

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIELLE SILVA DOS SANTOS

Órgãos alvo do *Trypanosoma cruzi* em modelo experimental de fase aguda da doença de Chagas por transmissão oral.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadoras: Dr^a. Juliana de Meis
Dr^a. Déa Maria Serra Villa Verde

RIO DE JANEIRO

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S237 Santos, Danielle Silva dos

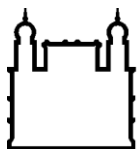
Órgãos alvo do *Trypanosoma cruzi* em modelo experimental de fase aguda da doença de Chagas por transmissão oral / Danielle Silva dos Santos. – Rio de Janeiro, 2016.
xi, 66 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 60-66

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Infecção oral. 3. Bioluminescência. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIELLE SILVA DOS SANTOS

Órgãos alvo do *Trypanosoma cruzi* em modelo experimental de fase aguda da doença de Chagas por transmissão oral.

ORIENTADORAS: Dr^a. Juliana de Meis
Dr^a. Déa Maria Serra Villa Verde

Aprovada em: 03 /06/ 2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr José Rodrigues Coura (Presidente)
Prof. Dr^a. Mirian Claudia de Souza Pereira
Prof. Dr^a. Adriane Regina Todeschini
Prof. Dr. Alexandre Morrot Lima (Suplente)
Prof. Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro (Revisora e suplente)

Rio de Janeiro, 03 de Junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus pela minha vida e pelo amparo e conforto nos momentos difíceis da caminhada, pela força e perseverança para continuar.

A todos da minha família que sempre me apoiaram e ajudaram.

Principalmente aos meus pais, Ely e Georgina, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, acreditando em mim e investindo no meu futuro.

Ao Hebert, meu marido e amigo, que me aguentou durante os momentos de tensão, pelo suporte emocional e por me entender nos momentos de dificuldade.

À minha irmã, Graziela e meu padrasto, Arthur obrigada pela força.

A todos do grupo de Chagas, Juliana Barreto, Luiz, Bárbara, Mariana, Rejane, Dina, Alessandro e Désio, pelo companheirismo, ajuda, críticas e sugestões.

À Bárbara Guerra e a equipe do CENABIO- UFRJ pelo auxílio e colaboração nos experimentos de bioluminescência.

Ao Otacílio pela dedicação e colaboração nos experimentos de qPCR

Ao Alexandre Morrot e à Constança por terem cedido espaço nos seus laboratórios para realização dos experimentos A Mariana Waghbi e Christina Henriques por terem gentilmente cedido o *T.cruzi* transgênico DM28c Luciferase e Dm28c GFP

À Luciana Garzoni pelas idéias e sugestões no trabalho de bioluminescência

Ao Savino e Vinícius pelas críticas e sugestões no desenvolvimento do trabalho

A todos do LPT pelas discussões científicas que muito contribuíram para meu amadurecimento profissional e pelos momentos de descontração.

Em especial às minhas orientadoras, Juliana e Déa, pela oportunidade de fazer parte deste grupo, pela atenção e dedicação a este trabalho. Agradeço também pela liberdade de criação e pelas ajudas experimentais

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	vii
ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.1.1 Epidemiologia e distribuição geográfica mundial.....	1
1.1.2 Ecologia: o <i>T. cruzi</i> , reservatório e vetores.....	3
1.1.3 Mecanismo de transmissão e manifestações clínicas da doença de Chagas.....	5
1.1.3.1 Transmissão do <i>T. cruzi</i> por via vetorial clássica.....	6
1.1.3.2 Transmissão do <i>T. cruzi</i> por via oral.....	7
1.1.3.3 Transmissão do <i>T. cruzi</i> por transfusão sanguínea.....	10
1.1.3.4 Transmissão do <i>T. cruzi</i> por via vertical ou congênita.....	12
1.1.3.5 Transmissão do <i>T. cruzi</i> por transplante de órgãos.....	13
1.1.4 Mecanismos de infecção e impactos na patogenia da doença de Chagas.....	14
1.2 Bioluminescência.....	16
1.2.1 Técnica de imagem de bioluminescência (<i>bioluminescence imaging</i> - BLI).....	16
1.2.2 Aplicações da bioluminescência para o estudo das doenças infecciosas.....	18
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	20
2.1. Justificativa.....	20
2.2. Objetivo geral.....	20
2.3. Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Animais.....	22
3.2. Parasito e infecções.....	22
3.3. Parasitemia.....	22
3.4. Análise <i>in vitro</i> da bioluminescência da cepa Dm28c-luc.....	23

