluation parameters are extremely

heterogeneous with different measures being reported in all the studies. Interestingly, most studies did not report whether their results could be used to other species and systems, showing a lack of relevance to human biology. Considering the experimental model used in most studies and the social relevance of *T. cruzi* infection for the world population, the transfer of the results and the applicability to the disease treatment in humans is essential to address the neglecting aspects over the last decades.

As a conclusion, this systematic review shows that there is an association between haematological parameters and *T. cruzi* infection. Regarding the different mammalian species analysed, we conclude that most of them showed the same pattern of haematological changes following *T. cruzi* infection: decreased or normal erythrogram and increased leukogram values, except for the laboratory mouse *Mus musculus*, which showed a consistent decrease in erythrogram parameters in 100% of analysed studies. This species is an important research tool for modelling human disease progression and development (Vandamme, 2014), therefore changes in their haematological parameters might be valuable for future clinical research. In addition, we observed that haematological parameters might direct the diagnosis of Chagas disease in the initial phase, which might improve the quality of life. Regarding the lack of important methodological information, compromising the replicability of the studies, we hope that our critical analysis help future studies to reduce methodological bias, thus improving data reliability.

Acknowledgments. We would like to thank the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) and “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais” (FAPEMIG).

Conflict of interest. The author declares no conflicts of interest.

REFERENCES

- Acharya KR and Ackerman SJ (2014) Eosinophil granule proteins: form and function. *Journal of Biological Chemistry* 289, 17406-17415.
- Alves FM, Olifiers N, Bianchi RDC, Duarte AC, Cotias PMT, D'Andrea PS and Jansen AM (2011) Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 835-841.
- Andrade SG, Mesquita IMO, Jambeiro JF, Santos IFM and Portella RS (2003) Treatment with benznidazole in association with immunosuppressive drugs in mice

chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: investigation into the possible development of neoplasias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36, 441-447.

Andrews NW and Whitlow MB (1989) Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Molecular and biochemical parasitology* 33, 249-256.

Añez N, Crisante G and Soriano PJ (2009) *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in wild bats. *Acta tropica* 109, 78-80.

Arantes JM, Pedrosa ML, Martins HR, Veloso VM, de Lana M, Bahia MT, Tafuri WL and Carneiro CM (2007) *Trypanosoma cruzi*: Treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. *Experimental Parasitology* 117, 43-50.

Artis D and Spits H (2015) The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293-301.

Barretto MP (1964) Reservatórios de *Trypanosoma cruzi* nas Américas. *Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais* 16, 527-552.

Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M and Begon M (2008) The dynamics of health in wild field vole populations: a haematological perspective. *Journal of Animal Ecology* 77, 984-997.

Bern C (2015) Chagas' disease. *New England Journal of Medicine* 373, 456-466.

Berra HH, Piaggio E, Revelli SS and Luquita A (2005) Blood viscosity changes in experimentally *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 32, 175-82.

Bonecine-Almeida MDG, Galvão-Castro B, Pessoa MHR, Piramez C and Laranja F (1990) Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. I. Clinical parasitological, hematological and anatomo-pathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85, 163-171.

Brener ZIGMAN and Gazzinelli RT (1997) Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International archives of allergy and immunology* 114, 103-110.

Calabrese KDS, Paradela ASRDC, do Valle TZ, Tedesco RC, Silva S, Mortara RA and da Costa SG (1999) Study of acute Chagasic mice under immunosuppressive therapy by cyclosporin A: modulation and confocal analysis of inflammatory reaction. *Immunopharmacology* 47, 1-11.

Calabrese KS, Lagrange PH and Da Costa, S. C. G (1996) Chagas' disease: Enhancement of systemic inflammatory reaction in cyclophosphamide treated mice. *International Journal of Immunopharmacology* 18, 505-514.

Camargo IJB, Araujo PMF, Sakurada JK, Stach-machado DR, Rancel HA and Silva P (1991) *Trypanosoma cruzi*: Early Resistance Induced by Culture-Derived Trypomastigotes. *Experimental Parasitology* 268, 260-268.

Cardoso J and Brener Z (1980) Hematological Changes in Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 75, 97-104.

Carvalho LS, Camargos ER, Almeida CT, Peluzio MDCG, Alvarez-Leite JI, Chiari E and Reis DDÁ (2006) Vitamin E deficiency enhances pathology in acute *Trypanosoma cruzi*-infected rats. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 100, 1025-1031.

Chagas C (1909) 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1, 159-218.

Cintra IP, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Afonso LCC, Nicoli JR, Bambilra EA and Vieira EC (1998) Influence of dietary protein content on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 40, 355-362.

Coura JR and Dias JCP (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104, 31-40.

Coura JR and Viñas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature 465, S6-S7.

de Bonilla L, Ewald MD and Negrette A (1973) Morphology and leukocyte values in the experimental Chagas disease. Investigación Clínica 14, 129-149.

de Castro SL, Araújo-Jorge TC, Rivera MT and Junqueira ACV (2000) Avaliação de parâmetros parasitológicos e de mortalidade. In de Araújo-Jorge TC and de Castro SL (eds). Doença de Chagas: manual para experimentação animal. Rio de Janeiro, Brasil: SciELO-Editora FIOCRUZ, pp. 219-236.

Deane LM (1964) Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais 16, 27-48.

Dias JC (2006) Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39, 370-375.

Domingues CS, Haroim DJ, Souza CSF, Cardoso FO, Mendes VG, Previtalli-Silva H, Abreu-Silva AL, Pelajo-Machado M, da Costa SCG and Calabrese KS (2015) Oral outbreak of Chagas disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental evaluation of a patient's strain. PLoS ONE 10, 1-18.

dos Santos CD, Toldo MP and do Prado JJC (2005) *Trypanosoma cruzi*: the effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment during experimental infection. Acta Tropica 95, 109-115.

Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB, Ansara JA, Burleigh BA, Walch M, Gazzinelli RT and Lieberman J (2016) Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. Nature medicine 22, 210-216.

Duz ALC, Vieira PMDA, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Cardoso JMDO, Oliveira FCBD, Reis LES, Tafuri WL, Veloso VM, Reis AB and Carneiro CM (2014) The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 1005-1013.

Elias MCQ, Marques-Porto R, Freymüller E and Schenkman S (2001) Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Molecular and biochemical parasitology* 112, 79-90.

Fabrino DL, Leon LL, Parreira GG, Genestra M, Almeida PE and Rossana RC (2004) Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 11, 166-174.

Feldman AM and McNamara D (2000) Myocarditis. *New England Journal of Medicine* 343, 1388-1398.

Ferraz FN, Bilotti CC, Aleixo DL, Herrero JCM, do Nascimento JAD and de Araújo SM (2014) Hematological and parasitological changes in mice experimentally infected by *Trypanosoma cruzi* and treated with biotherapy 7dH. *European Journal of Integrative Medicine* 6, 664-671.

Francisco AF, de Abreu Vieira PM, Arantes JM, Pedrosa ML, Martins HR, Silva M, Velosa M, de Lana M, Bahia M.T, Tafuri WL and Carneiro CM (2008) *Trypanosoma cruzi*: Effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. *Experimental Parasitology* 120, 314-319.

Gascón J, Albajar P, Cañas E, Flores M, Herrera RN, Lafuente CA, Luciardi HL, Moncayo A, Molina L, Muñoz J and Puente S (2008) Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* 26, 99-106.

Green AM, DiFazio R and Flynn JL (2013) IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of Immunology* 190, 270-277.

Guedes PMM, Veloso VM, Afonso LC, Caliari MV, Carneiro CM, Diniz LF, Marques-da-Silva EA, Caldas IS, Do Valle Matta MA, Souza SM, Lana M, Chiari E, Galvão LMC and Bahia MT (2009) Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. *Veterinary immunology and immunopathology* 130, 43-52.

Guedes PMM, Veloso VM, Mineo TWP, Santiago-Silva J, Crepalde G, Caldas IS and Bahia MT (2012) Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 21, 151-156.

Hamilton PB, Teixeira MM and Stevens JR (2012) The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends in parasitology* 28, 136-141.

Herrera HM, Aquino LPCT, Menezes RF, Marques LC, Moraes MAV, Werther K and Machado RZ (2001) *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South

American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. *Veterinary Parasitology* 102, 209-216.

Herrera HM, Dávila AMR, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS and Jansen AM (2004) Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Veterinary parasitology* 125, 263-275.

Herrera L (2010) Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 50, 3-15.

Hooijmans CR and Ritskes-Hoitinga M (2013) Progress in using systematic reviews of animal studies to improve translational research. *PLOS Medicine* 10, e1001482.

Kaushansky K and Shattil SJ (2007) Bloodlines: the importance of mentoring for the future of hematology. *Blood* 109, 1353-1354.

Kennedy PGE (2013) Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *The Lancet Neurology* 12, 186-194.

Kierszenbaum F (1981) On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology* 44, 641-648.

Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M and Altman DG (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British journal of pharmacology* 160, 1577-1579.

Kita H (2011) Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunological reviews* 242, 161-177.

Klein RP and Camacho AA (1997) Electrocardiographic evaluation of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* during the acute and indeterminate chronic phases of infection. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 34, 337-344.

Kook H, Zeng W, Guibin C, Kirby M, Young NS and Maciejewski JP (2001) Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia. *Experimental hematology* 29, 1270-1277.

Lopes PDS, Ramos ELP, Gomez-Hernandez C, Ferreira GLS and Rezende-Oliveira K (2015) Prevalence of Chagas disease among blood donor candidates in Triangulo Mineiro, Minas Gerais State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57, 461-465.

Malvezi AD, Cecchini R, de Souza F, Tadokoro CE, Rizzo LV and Pinge-Filho P (2004) Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 41, 69-77.

Marcondes MC, Borelli P, Yoshida N and Russo M (2000) Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes and infection* 2, 347-352.

- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC and Simões MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115, 1109-1123.
- Márquez E, Crespo M, Mir M, Pérez-Sáez MJ, Quintana S, Barbosa F, and Pascual J (2013) Chagas' disease and kidney donation. *Nefrologia* 33, 128-33.
- Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH and Heukelbach J (2012) Mortality related to Chagas disease and HIV/AIDS coinfection in Brazil. *Journal of tropical medicine* 2012, 1-4.
- Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R and Morello A (2010) Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biological research* 43, 323-331.
- Mayadas TN, Cullere X and Lowell CA (2014) The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 9, 181-218.
- Melo RC (1999) Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural study in rats. *Tissue & Cell* 31, 281-290.
- Melo RC and Machado CR (2001) *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Experimental Parasitology* 97, 15-23.
- Melo RC, Fabrino DL, D'Ávila H, Teixeira HC and Ferreira AP (2003a) Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. *Cell Biology International* 27, 853-861.
- Melo RCN, D'Ávila H, Fabrino DL, Almeida PE and Bozza PT (2003b) Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue and cell* 35, 59-67.
- Mendonça PHB, da Rocha RFDB, de Braz Moraes JB, LaRocque-de-Freitas IF, Logullo J, Morrot A, Nunes MP, Freire-de-Lima CG and Decote-Ricardo D (2017) Canine macrophage DH82 cell line as a model to study susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Frontiers in Immunology* 2017, 604-615.
- Minning TA, Weatherly DB, Atwood J, Orlando R and Tarleton RL (2009) The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC genomics* 10, 1-15.
- Montenegro VM, Jiménez M, Dias JC and Zeledón R (2002) Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 491-494.
- Moraes-Souza H and Ferreira-Silva MM (2011) Control of transfusional transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44, 64-67.
- Moreno EA, Araujo MA, Alarcon ME, Lugo A, Moreno SC and Borges R (2007) Hematological and blood glucose alterations in Wistar rats with acute Chagasic infection during gestation. *Investigacion clinica* 48, 187-198.

Nakhle MC, Menezes MDCSD and Irulegui I (1989) Eosinophil levels in the acute phase of experimental Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 31, 384-391.

Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y and Karasuyama H (2007) Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood* 110, 913-920.

Olifiers N, Jansen AM, Herrera HM, De Cassia Bianchi R, D'Andrea PS, De Miranda Mourão G and Gompper ME (2015) Co-Infection and wild animal health: Effects of trypanosomatids and gastrointestinal parasites on coatis of the Brazilian pantanal. *PLoS ONE* 10, 1-19.