3.5. Obtenção de imagem por bioluminescência <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> em camundongos infectados.....	23
3.6. Microscopia de fluorescência.....	24
3.7. Extração do DNA.....	24
3.8. PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR).....	25
3.9. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Análise <i>in vitro</i> da emissão de bioluminescência pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> da cepa Dm28c geneticamente modificada para expressar o gene da luciferase.....	27
4.2. Parasitemia dos camundongos infectados pela via oral com <i>T. cruzi</i> da cepa Dm28c-luc.....	28
4.3. Análise <i>in vivo</i> por imagem de bioluminescência dos camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> por via oral com 15 e 60 min pós-infecção.....	29
4.4. Análise <i>ex vivo</i> por imagem de bioluminescência dos órgãos e tecidos dos camundongos infectados por via oral com 15 e 60 min e 48h pós-infecção.....	31
4.5. Análise <i>in vivo</i> por imagem de bioluminescência da distribuição do <i>Trypanosoma cruzi</i> em camundongos infectados por via oral com 7, 14 e 21 dpi.....	34
4.6. Análise <i>ex vivo</i> por imagem de bioluminescência dos órgãos e tecidos de camundongos infectados por via oral com 7 e 21 dpi.....	36
4.7. Quantificação da carga parasitária nos tecidos alvo por PCR em tempo real quantitativa após infecção oral pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
4.8. Análise da distribuição do <i>T. cruzi</i> ao longo da fase aguda da infecção oral, intragástrica, intravenosa e subcutânea.....	44
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribuição geográfica da Doença de Chagas no mundo com base em estimativas oficiais e dados da transmissão vetorial (2006-2009).....	2
Figura 1.2. Representação esquemática da reação de bioluminescência e da aquisição de imagem.....	17
Figura 4.1. Bioluminescência das formas tripomastigotas da cepa Dm28c-luc do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 4.2. Parasitemia dos camundongos infectados por via oral com a cepa Dm28c-luc do <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figura 4.3. Imagem <i>in vivo</i> de bioluminescência dos camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> pela via oral com 15 e 60 min pós-infecção.....	30
Figura 4.4. Imagem <i>ex vivo</i> de bioluminescência dos órgãos e tecidos dos camundongos infectados por via oral com 15 e 60 min e 48h pós-infecção.....	32
Figura 4.5. Imagem <i>in vivo</i> de bioluminescência da disseminação do <i>T. cruzi</i> na infecção oral da doença de Chagas com 7, 14 e 21 dpi.....	36
Figura 4.6. Imagens <i>ex vivo</i> de bioluminescência dos tecidos e órgãos de camundongos infectados pela via oral com 7 e 21dpi.....	39
Figura 4.7. Microscopia de fluorescência da cavidade nasal de camundongos infectados com Dm28c-GFP.....	40
Figura 4.8. Quantificação da carga parasitária do <i>T. cruzi</i> em tecidos de camundongos infectados oralmente.....	42
Figura 4.9. Quantificação da carga parasitária em tecidos de camundongos infectados oralmente com <i>T. cruzi</i>	43
Figura 4.10. Imagem <i>in vivo</i> de bioluminescência de camundongo infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> por via oral, intragástrica, subcutânea e intravenosa durante a infecção aguda.....	46
Figura 4.11. Imagem <i>ex vivo</i> de bioluminescência representativas dos órgãos e tecidos dos camundongos infectados por via oral, intragástrica, subcutânea e intravenosa com 21dpi.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Tecidos de mamíferos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	5
Tabela 3.1. Sequência dos <i>primers</i> e sondas.....	26
Tabela 4.1. Percentual de infectividade.....	29
Tabela 4.2 Porcentagem de órgãos e tecidos que apresentaram sinal de bioluminescência.....	34
Tabela 4.3. Frequência de órgãos infectados pelo <i>T. cruzi</i> analisados por bioluminescência e qPCR.....	44

ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina Trifosfato

AMP - Adenosina Monofosfato

BLI – Técnica de imagem de bioluminescência (*Bioluminescence Imaging*)

BENEFIT - Avaliação do Benzonidazol para Interrupção da Tripanosomíase (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*)

CCD - Dispositivo de carga acoplada (*Charge-Coupled Device*)

DALY - Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (*Disability Adjusted Life of Years*)

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

Dpi - Dias pós-infecção

DTUs - Unidades Discretas de Tipagem

ELISA - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

f - Fótons

GFP- proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*)

HE - Hematoxilina e eosina

HIV - Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)

IAC- controle interno de amplificação (*Intenal amplification control*)

IG - Infecção intragástrica

IO - Infecção oral

SC - Infecção Subcutânea

IV - Infecção intravenosa

µL - Microlitro

mg - Miligrama

Mg²⁺ - Magnésio divalente

min - Minutos

nM - Nanomolar

NALT - Tecido linfóide nasal associado (*Nasal-associated lymphoid tissue*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

RNA_m - Ácido Ribonucleico mensageiro (*Messenger Ribonucleic Acid*)

s - segundos

SFB - Soro bovino fetal

TcI- *T. cruzi* I

TcII- *T. cruzi* II

TcVI- *T. cruzi* VI

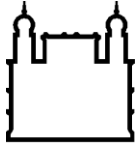
WT- camundongo selvagem (*wild type*)

VERO - Célula epitelial de Rim de Macaco Verde

SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

% - Porcentagem



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

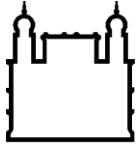
ÓRGÃOS ALVO DO *TRYPANOSOMA CRUZI* EM MODELO EXPERIMENTAL DE FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS POR TRANSMISSÃO ORAL.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Danielle Silva dos Santos

A infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é a principal via transmissão na Amazônia. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o contato do parasito com a cavidade oral induz uma infecção aguda mais grave. No entanto, ainda permanece incerto o primeiro tecido alvo do parasito durante o processo de infecção oral (**IO**). Neste trabalho, avaliamos os órgãos alvos do *T. cruzi* em camundongos infectados por **IO** com a cepa Dm28c luciferase (Dm28c-luc) por imagem de bioluminescência (BLI) e PCR em tempo real quantitativa (qPCR). Além disso, comparamos a dinâmica de distribuição do *T. cruzi* durante a infecção por via **IO** com as vias intragástrica (**IG**), intravenosa (**IV**) e subcutânea (**SC**). Nossas análises demonstraram que a cavidade oral, especificamente a região nasomaxilar, e a fossa nasal são os principais locais de invasão e multiplicação do *T. cruzi* na **IO**, em contraste com as outras vias de inoculação estudadas. A quantificação do DNA do *T. cruzi* por qPCR, com 60min e 7 dias pós-infecção (dpi), demonstrou que a carga parasitária na cavidade nasal nos animais **IO** era maior do que em qualquer outro tecido avaliado. Com 7 dpi também detectamos DNA do parasito nos linfonodos mandibulares, hipófise, coração, fígado, estômago, intestino delgado e no baço e, com 21 dpi em novos tecidos como cérebro e intestino grosso. Da mesma forma, detectamos a presença de amastigotas na fossa nasal de animais infectados com 6dpi. Com 21 dpi, após multiplicação e disseminação do parasito, detectamos por BLI a presença do *T. cruzi* em tecidos como cérebro, coração, intestinos, glândulas sexuais, dentre outros. A análise por BLI indica que nos momentos iniciais da infecção a dinâmica de distribuição do parasito é diferente entre as vias **IO**, **IG**, **IV** e **SC**. Em conjunto, nossos resultados demonstram claramente que a fossa nasal é o principal local de invasão e multiplicação do *T. cruzi* durante processos de infecção oral. Demonstramos ainda que a infecção oral favorece o tropismo do parasito para o sistema nervoso central.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TRYPANOSOMA CRUZI TARGET ORGANS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE PHASE OF CHAGAS DISEASE BY ORAL TRANSMISSION.

ABSTRACT

Teses de doutorado

Danielle Silva dos Santos

Oral infection by *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, is the main route of transmission in the Amazon. Previous studies from our group showed that the contact of the parasite with the oral cavity induces a more severe acute disease in mice. However, it remains uncertain the first target tissue of the parasite during the oral infection process (**OI**). In this study, we evaluated *T. cruzi* target organs in mice infected by **OI** with Dm28c luciferase strain (Dm28c-luc) by bioluminescence imaging (BLI) and quantitative real-time PCR (qPCR). Furthermore, we compared the dynamic distribution of *T. cruzi* during **OI** with intragastric (**IG**), intravenous (**IV**) and subcutaneous (**SC**) infection. Our analyses have shown that the oral cavity, specifically nasomaxillary region, and nasal cavity are the main sites of *T. cruzi* invasion and multiplication in **OI**, in contrast with the other routes of inoculation studied. Quantification of *T. cruzi* DNA by qPCR with 60min and 7 dpi, demonstrated that parasitic load of the nasal cavity in **OI** animals was higher than any other tissue evaluated. At 7 dpi, we also detected DNA of the parasite in the mandibular lymph nodes, pituitary gland, heart, liver, stomach, small intestine and spleen, and at 21 dpi in new tissues, such as brain and intestine. Amastigote nests were detected in the nasal region at 6 dpi. At 21 dpi, after multiplication and spreading of the parasite, we detected by BLI, presence of *T. cruzi* in tissues, such as, brain, heart, intestines, sex glands, among others. The BLI analysis indicates that in the initial stages of infection the parasite distribution dynamics is different between the **OI**, **IG**, **IV** and **SC** routes. Taken together, our results clearly demonstrate that nasal cavity is the primary site of invasion and multiplication of *T. cruzi* during oral infection process. We also showed that oral infection favors the tropism of parasite to the central nervous system.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças de Chagas