Olver CS, Andrews GA, Smith JE and Kaneko JJ (2011) Erythrocyte Structure and Function. In Weiss DJ and Wardrop KJ (eds). *Schalm's veterinary hematology*. Iowa, USA: John Wiley & Sons, pp. 123-129.

Pan American Health Organization (PAHO) (2006). Quantitative estimation of Chagas disease in the Americas. Montevideo. OPAS/HDM/CD/425-06.

Pan American Health Organization (PAHO) (2014). Available: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2382&temid=3921&lang=fr. Accessed 20 March 2014.

Petersen RM, Gürtler RE, Cecere MC, Rubel DN, Lauricella MA, Hansen, D and Carlomagno MA (2001) Association between nutritional indicators and infectivity of dogs seroreactive for *Trypanosoma cruzi* in a rural area of northwestern Argentina. *Parasitology Research* 87, 208-14.

Prata A (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases* 1, 92-100.

Pung OJ, Hulsebos LH and Kuhn RE (1988) Experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*) in the Brazilian squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): hematology, cardiology, cellular and humoral immune responses. *International journal for parasitology* 18, 115-120.

Rashid A, Rasheed K and Hussain A (2008) Trypanosomiasis in dog; A case report. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* 2, 48-51.

Raskin RE and Wardrop KJ (2011) Species Specific Hematology. In Weiss DJ and Wardrop KJ (eds). *Schalm's veterinary hematology*. Iowa, USA: John Wiley & Sons, pp.797-887.

Rassi AJ, Rassi A and Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *The Lancet* 375, 1388-1402.

Repka D, Rangel HA, Atta AM, Gavino VA and Piedrabuena AE (1985) Experimental Chagas' disease in mice infected with one LD50 of parasite. *Revista brasileira de biologia* 45, 309-316.

- Rivera I, Moreno EA, González N and de Yarbuh AL (2000) Caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* del occidente de Venezuela. *Revista de ecología latinoamericana* 7, 1-10.
- Roberson EL, Hanson WL and Chapman WL (1973) *Trypanosoma cruzi*: Effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Experimental Parasitology* 34, 168-180.
- Roellig DM, McMillan K, Ellis AE, Vandeberg JL, Champagne DE, Yabsley MJ (2010) Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 137, 959–966.
- Rovirosa-Hernández DJM, García-Orduña F, Morales-Mávil JE, Hernández-Salazar LT, Hermida-Lagunes J, Omar LM and Fuentes-Anaya T (2012) Valores hemáticos y química sanguínea de una población en semi-libertad de coati nariz blanca (*Nasua narica*) en La Venta Tabasco, Mexico. *Acta Zoologica Mexicana (nueva serie)* 28, 391-401.
- Santana LF, Gaspar RC, Rossi GAM, Nascentes GAN, de Oliveira GP, da Costa AJ and Rodrigues EA (2015) Alterações clínicas, hematológicas, seminais e parasitemia de caprinos machos experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*. *Ciência Animal Brasileira* 16, 399-409.
- Santana VL, Souza AP, Lima DA, Araújo AL, Justiniano SV, Dantas RP and Melo, MA (2012) Caracterização clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* no semiárido nordestino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32, 536–541.
- Santello FH, Frare EO, Santos CD, Toldo MPA, Kawasse LM, Zucoloto S and Prado JC (2007) Melatonin treatment reduces the severity of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Pineal Research* 42, 359-363.
- Santos CD, Levy AMA, Toldo MPA, Azevedo AP and Júnior JC (2007) Haematological and histopathological findings after ovariectomy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Veterinary Parasitology* 143, 222-228.
- Schoenborn JR and Wilson CB (2007) Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology* 96, 41-101.
- Shaw GL and Quadagno D (1975) *Trypanosoma lewisi* and *T. cruzi*: Effect of infection on gestation in the rat. *Experimental Parasitology* 37, 211-217.
- Shaw RJ, Cromwell O and Kay AB (1984) Preferential generation of leukotriene C4 by human eosinophils. *Clinical and experimental immunology* 56, 716-722.
- Shi HZ (2004) Eosinophils function as antigen-presenting cells. *Journal of leukocyte biology* 76, 520-527.
- Shikanai-Yasuda MA and Carvalho NB (2012) Oral transmission of Chagas disease. *Clinical infectious diseases* 54, 845-52.
- Silva RAMS, Victório AM, Ramirez L, Dávila AMR, Trajano V and Jansen AM (1999) Hematological and blood chemistry alterations in coatis (*Nasua nasua*)

naturally infected by *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 52, 119-122.

Stevens JR, Noyes HA, Dover GA and Gibson WC (1999) The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 118, 107-116.

Stockham, SL and Scott, MA (2013) *Fundamentals of veterinary clinical pathology*, 2nd Edn. Iowa, USA: John Wiley & Sons.

Tatakihara VLH, Malvezi AD, Panis C, Cecchini R, Zanluqui NG, Yamauchi LM and Martins-Pinge MC (2015) Nitric oxide-releasing indomethacin enhances susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection acting in the cell invasion and oxidative stress associated with anemia. *Chemico-biological interactions* 227, 104-111.

Teske E (2011) Neutrophil Structure and Biochemistry. In Weiss DJ and Wardrop KJ (eds). *Schalm's veterinary hematology*. Iowa, USA: John Wiley & Sons, pp. 263-267.

Thomsen AR, Pisa P, Bro-Jørgensen K and Kiessling R (1986) Mechanisms of lymphocytic choriomeningitis virus-induced hemopoietic dysfunction. *Journal of virology* 59, 428-433.

Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS and Campetella O (2005) The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infection and immunity* 73, 201-207.

Tyler KM and Engman DM (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology* 31, 472-481.

Uman LS (2011) Information management for the busy practitioner: Systematic reviews and meta-analyses. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 20, 57-59.

Van Hove L, Schisano T and Brace L (2000) Anemia diagnosis, classification, and monitoring using Cell-Dyn technology reviewed for the new millennium. *Laboratory hematology* 6, 93-108.

Van Luijk J, Bakker B, Rovers MM, Ritskes-Hoitinga M, de Vries RB and Leenaars M (2014) Systematic reviews of animal studies; missing link in translational research?. *PLoS One* 9, e89981.

Weiss DJ and Souza CD (2011) Monocytes and Macrophages and Their Disorders. In Weiss DJ and Wardrop KJ (eds). *Schalm's veterinary hematology*. Iowa, USA: John Wiley & Sons, pp. 298-306.

Zhu J, Yamane H and Paul WE (2009) Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology* 28, 445-489.

Vandamme TF (2014) Use of rodents as models of human diseases. *Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences* 6, 2-9.

Supplementary File S1. Complete search strategy with search filters and number of studies recovered in databases PubMed-Medline and Scopus

<i>PubMed-MEDLINE – Search filters</i>	<i>Retrieved records</i>
<p>#1 Trypanosomiasis: ("chagas disease"[MeSH Terms] OR "trypanosomiasis, african"[MeSH Terms] OR "trypanosomiasis"[MeSH Terms] OR "trypanosoma"[MeSH Terms] OR "Trypanosoma cruzi"[MeSH Terms] OR "African sleeping sickness"[MeSH Terms] OR "African sleeping sicknesses"[MeSH Terms] OR "Trypanosoma brucei"[MeSH Terms] OR "Trypanosoma gambiense"[MeSH Terms] OR "Trypanosoma rhodesiense"[MeSH Terms] OR "African trypanosomiasis"[MeSH Terms] OR "chagas disease"[TIAB] OR "trypanosomiasis, african"[TIAB] OR "Trypanosomiasis"[TIAB] OR "Trypanosoma"[TIAB]) OR "American trypanosomiasis"[TIAB] OR "Trypanosoma cruzi"[TIAB] OR "African sleeping sickness"[TIAB] OR "African sleeping sicknesses"[TIAB] OR "Trypanosoma brucei"[TIAB] OR "Trypanosoma gambiense"[TIAB] OR "Trypanosoma rhodesiense"[TIAB] OR "African trypanosomiasis"[TIAB])</p>	36090
<p>#2 Hematology blood tests: ("hematology"[MeSH Terms] OR "hematocrit"[MeSH Terms] OR "hemoglobins"[MeSH Terms] OR "leukocyte count"[MeSH Terms] OR "erythrocyte count"[MeSH Terms] OR "hematology"[TIAB] OR "hematocrit"[TIAB] OR "hemoglobins"[TIAB] OR "leukocyte count"[TIAB] OR "erythrocyte count"[TIAB] OR "hemogram"[TIAB] OR "wbc"[TIAB] OR "rbc"[TIAB] OR "twbc"[TIAB] OR "trbc"[TIAB] OR "dwbc"[TIAB] OR "differential leukocyte count"[TIAB] OR "haematology")</p>	2023095
<p>#3 Mammals filter: ("mammals" OR "opossums" OR "insectivora" OR "marsupialia" OR "monotremata" OR "dogs" OR "cats" OR "cattle" OR "livestock" OR "goats" OR "sheep, domestic" OR "horses" OR "ruminants" OR "shrews" OR "arvicolinae" OR "elephants" OR "hyraxes" OR "trichechus" OR "proboscidea mammal" OR "sirenia" OR "sloths" OR "xenarthra" OR "armadillos" OR "tupaiidae" OR "scandentia" OR "lemur" OR "primates" OR "hominidae" OR "pongo" OR "pan troglodytes" OR "pan paniscus" OR "gorilla gorilla" OR "haplorhini" OR "hares" OR "lagomorpha" OR "rabbits" OR "rodentia"[MeSH Terms] OR "mice" OR "rats" OR "moles" OR "hedgehogs" OR "whales" OR "cetacea" OR "dolphins" OR "artiodactyla" OR "swine" OR "camels" OR "giraffes" OR "deer" OR "antelopes" OR "equidae" OR "perissodactyla" OR "chiroptera" OR "carnivora" OR "ursidae" OR "procyonidae" OR "raccoons" OR "mephitidae" OR "mustelidae" OR "pinnipedia" OR "strepsirhini" OR "hylobatidae" OR "cricetinae")</p>	20073230
<p>Combined search: (#1 AND #2 AND #3)</p>	439

SCOPUS – Search filters	Retrieved records
<p>#1 Hematology (TITLE-ABS-KEY("hematology") OR TITLE-ABS-KEY("hematocrit") OR TITLE-ABS-KEY("hemoglobins") OR TITLE-ABS-KEY("leukocyte count") OR TITLE-ABS-KEY("erythrocyte count") OR TITLE-ABS-KEY("hemogram") OR TITLE-ABS-KEY("wbc") OR TITLE-ABS-KEY("rbc") OR TITLE-ABS-KEY("twbc") OR TITLE-ABS-KEY("trbc") OR TITLE-ABS-KEY("dwbc") OR TITLE-ABS-KEY("differential leukocyte count") OR TITLE-ABS-KEY("haematology"))</p>	509973
<p>#2 Trypanosomiasis (TITLE-ABS-KEY("chagas disease") OR TITLE-ABS-KEY("trypanosomiasis, african") OR TITLE-ABS-KEY("trypanosomiasis") OR TITLE-ABS-KEY("trypanosoma") OR TITLE-ABS-KEY("Trypanosoma cruzi") OR TITLE-ABS-KEY("African sleeping sickness") OR TITLE-ABS-KEY("African sleeping sicknesses") OR TITLE-ABS-KEY("Trypanosoma brucei") OR TITLE-ABS-KEY("Trypanosoma gambiense") OR TITLE-ABS-KEY("Trypanosoma rhodesiense") OR TITLE-ABS-KEY("African trypanosomiasis"))</p>	45032
<p>Combined search: #1 AND #2</p>	1095
<p>Search limits: animals [limit to]</p>	614

ARTIGO 2. ALTERAÇÕES MICROESTRUTURAIS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DURANTE INFEÇÕES COM *Trypanosoma cruzi* EM MAMÍFEROS NÃO HUMANOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO

Atualmente, ainda não está claro os tipos e a distribuição das lesões no Sistema Nervoso Central (SNC) induzidas por *Trypanosoma cruzi* e as evidências disponíveis são baseadas em dados fragmentados. Baseado nisso, nós desenvolvemos uma revisão sistemática para analisar a evidência pré-clínica sobre as principais características das lesões no SNC em hospedeiros não humanos infectados por *T. cruzi*. A partir de uma pesquisa estruturada nas plataformas PubMed/Medline e Scopus, 32 estudos originais foram recuperados, submetidos a extração de dados e análise de viés metodológico. Em geral, nossos resultados mostraram que as alterações mais frequentes no SNC são a presença de diferentes formas celulares de *T. cruzi* e intenso infiltrado inflamatório mononuclear, principalmente formado por linfócitos TCD4+ e TCD8+. As meninges e as zonas perivasculares do cérebro, cerebelo, e medula espinal foram os principais focos de parasitismo. As alterações inflamatórias identificadas foram dependentes das cepas de *T. cruzi*, indicando que o genótipo e fenótipo do parasito pode estar associado ao tropismo e gravidade das lesões no SNC. As principais limitações metodológicas encontradas nos estudos foram divergências nas vias de inoculação, subnotificação da idade e peso do animal, estratégias de cálculo amostral, e caracterização histopatológica limitada. Então nossos achados indicaram que o encéfalo é o principal alvo de *T. cruzi*, sendo que as alterações inflamatórias no SNC são mais frequentes e graves na fase aguda da infecção. Como as alterações foram dependentes das características de patogenicidade e virulência das cepas de *T. cruzi*, a caracterização do genótipo e fenótipo do parasito são extremamente relevantes na predição das alterações no SNC e das manifestações neurológicas associadas à doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma*, doença de Chagas, cérebro, medula espinal, genótipos.