1.1.1 Epidemiologia e distribuição geográfica

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma infecção parasitária causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* (Ordem Kinetoplastida – Família - Trypanosomatidae). Essa doença foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas e ainda hoje não existem vacinas e esquemas terapêuticos que ajam em todas as etapas da doença (Bermudez *et al.*, 2015, Messenger *et al.*, 2015, Parker and Sethi, 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente nas áreas endêmicas dos países latino-americanos, onde cerca de 13% da população residente, aproximadamente 70 milhões de pessoas, encontra-se em risco de contrair a doença (OMS, 2016). (Figura 1.1). Considerada como uma doença tropical negligenciada, a doença de Chagas continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública nesses países, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10.000 mortes por ano (OMS, 2015). De acordo com as estimativas realizadas em 2010, cerca de 5,7 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* em 21 países latino-americanos, sendo a Argentina, o Brasil e o México os países com o maior número estimado de pessoas infectadas (aproximadamente 1,5 milhões, 1.2 milhões e 876 mil, respectivamente), seguido pela Bolívia (aproximadamente 607 mil) (OMS, 2015).

Nas últimas décadas, a doença de Chagas vem sendo detectada fora da América Latina em países não endêmicos, como Canadá, Austrália, Japão e países da Europa, devido à mobilidade da população latino-americana para esses países (Figura 1.1). Nos Estados Unidos, estima-se que 300 mil pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi*, sendo a maioria imigrantes latino-americanos que foram infectados em seus países de origem. Vale ressaltar que nos estados do sul dos Estados Unidos, ocorre transmissão enzoótica envolvendo vetores infectados e hospedeiros mamíferos, como guaxinins, gambás e cães domésticos (Bern, 2015, Bern and Montgomery, 2009, Coura and Vinas, 2010). Nos últimos anos, a América Latina tem feito grandes progressos no controle da doença de Chagas. Apresentando uma diminuição no número estimado de pessoas infectadas de 20 milhões em 1981 para 10 milhões em 2009. Os principais fatores que contribuíram para esta diminuição foram: o aumento na prevenção e controle da transmissão vetorial e transfusional, programas de melhorias nas infraestruturas das casas e da educação da população em risco. Outro fator importante foi a interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor doméstico, o *Triatoma infestans*, em vários países da América do Sul, como Chile, Uruguai, Brasil, em cinco províncias da

Argentina e na região oriental do Paraguai. No Brasil, houve uma grande redução do número de *T. infestans*, porém ainda existem pequenos focos residuais nos estados do Rio Grande do Sul e na Bahia. Atualmente, a triagem sorológica para o *T. cruzi* é realizada na maioria dos bancos de sangue nos países endêmicos da América Latina e nos Estados Unidos (Coura, 2015, Coura and Dias, 2009, OMS, 2010, Parker and Sethi, 2011, Rassi *et al.*, 2012). No entanto, a doença de Chagas continua como uma das doenças parasitárias mais importantes na região das Américas, com uma carga de doença (medida pelo DALY- Disability Adjusted Life of Years) de 7,5 vezes maior que da malária (Bern, 2015). Além disso, os custos globais da doença de Chagas, estimados em relação ao tratamento, redução da produtividade do trabalhador, incapacidade prematura e morte, podem chegar a aproximadamente 7 bilhões de dólares por ano (Lee *et al.*, 2013).