INTRODUÇÃO

Doença de Chagas é uma infecção tropical negligenciada causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Estimativas recentes indicam que 8 milhões de pessoas estejam infectadas por este parasita em todo o mundo (WHO, 2017). Essa doença está intimamente relacionada com a pobreza e é endêmica em países da América do Sul e Central, sendo considerada um problema de saúde pública com mais de 10 mil mortes por ano (WHO, 2017). Porém, devido à intensa migração de latino-americanos infectados por *T. cruzi* para a Ásia, Europa e Oceania, no começo da década de 1990 houve um aumento no número de casos da doença de Chagas nessas áreas não endêmicas, com aumentos sucessivos dos casos nos anos posteriores (Schmunis, 2007).

Além dos humanos, o *T. cruzi* infecta uma grande variedade de mamíferos domésticos e selvagens como Carnívora, Chiroptera, Didelphidomorphia, Lagomorpha, Perisodactyla, Pilosa, Primata e Rodentia, (Añez et al., 2009; Herrera, 2010). Sendo os cães o seu principal reservatório doméstico (Montenegro et al., 2002). Além dos insetos vetores a transmissão dos parasitos também pode ocorrer por vias não vetoriais como transfusões de sangue (Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011), e transplantes de órgãos infectados (Márquez et al., 2013), acidentes de laboratório (Dias, 2006), e por ingestão de alimentos contaminados com as formas infectantes (tripomastigotas) de *T. cruzi* (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012; Domingues et al., 2015). A transmissão vetorial é principalmente mediada por insetos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Hemiptera; Reduviidae) (Coura e Viñas, 2010).

O *T. cruzi* é um parasito que possui uma alta diversidade genética, composta por um conjunto de cepas ou isolados que circulam entre insetos vetores e hospedeiros mamíferos (Rassi et al., 2010). Embora controverso, essa heterogeneidade tem sido associada à ampla variabilidade de manifestações clínicas, e aos diferentes perfis de morbidade e mortalidade da doença de Chagas (Macedo et al., 2004; Manoel-Caetano e Silva, 2007). Um consenso foi estabelecido sobre as cepas de *T. cruzi*, sendo separados três genótipos principais, TcI, TcII, TcIII (Annex, 1999; De Freitas et al., 2006). O TcI predomina no ciclo de transmissão silvestre, é menos resistente à quimioterapia antiparasitária de referência (benznidazole e nifurtimox), e está associado à doença humana no norte da América latina. O TcII predomina no ambiente doméstico em todos os países da América do Sul. Parasitos TcII apresentam maior resistência à quimioterapia antiparasitária e elevada patogenicidade (Di Noia et al., 2002; Freitas et al., 2005; Botero et al., 2007). Esta linhagem é subdividida em cinco

unidades de tipagens discretas, caracterizadas como IIa, IIb, IIc, IId e IIe (Brisse et al., 2000). Já o TcIII predomina em ambientes silvestres da América do Sul, com casos referenciados no Brasil mais especificamente na Amazônia, sendo a maioria em pequenos mamíferos (ex. morcegos, quatis) (Lisboa et al., 2009; Rocha et al., 2013), e em humanos apenas um caso crônico foi relatado (Abolis, 2011).

Embora a relação entre genótipo e fenótipo parasitário, tropismo, e manifestações clínicas ainda sejam pouco compreendidas (Macedo e Pena, 1998; Vago et al., 2000; Prata, 2001), todas as cepas de *T. cruzi* isoladas de ambiente natural são capazes de infectar hospedeiros mamíferos (Yeo et al., 2005; Herrera, 2010). Nos hospedeiros vertebrados, o *T. cruzi* estabelece uma infecção sistêmica e parasitismo de múltiplos órgãos, especialmente coração, intestinos e esôfago (Lana e Tafure, 2011). Embora as alterações neurológicas associadas à doença de Chagas sejam frequentemente negligenciadas, existem evidências de que o *T. cruzi* é capaz de parasitar e induzir lesões inflamatórias em estruturas do sistema nervoso periférico (SNP) (Prata, 2001; Marin-Neto et al., 2007; Pérez et al., 2011) e central (SNC) (Masocha and Kristensson, 2012; Pittella, 2013). O comprometimento do SNC durante a fase aguda da doença de Chagas pode originar meningite, convulsões, inquietação, choro contínuo, insônia, e até coma transitório (Storino e Milei, 1994; Storino, 1998; Storino et al., 2003). As afeções durante a fase crônica como consequências da meningoencefalite chagásica consistem em distúrbios motores e sensoriais, alterações psíquicas e até quadros cerebelares (Storino e Milei, 1994). Igualmente, foram determinadas alterações eletrofisiológicas como consequências da deterioração da função cortical cerebral em indivíduos portadores da doença de Chagas crônica (Prost et al., 2000).

Atualmente, as alterações no SNP são melhor compreendidas, e a disautonomia secundária às lesões de gânglios e terminações nervosas do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático tem sido consistentemente implicada na fisiopatologia da cardiomiopatia e das megasíndromes chagásicas (Messenger et al., 2015; Oliveira et al., 2017). Entretanto, o tropismo, distribuição, e alterações induzidas por *T. cruzi* em diferentes estruturas e órgãos do SNC são pouco compreendidas. Considerando que a evidência atual é falha por se basear em dados fragmentados, torna-se difícil compreender a amplitude das alterações do SNC que se desenvolvem ao longo da infecção por *T. cruzi*. Sendo assim, a partir de uma busca estruturada e sistematizada, nós avaliamos a evidência pré-clínica sobre o impacto da infecção por *T. cruzi* no SNC. Além de caracterizar os modelos de infecção utilizados, nós estabelecemos a relação entre as características das cepas de *T. cruzi*, o

tropismo para o SNC, os tecidos e órgãos mais susceptíveis ao parasitismo, e as lesões mais frequentes. Além disso, nós avaliamos criticamente a evidência científica em relação a qualidade metodológica dos estudos incluídos nessa revisão sistemática.

MATERIAIS E METODOS

Pesquisa da literatura

Uma pesquisa bibliográfica abrangente concluída em 20/11/2017 às 19:30 horas, foi realizada nas bases de dados PubMed/Medline (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>). Foram usados descritores estruturados em filtros de busca construídos para três domínios: doença de Chagas, sistema nervoso e modelo animal (Tabela S1). Os filtros na plataforma PubMed/Medline foram construídos utilizando distribuição hierárquica dos termos MESH. Para a plataforma Scopus utilizou-se a mesma estratégia de busca do Pubmed, porém, foi utilizado o filtro fornecido pela própria plataforma Scopus para estudos animais. Os descritores não-MeSH foram caracterizados pelo algoritmo [TIAB], que também foi utilizado para recuperar estudos recentemente publicados, mas não indexados (em processo). Esta revisão sistemática foi desenvolvida a partir das diretrizes PRISMA (Figura 1) (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis) (Moher et al., 2009), que é utilizada como guia para seleção, triagem e elegibilidade dos estudos.

Extração e gerenciamento de dados

Um pesquisador independente (E.V) selecionou estudos elegíveis com base na análise de título e abstract. No caso de dúvidas, foi solicitado uma arbitragem por revisores independentes (R.V.G, M.M.S. e R.D.N.) para decidir se o estudo preenchia os critérios de elegibilidade definidos anteriormente. Para descartar a subjetividade no processo de coleta e seleção dos dados, as informações foram extraídas independentemente pelos três pesquisadores (R.V.G, M.M.S. e R.D.N.) e analisadas separadamente. Os dados de cada estudo foram extraídos e tabulados usando informações padronizadas como: i) características da publicação (título, autor, ano e país de origem do estudo); ii) modelo experimental (espécie animal, sexo, idade, peso, número de animais e grupos experimentais); iii) características da infecção (natureza da infecção [natural ou experimental], cepa de *T. cruzi*, via de inoculação, quantidade do inóculo, fase da parasitemia), iv) desfechos morfológicos e funcionais associados ao SNC (teste diagnósticos, tecido infectado e tipos de

alterações). Quando houve dificuldade para obtenção dos trabalhos em texto completo, os autores foram solicitados por e-mail para fornecer o artigo. Posteriormente, os dados foram comparados e as informações conflitantes identificadas e corrigidas após discussão entre os pesquisadores.

Critérios de elegibilidade

Somente estudos originais publicados em Inglês, Português e Espanhol foram incluídos. Revisões da literatura, comentários, notas, capítulos de livros, bem como estudos não indexados foram excluídos. Foram selecionados somente os estudos que preencheram todos os critérios de elegibilidade: i) estudos com mamíferos experimentalmente ou naturalmente infetados por *T. cruzi*, ii) estudos com pelo menos um grupo controle infectado com *T. cruzi* e que não receberam nenhum tipo de tratamento, iii) estudos utilizando cepas de ocorrência natural e sem manipulações genéticas, iv) hospedeiros que não foram geneticamente modificados e não apresentavam alterações decorrentes de intervenções concorrentes, v) estudos descrevendo desfechos morfológicos e/ou fisiológicos associados ao SNC, vi) estudos em texto completo.

Análise do viés metodológico

A análise de viés foi estruturada a partir de características descritas na estratégia ARRIVE (Pesquisa Animal: Relato de Experimentos In Vivo) (Kilkenny et al. 2010). Nesse sentido, foram utilizados critérios baseados em breves descrições das características essenciais de todos os estudos que utilizam modelos animais, tais como background teórico, objetivo de investigação, métodos analíticos, abordagem estatística, cálculos de amostras e medidas de desfecho de pesquisa. Uma tabela resumindo todos os aspectos relevantes e aplicáveis foi construída considerando a especificidade e os objetivos da revisão sistemática. A adesão individual aos critérios de viés e a média geral de adesão foram expressos como valores absolutos (n) e em porcentagem (%) (Pereira et al. 2017).

RESULTADOS

Estudos incluídos

A pesquisa inicial resultou em 1125 estudos, e destes 186 era estudos duplicados e por isso foram excluídos. Após leitura do título e resumo, 707 estudos irrelevante foram excluídos, como descrito na figura 1. Os 232 artigos restantes foram então lidos na íntegra e

mais 200 artigos foram excluídos: alterações no sistema nervoso periférico (SNP) (n=59), estudos clínicos (n=33) ou in vitro (n=18), estudos secundários (n=14). Finalmente, foram identificados e incluídos na revisão sistemática 32 estudos (Figura 1).