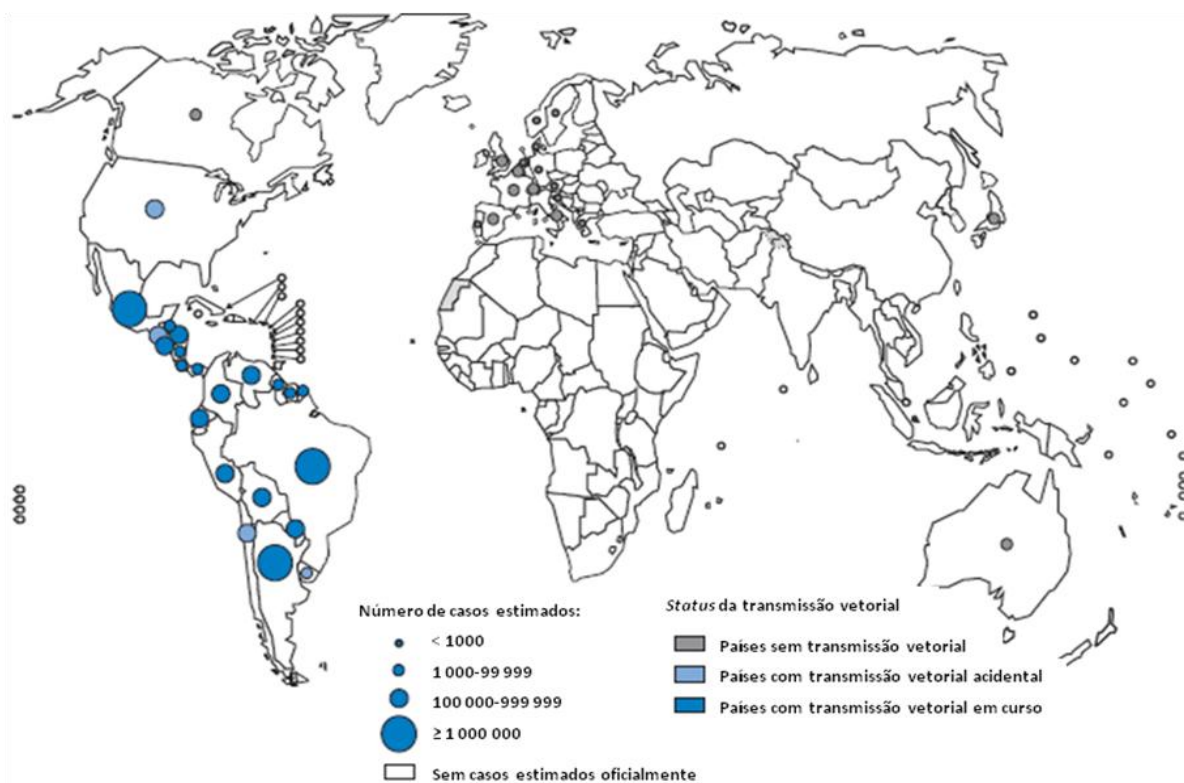


Figura 1.1. Distribuição geográfica da doença de Chagas no mundo com base em estimativas oficiais e dados da transmissão vetorial (2006-2009). Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*. A endemicidade é observada principalmente na América Latina, sendo que o aumento do número de casos nos países mais desenvolvidos ocorre devido ao elevado número de imigrantes latino-americanos. O tamanho do círculo indica o número de casos estimados e a cor representa o *status* da transmissão vetorial, em que círculos com cor cinza indicam países com casos de doença de Chagas onde não ocorre a transmissão vetorial, com a cor azul claro países com transmissão vetorial acidental, com cor azul escuro países com transmissão vetorial em curso, em branco são países sem casos estimados oficialmente (adaptado de OMS, 2010).

O tratamento da doença de Chagas continua o mesmo desde 1970, sendo o nifurtimox e o benzonidazol as únicas drogas tripanossomicidas disponíveis com eficácia comprovada contra o *T. cruzi* (de Andrade *et al.*, 1996, Viotti *et al.*, 2006). O benzonidazol é a primeira droga de escolha por apresentar melhor eficácia e maior segurança do que o nifurtimox (Rassi *et al.*, 2012). O tratamento é indicado para todos os pacientes com infecção aguda, infecção congênita, no início da infecção crônica e em casos de reativação da infecção por tratamento com imunossupressores ou por co-infecção com HIV (OMS, 2015). O tratamento com benzonidazol ou nifurtimox na infecção aguda reduz a gravidade dos sintomas, encurta o curso clínico e a duração da parasitemia detectável e impede as manifestações crônicas. A cura parasitológica é relatada em 60-85% dos pacientes tratados nesta fase (Bern, 2011, Rassi *et al.*, 2012). Embora os benefícios da terapia tripanossomicida sejam claros na fase aguda da doença, na fase crônica não se observam melhoras nas manifestações clínicas (Marin-Neto *et al.*, 2007, Morillo *et al.*, 2015). O projeto BENEFIT (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis), estudo clínico do tratamento do benzonidazol em pacientes (com idade entre 18-75 anos) com cardiopatia chagásica crônica (sem lesões graves), demonstrou que os pacientes que receberam o tratamento com benzonidazol apresentaram redução significativa na detecção dos parasitos circulantes no soro, porém não houve diminuição na progressão das manifestações cardíacas nos 5 anos de acompanhamento do estudo. Estes dados ressaltam a necessidade do desenvolvimento de novas drogas e estratégias de tratamento mais eficazes para todas as fases da doença, com o mínimo possível de efeitos colaterais (Morillo *et al.*, 2015).

1.1.2 Ecologia: *T. cruzi*, reservatório e vetores.

A doença de Chagas é essencialmente uma doença vetorial, sendo transmitida em grande parte por insetos vetores da família Reduviidae, pertencentes a subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiro. Existem mais de 140 espécies de triatomíneos como potenciais vetores para o *T. cruzi*, porém poucos são importantes do ponto de vista epidemiológico. Os três principais gêneros envolvidos na transmissão do *T. cruzi* ao homem são: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. Além dos seres humanos, a doença de Chagas pode ser transmitida a mais de 100 espécies de mamíferos domésticos (como cães, gatos e porquinhos da índia) e selvagens (como roedores, marsupiais e tatus) (Coura, 2015, Coura and Junqueira, 2015, Parker and Sethi, 2011, Rassi *et al.*, 2010).