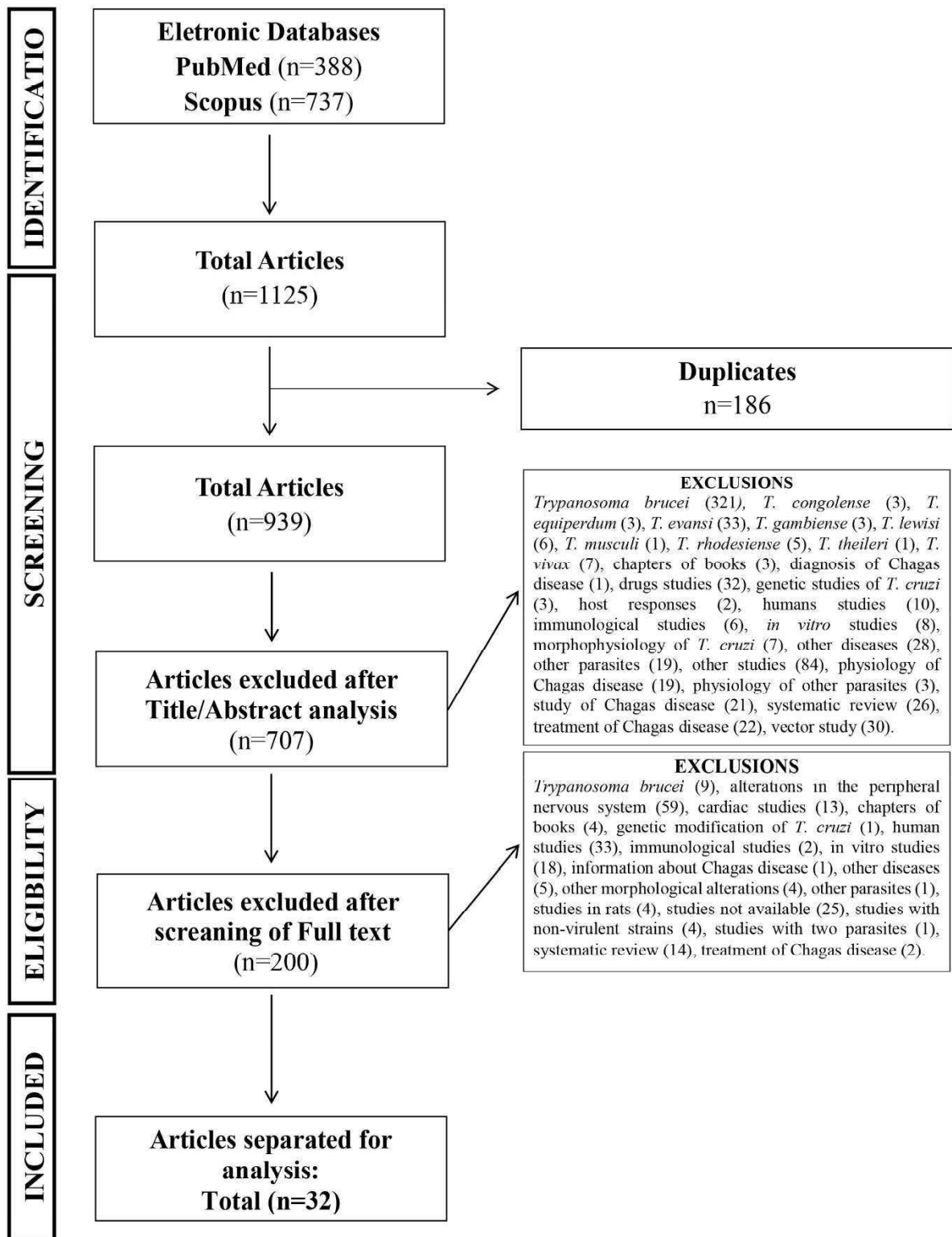


Figura 1. Diagrama de fluxo dos resultados da busca, triagem e elegibilidade dos estudos incluídos na revisão sistemática baseado na declaração PRISMA “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses” (www.prisma-statement.org).

Análise dos modelos de infecção

Os 32 estudos identificados foram realizados em 7 diferentes países, principalmente Brasil (40,6%; n=13), seguido por Estados Unidos (25%, n=8) e Argentina (12,5%; n=4). Os modelos animais mais utilizados foram camundongos 90,6% (n=29), cavalo, porco e porquinho da índia 3,1% (n=1) cada. As linhagens de camundongo mais utilizadas foram C3H (40,6%; n=13), Swiss (25%; n=8) e, C57BL/6 (18,8%; n=6). Quanto ao *T. cruzi*, as cepas mais utilizadas foram a Colombiana (25%, n=8) seguida pela Brasil (15,6%; n=5), Y, RA e Tulahuén (9,4%; n=3 cada). A via de inoculação mais usada foi intraperitoneal (68,8%; n=22), seguida pela subcutânea, intradérmica e intravenosa (6,3%; n=2 cada). A via de inoculação não foi relatada em 4 estudos (12,5%). Testes para confirmação da infecção não foram descritos em 11 (35,4%) artigos (Tabela 1). A maior parte dos estudos avaliou infecções agudas (62,5%; n=20). Infecções agudas e crônicas foram simultaneamente relatadas em 8 estudos (25%), enquanto infecções exclusivamente crônicas foram avaliadas em apenas 4 estudos (12,5%) (Tabela 2).

ença leve de anticorpos de matriz extracelular FN, $\alpha 4$, LN, $\alpha 5$, $\alpha 6$

hages (data not shown) and CD8+ and, to a lesser extent, CD4+ T cells; †: CD8+ predominantes respeito a

CD4+; ‡: Predomínio de Macrófago

ção das arteríolas cerebrais com acetilcolina; Lab: Ligação da α

Os genótipos de *T. cruzi* mais utilizados foram TcI (40,6%; n=13), TcII (12,5%; n=4), TcIV (3,1%; n=1) e TcVI (12,5%; n=4), 6 estudos (18,8%) utilizaram mais de um genótipo e, em 4 estudos (12,5%) não foi possível identificar o genótipo das cepas utilizadas. Análises histopatológicas foram realizadas em 23 estudos (71,9%), seguida por imunohistoquímica (18,8%; n= 6), pela técnica de Polymerase Chain Reaction - PCR (18,8%; n= 6), e Western blot (9,4%; n=3.). Os órgãos do SNC com as maiores alterações foram cérebro (65,6%; n=21), seguido pela medula espinal (25%; n=8) e cerebelo (15,6%; n=5) (figura 2).

Em geral as lesões mais frequentes no SNC foram a presença de focos inflamatórios (68,8%; n=22), com predomínio de infiltrado mononuclear linfocitário (15,6%; n=5). O encéfalo apresentou inflamação moderada à intensa com marcante distribuição perivascular. Em menor proporção, foram encontrados focos inflamatórios nas meninges (9,4%; n=3), plexo coroide (9,4%; n=3) e núcleos basais (6,3%; n=2). Na medula espinal, foram encontrados focos inflamatórios principalmente associados às raízes nervosas (50%; n=16) e meninges (50%; n=16) (tabela 2; figura 2).

A presença de ninhos de amastigotas, tripomastigotas livres ou formas indeterminadas de *T. cruzi* no SNC foram relatadas em 53,1% dos trabalhos (n=17). Os órgãos ou tecidos com maior presença de parasitas foram o cérebro, a substância branca e o hipocampo, onde observou-se a presença de amastigotas no citoplasma das células da glia (astrócitos, micróglia, endotélio e oligodendrócitos) (68,8%; n=22). Também foram encontrados pseudocistos com amastigotas intra e extracelulares nos núcleos basais (12,5%; n=4), no cerebelo (12,5%; n=4) e nas células de Purkinje (12,5%; n=4).

Na substância branca da medula espinal também foram encontrados amastigotas intra e extracelulares (9,4%; n=3). A presença de anticorpos anti-*T. cruzi* foi descrita em 3 estudos (9,4%) e antígenos de *T. cruzi* em 4 estudos (12,5%), tanto no encéfalo como na medula espinal, foram descritos vasculopatias (15,6%; n=5), dano tecidual por necrose (9,4%; n=3), assim como, edemas (9,4%; n=3), gliose (9,4%; n=3) e satelitose (6,3%; n=2) (tabela 2; figura 2).

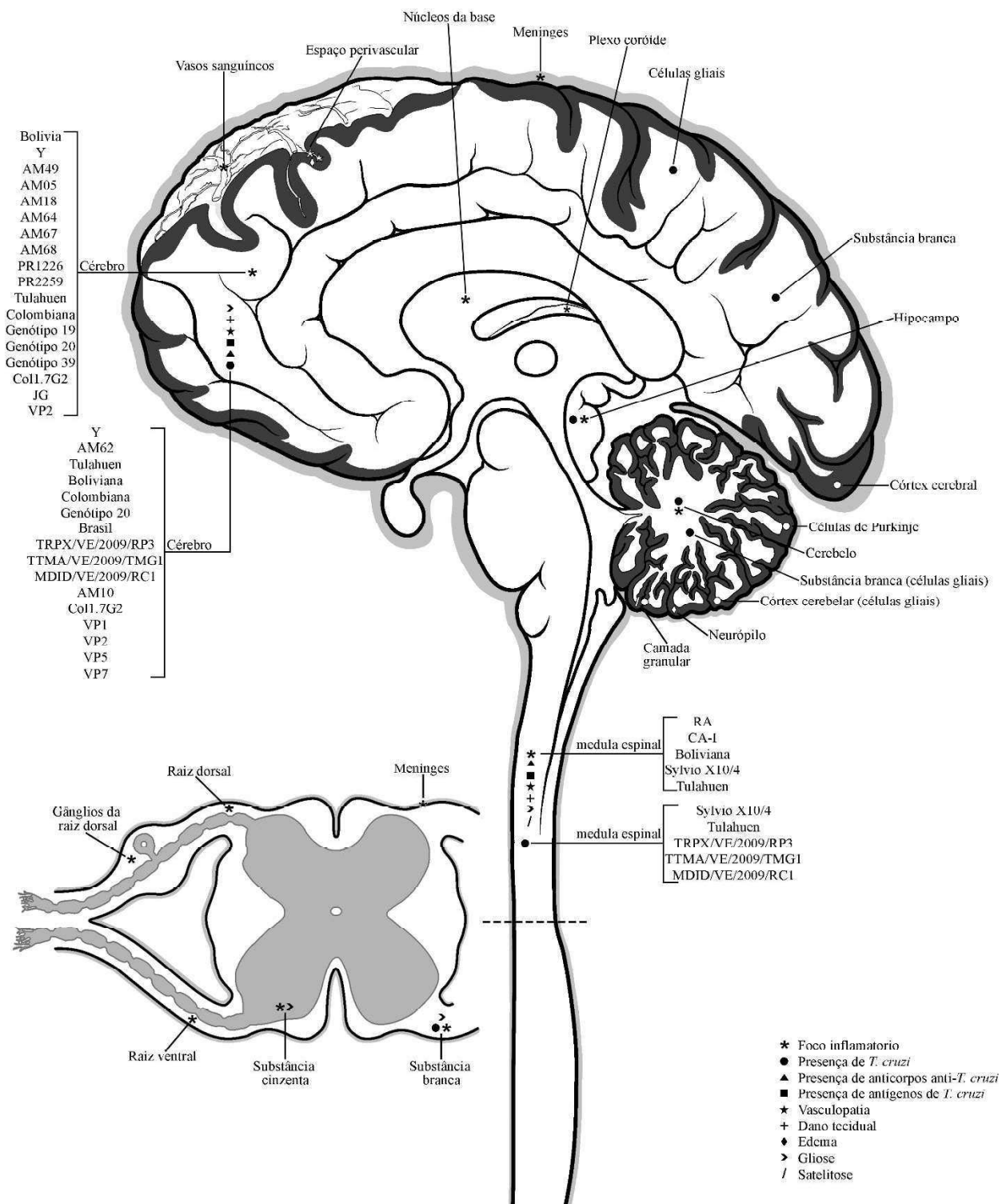


Figura 2. Representação esquemática demonstrando a distribuição das alterações morfológicas e tropismo das diferentes cepas de *T. cruzi* no SNC. *: foco inflamatório; ●: presença de *T. cruzi*; ▲: Presença de anticorpos anti-*T. cruzi*; ■: Presença de antígenos de *T. cruzi*; ★: Vasculopatia; +: Dano tecidual; ◆: Edema; >: Gliose; /: Satellitose. As cepas predominantes em cada região estão apresentadas entre colchetes [.

Os poucos registros durante a fase crônica da doença de Chagas relatam que as alterações mais frequentes consistiam em focos inflamatórios entre leves a intensos (9,4%; n=3), presença de ninhos de *T. cruzi* (6,3%; n=2), danos teciduais como lesões autoimunes (3,1%; n=1), degeneração e necrose dos neurônios (3,1%; n=1). Os tecidos mais afetados foram o cérebro, a barreira hematoencefálica e a medula espinal. Somente 11 estudos (34,4%) avaliaram a carga parasitária no dia do sacrifício dos animais com números de parasitos variando entre 0 a $69,3 \times 10^6$ tripomastigotas.

Análise de viés

O resultado detalhado da análise de viés é mostrado na tabela 3. Uma média de $55,0 \pm 12,3$ itens da ARRIVE foram atendidos pelos estudos originais. Em geral, os estudos realizados a mais de 15 anos foram os que apresentaram maior deficiência no detalhamento metodológico, bem como na descrição dos resultados (Figure 3). Apenas 7 artigos (21,9%) justificaram o modelo animal utilizado. Aprovação do comitê de ética foi relatada em 13 (40,6%) estudos, e somente 2 estudos (6,25%) justificaram o tamanho do inóculo de *T. cruzi* utilizado. Nenhum estudo justificou a via de administração utilizada. Em relação ao modelo animal, todos os estudos (n=32, 100%) relataram a espécie animal e a cepa de *T. cruzi* utilizadas. O sexo, peso e a idade dos animais foram relatados em 84,4% (n=27), 25% (n=8) e 75% (n=24) dos estudos, respectivamente. O cálculo do tamanho amostral foi explicitado em apenas 1 estudo (3,1%). A descrição detalhada da análise estatística utilizada foi relatada em 43,8% (n=14) dos estudos. Apenas 16 estudos (50%) relataram modificações no protocolo experimental por eventos adversos (Tabela 3).

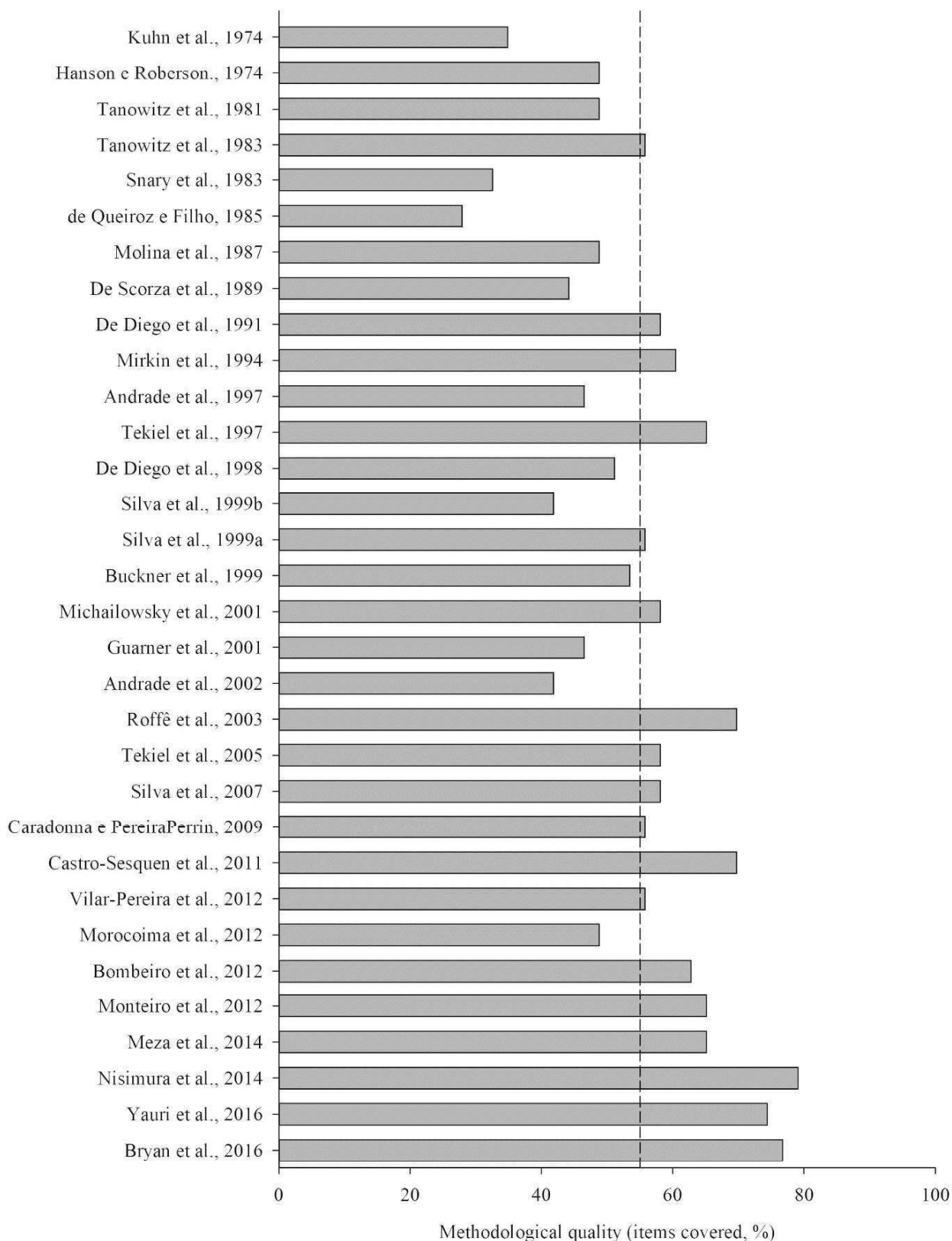


Figura 3. Análise do viés metodológico (qualidade do relato) para cada estudo incluído na revisão sistemática. Baseado em pesquisa animal: relato de experimentos in vivo - diretrizes ARRIVE (www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines). A linha pontilhada indicou a pontuação média de qualidade (%). A análise detalhada de viés estratificada por domínios e itens avaliados é apresentada na Tabela 3.

DISCUSSÃO

A partir de uma triagem sistemática, observamos que a maioria dos estudos que investigaram as alterações no SNC causadas pelo *T. cruzi* foram realizadas em países em desenvolvimento, revelando que os esforços de pesquisa estão concentrados nos países onde a doença de Chagas é endêmica (Antinori et al., 2017). Além disto, identificamos um escore geral limitado de qualidade metodológica para o conjunto de estudos. Como a análise do viés deste relatório foi estruturada a partir de requisitos básicos para a aquisição e interpretação racional dos resultados, a qualidade da evidência limitada poderia ser atribuída a estudos com escores metodológicos individuais baixos (Zoltowski et al., 2014). Esses aspectos apontam para a necessidade urgente de uma análise e interpretação mais rigorosa das evidências, que devem considerar todos os elementos críticos que podem prejudicar a validade de construção dos estudos. Claramente nossos resultados mostraram também uma influência temporal na variação de viés, uma vez que estudos mais antigos apresentaram descrições pobres dos estudos, atendendo a poucos critérios estabelecidos na análise de viés. Em geral nossos achados mostram que houve uma melhora no detalhamento dos estudos ao longo dos anos, provavelmente pelo desenvolvimento de novas técnicas e métodos estatísticos, assim como o aumento da disponibilidade de diretrizes e estratégias regulatórias adotadas para estimular a confecção de relatórios científicos mais claros e concisos.

Apesar das limitações metodológicas, elementos importantes nos delineamentos experimentais foram corretamente identificados em nosso levantamento, contribuindo para a confiabilidade e reprodutibilidade dos estudos, principalmente nos relatos mais recentes. Dados como modelo animal, sexo, peso, estirpe parasitária, via de administração e parasitemia, foram consistentemente relatados. Nossos resultados mostram que camundongos foram o modelo animal mais utilizado. Uma seleção adequada de espécies animais e antecedentes genéticos é crucial nas investigações de doenças parasitárias, uma vez que esses fatores estão diretamente relacionados à resistência do hospedeiro e à suscetibilidade ao patógeno (Andrade et al. 2002; León et al. 2016). Além disto, camundongos são aplicáveis, especialmente considerando que são suscetíveis à infecção por *T. cruzi* e, além de representar um modelo animal onde os achados podem ser extrapolados para a realidade humana, principalmente em relação às alterações histopatológicas (Andrade

et al. 2002). Além da similaridade deve-se levar em consideração também que modelos murinos são mais fáceis de manusear, alojar e apresentam baixo custo de manutenção. Nossos dados também mostraram um número reduzido de trabalhos utilizando animais maiores como modelos da doença de Chagas, especialmente cavalos e porcos, possivelmente esta limitação se deu pela baixa disponibilidade, elevados custos e problemas para aprovação nos comitês de ética.

Além dos modelos de camundongos, cepas semelhantes também foram utilizadas para induzir a infecção pelo *T. cruzi* nos estudos analisados. A seleção da cepa parasitária é essencial especialmente considerando os perfis variáveis de infectividade, patogenicidade e virulência (Andrade et al. 2002; Manoel-Caetano e Silva, 2007; León et al. 2016). Em geral, as cepas descritas neste estudo apresentam elevada virulência e patogenicidade. Estes dados estão em conformidade com os principais achados morfológicos apresentados em nossos resultados, com predomínio de focos inflamatórios moderados a intensos e elevado número de infiltrados mononucleares e linfocíticos. Esses elementos estão intimamente correlacionados com modelos agudos de infecção, uma vez que os animais frequentemente morrem antes de desenvolver a infecção crônica (Chatelain e Konar, 2015). Como as cepas de parasitas utilizadas estavam alinhadas com as fases de interesse na doença de Chagas, ou seja, a fase aguda, os estudos analisados exibiram um importante elemento de consistência metodológica, com reflexo positivo na validade da descrição.

Os achados morfológicos mais frequentes encontradas em nossa revisão foram focos de infiltrado inflamatório no SNC durante a fase aguda da infecção com *T. cruzi*, predominando células mononucleares, principalmente linfócitos (T CD4+ e T CD8+). Os tecidos ou zonas com focos inflamatórios foram os espaços perivasculares, meninges do cérebro e raízes nervosas da medula espinal. Levando em consideração que o SNC é considerado um sítio imunoprivilegiado, devido a barreira hematoencefálica (Ziv et al., 2006), o desenvolvimento de infiltrados inflamatórios nestas regiões só ocorrem em casos de infecção intensa. Talvez por isso a forma como o *T. cruzi* consegue ingressar no SNC é variável, pouco estudada e rara, porém quando estas alterações são encontradas, normalmente indicam uma lesão grave, principalmente nos casos de tripanossomíases americana ou africana (Galea, 2007; Masocha e Kristensson 2012). A abertura da barreira hematoencefálica acontece quando fatores derivados de patógenos (*e.g.*, cisteína protease) são reconhecidos pelos

linfócitos T. A ativação destes linfócitos, leva a produção de citocinas ($IFN\alpha/\beta$, $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$), que se difundem no SNC, estimulando as células endoteliais cerebrais a produzir moléculas de Adesão de Leucócitos Ativadas (ALCAM, ICAM-1) e moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), que favorecem a migração celular. Além disto, estas citocinas também estimulam astrócitos a produzir citocinas quimiotáticas como CXCL10 que aumentam a permeabilidade da BHE, permitindo a disseminação de formas flageladas do *T. cruzi* e também de linfócitos que podem conter no seu interior a forma amastigota do parasita (Rocha et al., 1994; Silva et al., 2010; Masocha e Kristensson, 2012). Em nosso estudo, observou-se, na maioria dos trabalhos, a presença de amastigotas no citoplasma das células dos núcleos da base, células da glia (astrócitos, micróglia, endotélio e oligodendrócitos), cerebelo e células de purkinje, bem como a formação de focos de infiltrados inflamatórios linfocitários no SNC. Por outro lado, a presença de parasitas flagelados de tripanossomas também estimulam a resposta humoral, e conseqüentemente a abertura da BHE (Masocha e Kristensson, 2012).

Outro ponto interessante é que células mononucleares e macrófagos respondem reconhecendo Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP's) circulantes, produzindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, que podem se difundir no SNC e estimular a produção de mediadores importantes no aumento da permeabilidade vascular como a prostaglandina E e conseqüentemente facilitar a entrada de células inflamatórias no SNC (Vitkovic et al., 2000; Banks, 2009; Chizzolini e Brembilla, 2009; Kawai e Akira, 2010). Guillamón-Vivancos et al., 2015). Todas estas alterações viabilizam a instalação de um processo inflamatório que será controlado por astrócitos, micróglia e neurônios (Galea et al., 2007). No entanto, ainda não está claro quais mecanismos seriam utilizados neste controle e menos ainda quais os mediadores envolvidos na inibição da proliferação celular (Meinl et al., 1994). Atualmente sabe-se que células T reguladoras também são ativadas para controlar a migração celular e conseqüentemente a instalação da inflamação (Trajkovic et al., 2004). No entanto, no caso da infecção por *T. cruzi*, esta modulação não é suficiente para impedir a migração celular e conseqüentemente a limitar a instalação de uma inflamação aguda no tecido.