Entre os tripanosomatídeos, o *T. cruzi* apresenta um dos ciclos biológicos mais complexos, que envolvem diversos estágios de desenvolvimento encontrados nos hospedeiros invertebrados e vertebrados. No hospedeiro invertebrado, a infecção se inicia quando formas

tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado são ingeridas durante o repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas se diferenciam em epimastigotas, que se multiplicam sucessivamente por divisão binária no intestino médio. Em seguida, as formas epimastigotas migram para a porção final do trato digestivo e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o hospedeiro vertebrado, e são eliminadas juntamente com as fezes ou com a urina durante o repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas metacíclicas liberadas nas fezes podem infectar diretamente o hospedeiro vertebrado por meio do contato com a lesão na pele proveniente da picada ou com outras superfícies vulneráveis, como conjuntiva ocular, ou indiretamente através da contaminação de alimentos e bebidas que podem se ingeridas pelo hospedeiro (Bern, 2015, Coura, 2015, de Souza *et al.*, 2010, Rassi *et al.*, 2010).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas têm a capacidade de infectar uma grande variedade de células nucleadas presentes na região da infecção, incluindo macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. A interação do parasito com a célula do hospedeiro vertebrado envolve uma grande variedade de moléculas presentes no hospedeiro e no parasito, como mucinas, transialidases e glicoproteína gp82, entre outras, sendo fundamental para a adesão e a internalização do parasito na célula hospedeira (Barrias *et al.*, 2013, Burleigh and Woolsey, 2002, de Souza *et al.*, 2010, Tanowitz *et al.*, 2009). Durante a internalização do parasito ocorre a formação do vacúolo parasitóforo que se funde com o lisossoma. A acidificação lisossomal do vacúolo parasitóforo é importante para a ativação de mecanismos que levam ao rompimento do vacúolo e permitam que o parasito escape para o citoplasma, além de contribuir para a diferenciação do tripomastigota em amastigota no citoplasma. A forma amastigota replica-se por divisão binária duplicando-se no citoplasma. Posteriormente, antes de romper a célula hospedeira, a forma amastigota diferencia-se em tripomastigota sanguínea, forma infectante para o inseto vetor e outras células do hospedeiro. O tempo de multiplicação, diferenciação e saída do parasito da célula podem variar conforme a cepa e as células infectadas (Barrias *et al.*, 2013, Bern, 2015, Cardoso *et al.*, 2015). Os tripomastigotas sanguíneos liberados ao alcançarem a corrente sanguínea e o sistema linfático podem infectar uma grande variedade de células do hospedeiro se disseminando por diversos órgãos e tecidos (Tabela 1.1) (de Meis *et al.*, 2013)

Tabela 1.1. Tecidos de mamíferos infectados pelo *T. cruzi*

Tecidos alvos	Humano		Animal	
	Agudo	Crônico	Agudo	Crônico
Tecido adiposo	ND	(Ferreira <i>et al.</i> , 2011).	(Andrade and Silva, 1995, Buckner <i>et al.</i> , 1999, Combs <i>et al.</i> , 2005, Guarner <i>et al.</i> , 2001),	(Combs <i>et al.</i> , 2005, Guarner <i>et al.</i> , 2001)
Hipófise	ND	ND	(Buckner <i>et al.</i> , 1999, Correa-de-Santana <i>et al.</i> , 2006).	ND
Sistema nervoso central	(Mortara <i>et al.</i> , 1999).	(Mortara <i>et al.</i> , 1999).	(Andrade <i>et al.</i> , 1999, Buckner <i>et al.</i> , 1999, Guarner <i>et al.</i> , 2001, Rachid <i>et al.</i> , 2010)	(Andrade <i>et al.</i> , 1999, Guarner <i>et al.</i> , 2001)
Esôfago	(Mortara <i>et al.</i> , 1999).	(Vago <i>et al.</i> , 1996)	(Andrade <i>et al.</i> , 1999, Guarner <i>et al.</i> , 2001).	(Andrade <i>et al.</i> , 1999).
Estômago	ND	ND	(Cortez <i>et al.</i> , 2003, Guarner <i>et al.</i> , 2001, Hoft <i>et al.</i> , 1996, Staquicini <i>et al.</i> , 2010)	(Guarner <i>et al.</i> , 2001)
Intestino	ND	ND	(Andrade <i>et al.</i> , 1999, Buckner <i>et al.</i> , 1999)	(Andrade <i>et al.</i> , 1999).
Coração	(Mortara <i>et al.</i> , 1999)	(Mortara <i>et al.</i> , 1999, Schijman <i>et al.</i> , 2004, Vago <i>et al.</i> , 1996)	(Andrade <i>et al.</i> , 1999, Buckner <i>et al.</i> , 1999, Castro-Sesquen <i>et al.</i> , 2013, Combs <i>et al.</i> , 2005, Guarner <i>et al.</i> , 2001)	(Castro-Sesquen <i>et al.</i> , 2013, Combs <i>et al.</i> , 2005, Guarner <i>et al.</i> , 2001)
Baço	ND	ND	(Buckner <i>et al.</i> , 1999, Giddings <i>et al.</i> , 2006, Guarner <i>et al.</i> , 2001, Hoft <i>et al.</i> , 1996, Combs <i>et al.</i> , 2005)	(Combs <i>et al.</i> , 2005, Guarner <i>et al.</i> , 2001)
Fígado	(Silva <i>et al.</i>)	ND	(Buckner <i>et al.</i> , 1999, Guarner <i>et al.</i> , 2001, Hoft <i>et al.</i> , 1996)	ND
Pulmão	(Mortara <i>et al.</i> , 1999).	ND	(Guarner <i>et al.</i> , 2001)	(Guarner <i>et al.</i> , 2001)
Linfonodo	ND	ND	(Giddings <i>et al.</i> , 2006, Guarner <i>et al.</i> , 2001, Hoft <i>et al.</i> , 1996)	(Guarner <i>et al.</i> , 2001)
Pele	(Mortara <i>et al.</i> , 1999).	(Mortara <i>et al.</i> , 1999).	ND	ND
Cavidade nasal	ND	ND	(Giddings <i>et al.</i> , 2006)	ND