As diversas manifestações clínicas durante a doença de Chagas estão diretamente ligadas ao genótipo dos parasitas circulantes, à origem geográfica e, aos

ciclos de transmissão silvestre e doméstico, já que estas variações nas populações determinam o tropismo aos tecidos, a parasitemia e a patogêneses nos hospedeiros vertebrados durante a fase aguda e crônica da doença (Andrade et al., 1999; Macedo et al., 2004; Magalhães-Santos et al., 2004; Botero et al., 2007). Em nossa revisão observamos que, após cinquenta inoculações feitas com mais de 20 cepas de *T. cruzi* diferentes, aquelas pertencentes aos genótipos TcI (ex. Colombiana), TcII (ex. Y) (Minning, 2011) e TcIV (ex. AM05) (Meza et al., 2014) foram as que apresentaram histotropismo para o SNC. As cepas TcI e TcII podem ser encontradas em diferentes tecidos inclusive no tecido nervoso (Andrade et al., 2010; Minning, 2011; Zingales et al., 2012). No entanto, as cepas do genótipo TcIV apresentam, tropismo preferencial pelo SNC (Meza et al., 2014). Esta tendência nos mostra a importância de conhecer o genótipo de *T. cruzi* para melhor entender as manifestações e evolução clínica da doença. Baseado neste tropismo é possível avaliar a necessidade de novos tratamentos mais eficientes e menos tóxicos de acordo com os principais locais de infecção do parasita. É possível que a relação entre genótipo parasitário e tropismo seja relevante para o delineamento racional de drogas capazes de alcançar os sítios prioritários de infecção.

Entre as ferramentas usadas para o estudo das alterações morfológicas no SNC durante a infecção com *T. cruzi*, a análise histopatológica foi a mais utilizada já que é um método simples, rápido e econômico. Esta análise permite o estudo de grandes seções da amostra de tecido e, fornece uma importante ferramenta de diagnóstico que tem a capacidade de examinar a arquitetura interna das células e tecidos infectados (Mescher, 2016). Além disto, estudos histopatológicos permitem a identificação de respostas teciduais típicas que variam à medida que uma infecção progride das fases agudas para crônicas ou disseminadas (Gupta et al., 2009). Quando as alterações histológicas observadas em tecidos possuem relação relevante com as manifestações clínicas, estas características podem fornecer informações suficientes para identificar corretamente um tipo particular de microrganismo (Woods e Walker, 1996; Powers, 1998; Procop e Wilson, 2001).

Esta revisão é o primeiro estudo a compilar sistematicamente os resultados de trabalhos que descrevem as alterações provocadas por *T. cruzi* a nível de SNC. Portanto, nossos achados reforçam a importância de algumas análises determinantes nas primeiras etapas do diagnóstico da doença de Chagas, como a carga parasitária, já

que em alguns casos os parasitos circundantes podem não ser detectados, porém, podem estar causando dano progressivo a órgãos, como coração, esôfago e cólon (Gironès e Fresno, 2003; Teixeira et al., 2006). Esta correlação negativa se deve a aspectos determinantes da doença de Chagas como o genótipo e a cepa infectante de *T. cruzi* bem como a imunogenética do hospedeiro (Costa et al., 2009), que ditariam os parâmetros preditivos finais. Sendo assim, os mecanismos de persistência do parasito e a qualidade da resposta imune, podem determinar a extensão do dano tecidual (Gutierrez et al., 2009). Baseado nisso, descrevemos neste trabalho, os órgãos ou tecidos que podem estar sofrendo algum tipo de alteração e qual o tipo de alteração, o que auxilia em uma descrição precisa do quadro clínico associado à doença. Apesar deste trabalho ter avaliado somente modelos animais e que estes não necessariamente refletem com precisão a doença humana, é notório que este estudo aborda questões clinicamente relevantes, incluindo tropismo de tecidos, sintomas, resposta imune e, farmacocinética/farmacodinâmica humana (Chatelain e Konar, 2015), podendo assim, ter seus resultados extrapolados a pacientes chagásicos humanos.

O processo de seleção dos trabalhos foi baseado nas práticas amplamente recomendadas e aceitas para a realização das revisões sistemáticas. Uma questão relevante destacada em nosso estudo está relacionada ao viés da publicação. Para isto utilizamos o Guia ARRIVE, que permitiu testar o grau de confiabilidade dos estudos individualmente e posteriormente de forma coletiva. Após esta análise percebemos que aspectos relativos à organização e descrição dos experimentos foram negligenciados, entre eles podemos citar, a falta de randomização e ausência de estudos duplo-cego, principalmente em trabalhos com mais de 15 anos. Acreditamos que isto demonstra o baixo rigor metodológico dos estudos no início das pesquisas com *T. cruzi*. Por isto, realizar um estudo de revisão sistemática sobre este assunto é extremamente importante porque mostra os pontos que devem ser corrigidos em estudos futuros, para que não haja comprometimento na reprodução das técnicas e na qualidade dos resultados apresentados nos estudos da área.

Em conclusão, nossa revisão sistemática conseguiu compilar trabalhos que avaliaram alterações histopatológicas no SNC durante a infecção com *T. cruzi*, onde evidenciamos o tropismo diferencial dos genótipos TcI, TcII e TcIV e TcVI por estruturas do cérebro, cerebelo e medula espinal. Alterações como a intensidade dos focos inflamatórios e o número de ninhos de parasitos estão vinculados à diversidade

genética das diferentes cepas de *T. cruzi*, origem geográfica e, ciclos de transmissão silvestre e doméstico das cepas. Finalmente destacamos como o conhecimento minucioso sobre os diversos quadros clínicos que podem acontecer durante a doença de Chagas são determinantes não só, no conhecimento da doença, mas também, como facilitador do diagnóstico precoce e eficiente. Sendo assim, a administração de um tratamento adequado, poderá garantir uma boa qualidade de vida dos indivíduos acometidos com a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- Abolis, N. G., De Araujo, S. M., de Ornelas Toledo, M. J., Fernandez, M. A., and Gomes, M. L. (2011). *Trypanosoma cruzi* I–III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta tropica*, 120(3), 167-172.
- Antinori, S., Galimberti, L., Bianco, R., Grande, R., Galli, M., and Corbellino, M. (2017). Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *European Journal of Internal Medicine*, 43, 6-15.
- Andrade, L. O., Galvão, L., Meirelles, M. D. N. S., Chiari, E., Pena, S. D., and Macedo, A. M. (2010). Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6), 834-837.
- Andrade, L. O., Machado, C. R., Chiari, E., Pena, S. D., and Macedo, A. M. (1999). Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and biochemical parasitology*, 100(2), 163-172.
- Andrade, L. O., Machado, C. R., Chiari, E., Pena, S. D., and Macedo, A. M. (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Experimental parasitology*, 100(4), 269-275.
- Andrade, S. G., Filho, A. C., De Souza, A. J. M., De Lima, E. S., and Andrade, Z. A. (1997). Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *International journal of experimental pathology*, 78(6), 391-399.
- Añez, N., Crisante, G., and Soriano, P. J. (2009). *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in wild bats. *Acta tropica*, 109(1), 78-80.
- Añez, N., Crisante, G., Silva, F. M. D., Rojas, A., Carrasco, H., Umezawa, E. S., Stolf, A. M. S., Ramírez, J. L., and Teixeira, M. M. G. (2004). Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Tropical Medicine & International Health*, 9(12), 1319-1326.

Annex, A. (1999). Recommendations from a satellite meeting. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 94(s1), 429-432.

Banks, W. A. (2009). The blood–brain barrier in psychoneuroimmunology. *Immunology and Allergy Clinics*, 29(2), 223-228.

Bombeiro, A. L., Gonçalves, L. A., Penha-Gonçalves, C., Marinho, C. R. F., Lima, M. R. D. I., Chadi, G., and Álvarez, J. M. (2012). IL-12p40 deficiency leads to uncontrolled *Trypanosoma cruzi* dissemination in the spinal cord resulting in neuronal death and motor dysfunction. *PloS one*, 7(11), 1-11.

Botero, L. A., Mejía, A. M., and Triana, O. (2007). Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomédica*, 27, 64-74.

Brisse, S., Dujardin, J. C., and Tibayrenc, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 111(1), 95-105.

Bryan, L. K., Hamer, S. A., Shaw, S., Curtis-Robles, R., Auckland, L. D., Hodo, C. L., Chaffin, K., and Rech, R. R. (2016). Chagas disease in a Texan horse with neurologic deficits. *Veterinary parasitology*, 216, 13-17.

Buckner, F. S., Wilson, A. J., and Van Voorhis, W. C. (1999). Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for β -galactosidase. *Infection and Immunity*, 67(1), 403-409.

Caradonna, K., and PereiraPerrin, M. (2009). Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, 77(4), 1349-1356.

Castro-Sesquen, Y. E., Gilman, R. H., Yauri, V., Angulo, N., Verastegui, M., Velásquez, D. E., Sterling, C. R., Martin, D., and Bern, C. (2011). *Cavia porcellus* as a model for experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of pathology*, 179(1), 281-288.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218.

Chatelain, E., and Konar, N. (2015). Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug design, development and therapy*, 9, 4807-4823.

Chizzolini, C., and Brembilla, N. C. (2009). Prostaglandin E2: igniting the fire. *Immunology and Cell Biology*, 87, 510– 511.

Costa, G. C., da Costa Rocha, M. O., Moreira, P. R., Menezes, A. S., Silva, M. R., Gollob, K. J., and Dutra, W. O. (2009). Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *The Journal of infectious diseases*, 199(3), 451-454.

Coura, J. R., and Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465(n7301_suppl), S6-S7.

De Diego, J. A., Palau, M. T., Gamallo, C., and Penin, P. (1998). Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine & International Health*, 3(3), 222-233.

De Diego, J. A., Penin, P., Del Rey, J., Mayer, R., and Gamallo, C. (1991). A comparative pathological study of three strains of *Trypanosoma cruzi* in an experimental model. *Histology and Histopathology Journal*, 6, 199-206.

De Freitas, J. M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J. R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, V. F., Teixeira, S. M., Chiari, E., Junqueira, A. C. V., Fernandes, O., Macedo, A. M., Machado, C. R., and Pena, S. D. J. (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS pathogens*, 2(3), 0226-0235.

de Queiroz, A. C., and Castro Filho, B. G. (1985). The choroid plexus in experimental Chagas infection in mice. *Acta medica portuguesa*, 6(6), 181-182.

De Scorza, C., Urdaneta-Morales, S., and Sampson-Ward, L. (1989). Urban *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: pathology in white mice of isolates from *Panstrongylus geniculatus*. *Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale*, 69, 283-9.

Di Noia, J. M., Buscaglia, C. A., De Marchi, C. R., Almeida, I. C., and Frasch, A. C. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *Journal of Experimental Medicine*, 195(4), 401-413.

Dias, J. C. (2006) Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(4), 370-375.

Domingues, C. S., Hardoim, D. J., Souza, C. S. F., Cardoso, F. O., Mendes, V. G., Previtalli-Silva, H., Abreu-Silva, A. L., Pelajo-Machado, da Costa, M., S. C. G., and Calabrese, K. S. (2015). Oral outbreak of Chagas disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental evaluation of a patient's strain. *PLoS ONE*, 10(10), 1-18.

Engelhardt, B., and Ransohoff, R. M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in immunology*, 26(9), 485-495.

Freitas, J. M., Lages-Silva, E., Crema, E., Pena, S. D. J., and Macedo, A. M. (2005). Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *International journal for parasitology*, 35(4), 411-417.

Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V. H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends in immunology*, 28(1), 12-18.

Gironès, N., and Fresno, M. (2003). Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?. *Trends in parasitology*, 19(1), 19-22.