ND= não detectado (adaptado de De Meis *et al.*, 2013)

1.1.3 Mecanismo de transmissão e manifestações clínicas da doença de Chagas

Uma das principais razões para a persistência da doença de Chagas é a dificuldade em controlar o parasito e sua disseminação global, já que apresenta uma variedade de possíveis mecanismos de transmissão. Além da transmissão pela via vetorial clássica o *T. cruzi* também pode ser transmitido por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, bem como pelas vias congênita e oral, através da ingestão de alimentos contaminados com o parasito (Coura, 2007, de Noya, 2015). Outra via considerada hipotética, é a transmissão por via sexual, sendo recomendada a prevenção ou abstinência sexual em indivíduos com alta parasitemia (em fase aguda ou imunossuprimidos) (Coura *et al.*, 2007, Dias *et al.*, 2011).

1.1.3.1 Transmissão do *T. cruzi* por via vetorial clássica

Nos últimos anos, a América Latina vem apresentando progressos no controle da transmissão da doença de Chagas por via vetorial, devido às medidas eficazes tomadas para o controle do vetor (Toso *et al.*, 2011). De acordo com as estimativas feitas em 2010, a Bolívia teve o maior número de casos novos por ano da transmissão vetorial (± 8 mil), seguida pelo México (± 6 mil) e Colômbia (± 5 mil). No Brasil estima-se a ocorrência de aproximadamente 46 novos casos por ano (OMS, 2015). Entre 2000 e 2013, apenas 6,4% dos casos de infecção aguda registrados no Brasil foram decorrentes da transmissão vetorial. Atualmente, os casos de infecção vetorial predominantes no Brasil são de pacientes em fase crônica decorrentes de transmissão em anos anteriores (Ministério da Saúde, 2015).

A transmissão por via vetorial clássica ocorre quando tripamostigotas metacíclicos liberados nas fezes, após o repasto sanguíneo do vetor, infectam o hospedeiro vertebrado, através do contato com a lesão na pele proveniente da picada ou com outras superfícies vulneráveis, como conjuntiva ocular. Além disso, no local de inoculação cutânea do parasito pode ocorrer uma reação inflamatória local, com uma lesão semelhante a um furúnculo, conhecida como chagoma de inoculação. Se a inoculação ocorrer através da mucosa conjuntival, o paciente desenvolve rapidamente um edema bipalpebral unilateral, conhecido como sinal de Romana, e linfadenopatia regional (Coura, 2007, Rassi *et al.*, 2010).

A doença de Chagas possui duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase aguda dura de 4 a 8 semanas, sendo assintomática na maioria dos indivíduos infectados, apenas 1 em cada 30 indivíduos infectados apresentam sintomas. O período de incubação é de 4-15 dias. Quando sintomático as manifestações clínicas são: febre prolongada, mal-estar, anorexia, náuseas, vômitos e diarreia. Em casos mais graves, o paciente pode apresentar hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, edema, anormalidades no eletrocardiograma ou cardiomegalia na radiografia de tórax e, em casos raros, podem desenvolver miocardite ou meningoencefalite. A miocardite e a meningoencefalite severa são relatadas em 5% a 10% dos casos e na sua maioria em recém-nascidos, lactantes e indivíduos mais velhos (Parker and Sethi, 2011, Rassi *et al.*, 2010, Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). A taxa de mortalidade é de <5-10% em pacientes sintomáticos na fase aguda, estando relacionada a complicações mais graves como miocardite e meningoencefalite. A taxa de mortalidade estimada, incluindo pacientes não sintomáticos é ainda menor, sendo de um em cada 200 a 400 indivíduos infectados nessa fase (Rassi *et al.*, 2010). Após a fase aguda, a doença torna-se assintomática e latente por um período entre 10 a 20 anos, podendo ou não evoluir para a fase crônica. Aproximadamente 40 a 30% dos indivíduos infectados evoluem para uma fase crônica

sintomática e passam a apresentar morbidades como cardiomiopatia, megacólon, megaesôfago e alterações no sistema nervoso. Em geral, esses pacientes possuem uma expectativa de vida reduzida em 9 anos. A cardiomiopatia chagásica crônica pode gerar cardiomegalia, arritmias, falência cardíaca e morte (Messenger *et al.*, 2015, Parker and Sethi, 2011, Rassi *et al.*, 2012).