- Guarner, J., Bartlett, J., Zaki, S. R., Colley, D. G., Grijalva, M. J., and Powell, M. R. (2001). Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(2), 152-158.
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., and Matías-Guiu, J. (2015). Astroцитos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*, 30(2), 119-129.
- Gupta, E., Bhalla, P., Khurana, N., and Singh, T. (2009). Histopathology for the diagnosis of infectious diseases. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(2), 100-106.
- Gutierrez, F. R., Mineo, T. W., Pavanelli, W. R., Guedes, P. M., and Silva, J. S. (2009). The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 236-245.
- Hanson, W. L., and Roberson, E. L. (1974). Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infections of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 21(4), 512-517.
- Herrera, L. (2010). Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50(1), 3-15.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., and Kelley, R. O. (2003). *Basic histology: text & atlas* (Vol. 11). New York: McGraw-Hill.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373-384.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., and Altman, D. G. (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *British journal of pharmacology*, 160(7), 1577-1579.
- Konsman, J. P., Vignes, S., Mackerlova, L., Bristow, A., and Blomqvist, A. (2004). Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: Relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *Journal of Comparative Neurology*, 472(1), 113-129.
- Kuhn, R. E., Vaughn, R. T., and Iannuzzi, N. P. (1974). The in vivo distribution of ⁵¹Cr-labeled *Trypanosoma cruzi* in mice. *International journal for parasitology*, 4(6), 585-588.
- Lana, M and Tafure, W. L. (2011). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: D. P. Neves., A. L. De Melo., P. M. Linardi., R. W. A. Vitor (Eds), *Parasitologia humana* (pp. 89–114). São Paulo, Brazil: Atheneu.
- León, C. M., Montilla, M., Vanegas, R., Castillo, M., Parra, E., and Ramírez, J. D. (2017). Murine models susceptibility to distinct *Trypanosoma cruzi* I genotypes infection. *Parasitology*, 144(4), 512-519.

- Lisboa, C. V., das Chagas Xavier, S. C., Herrera, H. M., and Jansen, A. M. (2009). The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Veterinary parasitology*, 165(1-2), 19-24.
- Macedo, A. M., Machado, C. R., Oliveira, R. P., and Pena, S. D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(1), 1-12.
- Macedo, A. M., and Pena, S. D. J. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today*, 14(3), 119-124.
- Magalhães-Santos, I. F., Souza, M. M., Lima, C. S. C., and Andrade, S. G. (2004). Infection of *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) with strains of different *Trypanosoma cruzi* biotopes: pathogenicity, histotropism, and fibrosis induction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(4), 407-413.
- Manoel-Caetano, F. D. S., and Silva, A. E. (2007). Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(10), 2263-2274.
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., and Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 115(9), 1109-1123.
- Márquez, E., Crespo, M., Mir, M., Pérez-Sáez, M. J., Quintana, S., Barbosa, F., and Pascual, J. (2013). Chagas' disease and kidney donation. *Nefrología*, 33(1), 128-33.
- Masocha, W., and Kristensson, K. (2012). Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence*, 3(2), 202-212.
- Meca, J. S. (2010). Cómo realizar una revisión sistemática y un meta-análisis. *Aula abierta*, 38(2), 53-64.
- Meinl, E., Aloisi, F., Ertl, B., Weber, F., Malefyt, R. D. W., Wekerle, H., and Hohlfield, R. (1994). Multiple sclerosis Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. *Brain*, 117(6), 1323-1332.
- Mescher, A. L. (2016). *Junqueira's basic histology: text and atlas*. New York, USA: Mcgraw-hill.
- Messenger, L. A., Miles, M. A., and Bern, C. (2015). Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. Expert review of anti-infective therapy, 13(8), 995-1029.
- Meza, S. K. L., Kaneshima, E. N., de Oliveira Silva, S., Gabriel, M., de Araújo, S. M., Gomes, M. L., Monteiro, W. M., Barbosa, M. G. V., and de Ornelas Toledo, M. J. (2014). Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Experimental parasitology*, 146, 34-42.
- Michailowsky, V., Silva, N. M., Rocha, C. D., Vieira, L. Q., Lannes-Vieira, J., and Gazzinelli, R. T. (2001). Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system

during *Trypanosoma cruzi* infection. The American journal of pathology, 159(5), 1723-1733.

Minning, T. A., Weatherly, D. B., Flibotte, S., and Tarleton, R. L. (2011). Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in *Trypanosoma cruzi* strains revealed by array comparative genomic hybridization. BMC genomics, 12(1), 139.

Mirkin, G. A., Jones, M., Sanz, O. P., Rey, R., Sica, R. E., and Cappa, S. U. G. (1994). Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. Clinical immunology and immunopathology, 73(1), 69-79.

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., and Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. Annals of internal medicine, 151(4), 264-269.

Molina, H. A., Cardoni, R. L., and Rimoldi, M. T. (1987). The neuromuscular pathology of experimental Chagas' disease. Journal of the neurological sciences, 81(2-3), 287-300.

Monteiro, W. M., Magalhães, L. K. C., Oliveira, J. C., Guerra, J. A. D. O., Silveira, H., Ferreira, L. C. D. L., Toledo, M. J. O. and Barbosa, M. D. G. V. (2012). Biological behavior of *Trypanosoma cruzi* stocks obtained from the State of Amazonas, Western Brazilian Amazon, in mice. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 45(2), 209-214.

Montenegro, V. M., Jiménez, M., Dias, J. C., e Zeledón, R. (2002). Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97(4), 491-494.

Moraes-Souza, H., and Ferreira-Silva, M. M. (2011). Control of transfusional transmission. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44, 64-67.

Mora, G. (2016). Chagas cardiomyopathy. E-Journal of Cardiology Practice - European Society of Cardiology, 14(31).

Morocoima, A., Socorro, G., Ávila, R., Hernández, A., Merchán, S., Ortiz, D., Primavera, G., Chique, J., Herrera, L., and Urdaneta-Morales, S. (2012). *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism in the central nervous system of albino mice. Parasitology research, 111(5), 2099-2107.

Nisimura, L. M., Estado, V., De Souza, E. M., Reis, P. A., Lessa, M. A., Castro-Faria-Neto, H. C., Pereira, M. C. S., Tibiriçá, E., and Garzoni, L. R. (2014). Acute Chagas disease induces cerebral microvasculopathy in mice. PLoS neglected tropical diseases, 8(7), 1-9.

Oliveira, N. K., Ferreira, R. N., Lopes, S. D. N., Chiari, E., Camargos, E. R. D. S., and Martinelli, P. M. (2017). Cardiac autonomic denervation and expression of neurotrophins (NGF and BDNF) and their receptors during experimental Chagas disease. Growth Factors, 35(4-5), 161-170.

- Pereira, R. M., Greco, G. M., Moreira, A. M., Chagas, P. F., Caldas, I. S., Goncalves, R. V., & Novaes, R. D. (2017). Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: a systematic review of preclinical in vivo evidence. *Parasitology*, 144(10), 1275-1287.
- Pérez, A. R., Silva-Barbosa, S. D., Berbert, L. R., Revelli, S., Beloscar, J., Savino, W., and Bottasso, O. (2011). Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. *Journal of neuroimmunology*, 235(1), 84-90.
- Pittella, J. E. H. (2013). Pathology of CNS parasitic infections. *Handbook of clinical neurology Elsevier*, 114, 65-88.
- Porta, M. (Ed.). (2008). *A dictionary of epidemiology*. Oxford university press. New York.
- Powers, C. N. (1998). Diagnosis of infectious diseases: A cytopathologist's perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 341-65.
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, 1(2), 92-100.
- Procop, G. W., and Wilson, M. (2001). Infectious disease pathology. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 1589-601.
- Prost, J. O., Morikone, A. M., Polo, G., and Bosch, A. M. (2000). Evidence of cerebral involvement in the chronic stage of Chagas disease obtained using the P300 potential and quantified electroencephalography. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 58(2A), 262-271.
- Quan, N., Whiteside, M., and Herkenham, M. (1998). Time course and localization patterns of interleukin-1 β messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience*, 83(1), 281-293.
- Rassi Jr, A., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402.
- Rocha, A., de Meneses, A. C. O., De Meneses, O., da Silva, A. M., Ferreira, M. S., Nishioka, S. A., Burgarelli, M. K. N., Almeida, E., Turcato, G. J., Metze, K., and Lopes, E. R. (1994). Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(3), 261-268.
- Rocha, F. L., Roque, A. L. R., de Lima, J. S., Cheida, C. C., Lemos, F. G., de Azevedo, F. C., Arrais, R. C., Bilac, D., Herrera, H. M., Mourão, G, and Jansen, A. M. (2013). *Trypanosoma cruzi* infection in neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. *Plos one*, 8(7), e67463.
- Roffê, E., Silva, A. A., Marino, A. P. M., dos Santos, P. V., and Lannes-Vieira, J. (2003). Essential role of VLA-4/VCAM-1 pathway in the establishment of CD8+ T-cell-mediated *Trypanosoma cruzi*-elicited meningoencephalitis. *Journal of neuroimmunology*, 142(1), 17-30.

Schiltz, J. C., and Sawchenko, P. E. (2002). Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *Journal of Neuroscience*, 22(13), 5606-5618.

Shikanai-Yasuda, M. A., and Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845–52.

Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 75–85.

Silva, A. A. D., Pereira, G. V., Souza, A. S. D., Silva, R. R., Rocha, M. S., and Lannes-Vieira, J. (2010). *Trypanosoma cruzi*-induced central nervous system alterations: from the entry of inflammatory cells to potential cognitive and psychiatric abnormalities. *Journal of Neuropathology*, 1, 1-13.

Silva, A. A., Roffe, E., and Lannes-Vieira, J. (1999b). Expression of extracellular matrix components and their receptors in the central nervous system during experimental *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* infection. *Brazilian journal of medical and biological research*, 32(5), 593-600.

Silva, A. A., Roffê, E., Marino, A. P., dos Santos, P. V., Quirico-Santos, T., Paiva, C. N., and Lannes-Vieira, J. (1999a). Chagas' disease encephalitis: intense CD8+ lymphocytic infiltrate is restricted to the acute phase, but is not related to the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clinical Immunology*, 92(1), 56-66.

Silva, A. A., Roffê, E., Santiago, H., Marino, A. P., Kroll-Palhares, K., Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T., and Lannes-Vieira, J. (2007). *Trypanosoma cruzi*-triggered meningoencephalitis is a CCR1/CCR5-independent inflammatory process. *Journal of neuroimmunology*, 184(1), 156-163.

Snary, D., Flint, J. E., Wood, J. N., Scott, M. T., Chapman, M. D., Dodd, J., Jessell, T. M., and Miles, M. A. (1983). A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and glia. *Clinical and experimental immunology*, 54(3), 617-624.

Storino, R. (1998). Enfermedad de Chagas. In B. Mautner., D. Agranatti., B. Boskis., L. O. Carreras., J. H. Casabe., C. E. Cerini., E. Gabe., E. P. Gurfinkel., J. A. Mazzei., L. D. Suarez., and N. Wainsztein. (Eds.), *Medicina* (pp. 774-783). Buenos Aires, Argentina: Centro Editor Fundación Favaloro.

Storino, R., and Milei, J. (1994). Introducción. In, R. Storino., and R. Milei J. (Eds.), *Enfermedad de Chagas* (pp. 1-7). Buenos Aires, Argentina: Mosby-Doyma Argentina.

Storino, R., Jörg, M., and Auger, S. (2003). Atención médica del paciente chagásico. *Manual Práctico, un enfoque biológico, antropológico y social*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Ediprof,

Tanowitz, H. B., Davies, P., and Wittner, M. (1983). Alterations in acetylcholine receptors in experimental Chagas' disease. *Journal of Infectious Diseases*, 147(3), 460-466.

Tanowitz, H. B., Davies, P., Factor, S. M., Minase, T., Herskowitz, A., and Wittner, M. (1981). *Trypanosoma cruzi*: choline acetyltransferase activity in tissues of susceptible and resistant mice infected with the Brazil strain. *Experimental parasitology*, 51(2), 269-278.

Teixeira, A. R., Nascimento, R. J., and Sturm, N. R. (2006). Evolution and pathology in Chagas disease: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(5), 463-491.

Tekiel, V. S., Mirkin, G. A., and Cappa, S. G. (1997). Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 115(5), 495-502.

Tekiel, V., Oliveira, G. C., Correa-Oliveira, R., Sánchez, D., and González-Cappa, S. M. (2005). Chagas' disease: TCRBV9 over-representation and sequence oligoclonality in the fine specificity of T lymphocytes in target tissues of damage. *Acta tropica*, 94(1), 15-24.

Trajkovic, V., Vuckovic, O., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, D., Popadic, D., Markovic, M., Bumbasirevic, V., Backovic, A., Cvetkovic, I., Harhaji, L., Ramic, Z., and Stojkovic, M. M. (2004). Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia*, 47(2), 168-179.

Tréz, T. D. A. E. (2010). Animal experimentation and scientific knowledge: a thought style?. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46, 633-642.

Tyler, K. M., and Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472-481.

Vago, A. R., Andrade, L. O., Leite, A. A., Reis, D. D. Á., Macedo, A. M., Adad, S. J., Tostes, S. J., Moreira, M. C. V., Filho, G. B., and Pena, S. D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *The American journal of pathology*, 156(5), 1805-1809.

Vilar-Pereira, G., da Silva, A. A., Pereira, I. R., Silva, R. R., Moreira, O. C., de Almeida, L. R., de Souza, A. S., Rocha, M. S., and Lannes-Vieira, J. (2012). *Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. *Brain, behavior, and immunity*, 26(7), 1136-1149.

Vitkovic, L., Konsman, J. P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., and Jacque, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. *Molecular psychiatry*, 5(6), 604-615.

WHO. World Health Organization. (2017, November 8). Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology. Retrieved from <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>.

Yauri, V., Castro-Sesquen, Y. E., Verastegui, M., Angulo, N., Recuenco, F., Cabello, I., Malaga, E., Bern, C., Gavidia, C. M. and Gilman, R. H. (2016). Domestic pig (*Sus scrofa*) as an animal model for experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94(5), 1020-1027.

Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sánchez, H., Adamson, S., Miles, G. A., López, E., González, N., Patterson, J. S., Gaunt, M. W., Arias, A. R., and Miles, M. A. (2005). Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International journal for parasitology*, 35(2), 225-233.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., A. G. Schijman., M. S. Llewellyn., E. Lages-Silva., C. R. Machado., S. G. Andrade., and N. R. Sturm. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240-253.

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., and Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature neuroscience*, 9(2), 268-275.

Zoltowski, A. P. C., Costa, A. B., Teixeira, M. A. P., and Koller, S. H. (2014). Qualidade metodológica das revisões sistemáticas em periódicos de psicologia brasileiros. *Psicologia: teoria e Pesquisa*, 30(1), 97-104.

Tabela S1. Estratégia de busca completa com filtros de busca e número de estudos recuperados nas bases de dados PubMed-Medline e Scopus.

<i>PubMed-MEDLINE – Search filters</i>	<i>Retrieved records</i>
<p>#1 Trypanosomiasis: ("chagas disease"[MeSH Terms] OR "trypanosomiasis, african"[MeSH Terms] OR "trypanosomiasis"[MeSH Terms] OR "trypanosoma"[MeSH Terms] OR "Trypanosoma cruzi"[MeSH Terms] OR "African sleeping sickness"[MeSH Terms] OR "African sleeping sicknesses"[MeSH Terms] OR "Trypanosoma brucei"[MeSH Terms] OR "Trypanosoma gambiense"[MeSH Terms] OR "Trypanosoma rhodesiense"[MeSH Terms] OR "African trypanosomiasis"[MeSH Terms] OR "chagas disease"[TIAB] OR "trypanosomiasis, african"[TIAB] OR "Trypanosomiasis"[TIAB] OR "Trypanosoma"[TIAB]) OR "American trypanosomiasis"[TIAB] OR "Trypanosoma cruzi"[TIAB] OR "African sleeping sickness"[TIAB] OR "African sleeping sicknesses"[TIAB] OR "Trypanosoma brucei"[TIAB] OR "Trypanosoma gambiense"[TIAB] OR "Trypanosoma rhodesiense"[TIAB] OR "African trypanosomiasis"[TIAB])</p>	37556
<p>#2 Nervous system ("nervous system"[MeSH Terms] OR "central nervous system"[MeSH Terms] OR "peripheral nervous system"[MeSH Terms] OR "brain"[MeSH Terms] OR "spinal cord"[MeSH Terms] OR "nerve fibers"[MeSH Terms] OR "neurons"[MeSH Terms] OR "axons"[MeSH Terms] OR "dendrites"[MeSH Terms] OR "neuroglia"[MeSH Terms] OR "ependymogial cells"[MeSH Terms] OR "autonomic nervous system"[MeSH Terms] OR "autonomic pathways"[MeSH Terms] OR "enteric nervous system"[MeSH Terms] OR "ganglia, autonomic"[MeSH Terms] OR "parasympathetic nervous system"[MeSH Terms] OR "sympathetic nervous system"[MeSH Terms] OR "nervous system"[TIAB] OR "central nervous system"[TIAB] OR "peripheral nervous system"[TIAB] OR "brain"[TIAB] OR "spinal cord"[TIAB] OR "nerve fibers"[TIAB] OR "neurons"[TIAB] OR "axons"[TIAB] OR "dendrites"[TIAB] OR "neuroglia"[TIAB] OR glial cells[TIAB] OR "ependymogial cells"[TIAB] OR Ependymogial Cells[TIAB] OR "autonomic nervous system"[TIAB] OR "autonomic pathways"[TIAB] OR "enteric nervous system"[TIAB] OR "ganglia, autonomic"[TIAB] OR "parasympathetic nervous system"[TIAB] OR "sympathetic nervous system"[TIAB])</p>	2273122
<p>#3 Mammals filter: ("mammals"[MeSH Terms] OR "opossums"[MeSH Terms] OR "insectivora"[MeSH Terms] OR "marsupialia"[MeSH Terms] OR "monotremata"[MeSH Terms] OR "dogs"[MeSH Terms] OR "cats"[MeSH Terms] OR "cattle"[MeSH Terms] OR "livestock"[MeSH Terms] OR "goats"[MeSH Terms] OR "sheep, domestic"[MeSH Terms] OR "horses"[MeSH Terms] OR "ruminants"[MeSH Terms] OR "shrews"[MeSH Terms] OR "arvicolinae"[MeSH Terms] OR "elephants"[MeSH Terms] OR "hyraxes"[MeSH Terms] OR "trichechus"[MeSH Terms] OR "proboscidea mammal"[MeSH Terms] OR "sirenia"[MeSH Terms] OR "sloths"[MeSH Terms] OR "xenarthra"[MeSH Terms] OR "armadillos"[MeSH Terms] OR "tupaiidae"[MeSH Terms] OR "scandentia"[MeSH Terms] OR "lemur"[MeSH Terms] OR</p>	1719135

<p>"primates"[MeSH Terms] OR "hominidae"[MeSH Terms] OR "pongo"[MeSH Terms] OR "pan troglodytes"[MeSH Terms] OR "pan paniscus"[MeSH Terms] OR "gorilla gorilla"[MeSH Terms] OR "haplorhini"[MeSH Terms] OR "hares"[MeSH Terms] OR "lagomorpha"[MeSH Terms] OR "rabbits"[MeSH Terms] OR "rodentia"[MeSH Terms] OR "mice"[MeSH Terms] OR "rats"[MeSH Terms] OR "moles"[MeSH Terms] OR "hedgehogs"[MeSH Terms] OR "whales"[MeSH Terms] OR "cetacea"[MeSH Terms] OR "dolphins"[MeSH Terms] OR "artiodactyla"[MeSH Terms] OR "swine"[MeSH Terms] OR "camels"[MeSH Terms] OR "giraffes"[MeSH Terms] OR "deer"[MeSH Terms] OR "antelopes"[MeSH Terms] OR "equidae"[MeSH Terms] OR "perissodactyla"[MeSH Terms] OR "chiroptera"[MeSH Terms] OR "carnivora"[MeSH Terms] OR "ursidae"[MeSH Terms] OR "procyonidae"[MeSH Terms] OR "raccoons"[MeSH Terms] OR "mephitidae"[MeSH Terms] OR "mustelidae"[MeSH Terms] OR "pinnipedia"[MeSH Terms] OR "strepsirhini"[MeSH Terms] OR "hylobatidae"[MeSH Terms] OR "cricetinae"[MeSH Terms] OR "mammals"[TIAB] OR "opossums"[TIAB] OR "insectivora"[TIAB] OR "marsupialia"[TIAB] OR "monotremata"[TIAB] OR "dogs"[TIAB] OR "cats"[TIAB] OR "cattle"[TIAB] OR "livestock"[TIAB] OR "goats"[TIAB] OR "sheep, domestic"[TIAB] OR "horses"[TIAB] OR "ruminants"[TIAB] OR "shrews"[TIAB] OR "arvicolinae"[TIAB] OR "elephants"[TIAB] OR "hyraxes"[TIAB] OR "trichechus"[TIAB] OR "proboscidea mammal"[TIAB] OR "sirenia"[TIAB] OR "sloths"[TIAB] OR "xenarthra"[TIAB] OR "armadillos"[TIAB] OR "tupaiidae"[TIAB] OR "scandentia"[TIAB] OR "lemur"[TIAB] OR "primates"[TIAB] OR "hominidae"[TIAB] OR "pongo"[TIAB] OR "pan troglodytes"[TIAB] OR "pan paniscus"[TIAB] OR "gorilla gorilla"[TIAB] OR "haplorhini"[TIAB] OR "hares"[TIAB] OR "lagomorpha"[TIAB] OR "rabbits"[TIAB] OR "rodentia"[TIAB] OR "mice"[TIAB] OR "rats"[TIAB] OR "moles"[TIAB] OR "hedgehogs"[TIAB] OR "whales"[TIAB] OR "cetacea"[TIAB] OR "dolphins"[TIAB] OR "artiodactyla"[TIAB] OR "swine"[TIAB] OR "camels"[TIAB] OR "giraffes"[TIAB] OR "deer"[TIAB] OR "antelopes"[TIAB] OR "equidae"[TIAB] OR "perissodactyla"[TIAB] OR "chiroptera"[TIAB] OR "carnivora"[TIAB] OR "ursidae"[TIAB] OR "procyonidae"[TIAB] OR "raccoons"[TIAB] OR "mephitidae"[TIAB] OR "mustelidae"[TIAB] OR "pinnipedia"[TIAB] OR "strepsirhini"[TIAB] OR "hylobatidae"[TIAB] OR "cricetinae"[TIAB] OR "pig"[TIAB] OR "bat"[TIAB] OR "monkey"[TIAB] OR "bitch"[TIAB] OR "hamster"[TIAB] OR "coati"[TIAB])</p>	
<p>Combined search: (#1 AND #2 AND #3)</p>	<p>388</p>
<p>SCOPUS – Search filters</p>	<p>Retrieved records</p>
<p>#1 Nervous system (TITLE-ABS-KEY("nervous system") OR TITLE-ABS-KEY("central nervous system") OR TITLE-ABS-KEY("peripheral nervous system") OR TITLE-ABS-KEY("brain") OR TITLE-ABS-KEY("spinal cord") OR TITLE-ABS-KEY("nerve fibers") OR TITLE-ABS-KEY("neurons") OR TITLE-ABS-KEY("axons") OR TITLE-ABS-KEY("dendrites") OR TITLE-ABS-KEY("neuroglia") OR TITLE-ABS-KEY("ependymoglia cells") OR TITLE-ABS-KEY("autonomic nervous system") OR TITLE-ABS-KEY("autonomic pathways") OR TITLE-ABS-KEY("enteric</p>	<p>3075367</p>

nervous system”) OR TITLE-ABS-KEY(“ganglia, autonomic”) OR TITLE-ABS-KEY(“parasympathetic nervous system”) OR TITLE-ABS-KEY(“sympathetic nervous system”))	
#2 Trypanosomiasis (TITLE-ABS-KEY("chagas disease") OR TITLE-ABS-KEY("trypanosomiasis, african") OR TITLE-ABS-KEY("trypanosomiasis") OR TITLE-ABS-KEY("trypanosoma") OR TITLE-ABS-KEY(“Trypanosoma cruzi”) OR TITLE-ABS-KEY(“African sleeping sickness”) OR TITLE-ABS-KEY(“African sleeping sicknesses”) OR TITLE-ABS-KEY(“Trypanosoma brucei”) OR TITLE-ABS-KEY(“Trypanosoma gambiense”) OR TITLE-ABS-KEY(“Trypanosoma rhodesiense”) OR TITLE-ABS-KEY(“African trypanosomiasis”))	46528
Combined search: #1 AND #2	2310
<i>Search limits: animals [limit to]</i>	737