1.1.3.2 Transmissão do *T. cruzi* por via oral

O primeiro caso relatado da transmissão oral do *T. cruzi* foi em 1965, no Rio Grande do Sul e, desde então, os surtos têm sido descritos em vários estados brasileiros, como Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Pará, Paraíba, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Também foram descritos surtos em outros países da América latina como Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa, Bolívia, Argentina e Equador (da Silva *et al.*, 1968, Sanchez and Ramirez, 2013, Toso *et al.*, 2011). Embora subestimada, a transmissão oral da doença de Chagas foi responsável por mais de 1081 casos, sendo 812 casos, somente no estado do Pará no Brasil (2000-2013) (Ministério da Saúde, 2015); 369 casos na Venezuela (2007-2009); 45 casos na Colômbia (2008-2010); 14 casos na Bolívia (2010), e também foi relatada na Argentina e no Equador (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015, Toso *et al.*, 2011). No Brasil, a proporção de doentes infectados por esta via aumentou significativamente nos últimos anos. Entre os casos agudos de doença de Chagas confirmados no período de 2000 a 2013, a transmissão oral foi a mais frequente em todos os anos, chegando a 70% dos casos notificados. No período de 2005 a 2013, foram contabilizados 112 surtos no território nacional, sendo a região Norte a que apresentou maior número de casos registrados no País (91,1%) (Saúde, 2015). A transmissão por via oral da doença de Chagas ocorre com a ingestão de alimentos contaminados com as fezes ou o com próprio triatomíneo contaminado com o *T. cruzi*. No Brasil, esses focos de infecção têm sido associados com a ingestão de açaí, sopas com condimentos *in natura*, água ou caldo de cana. Na Colômbia e Venezuela, os surtos têm sido relacionados com sucos de goiaba, laranja ou tangerina. Outra forma já descrita de contaminação do alimento ocorre através do contato com as secreções das glândulas anais de marsupiais infectados, as quais apresentam formas tripomastigotas metacíclicas. A infecção por via oral também pode ocorrer através da ingestão de carne ou sangue de animais de caça infectados crus ou mal cozidos. O risco de transmissão por via oral através da amamentação ainda não foi claramente estabelecida. Apesar de confirmada experimentalmente em camundongos e de serem encontrados tripomastigotas no leite materno, a infecção por esta via em humanos não foi bem estabelecida (Dias, 2006, Norman and Lopez-Velez, 2013, Toso *et al.*, 2011).

Os componentes envolvidos na infecção pelo *T. cruzi* por via oral vêm sendo elucidados em modelos experimentais, tendo sido demonstrado que a entrada do parasito no mamífero pode ocorrer através da mucosa gástrica. As formas tripomastigotas do *T. cruzi* quando ingeridas são capazes de invadir as células do epitélio gástrico, processo que envolve a interação de uma glicoproteína de membrana estágio-específica (gp82 e gp30) da forma tripomastigota metacíclica com a mucina presente na superfície das células epiteliais da mucosa gástrica (Hoft *et al.*, 1996, Staquicini *et al.*, 2010). Hoft e colaboradores demonstraram que, após infecção de camundongos por via oral do *T. cruzi* cepa Tulahuén, era possível observar 4 dias pós-infecção, infiltrado inflamatório misto (células mono e polimorfonucleares) e raros ninhos de amastigotas na mucosa superficial do epitélio gástrico. Após 14 dias de infecção observou com mais evidência a presença do parasito na mucosa gástrica e um infiltrado inflamatório mais intenso com predomínio de células mononucleares na submucosa e na camada muscular adjacente. Além disso, foi observada hipertrofia e presença de parasitos nos linfonodos adjacentes e infiltrado inflamatório em diversos órgãos (pâncreas, baço, fígado, medula óssea, coração, duodeno, adrenal, cérebro e/ou músculo esquelético) (Hoft *et al.*, 1996). O fato de não ter sido detectada a presença de parasitos, após a inoculação oral, na orofaringe e no esôfago, mas sim no estômago, sugeriu que a mucosa gástrica fosse a principal porta de entrada do parasito na infecção oral (Hoft *et al.*, 1996, Staquicini *et al.*, 2010, Yoshida, 2009).

Estudos de interação parasito-hospedeiro vêm demonstrando que a gp82 e gp30 ligam-se às células hospedeiras em um mecanismo mediado por receptor, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular, tanto no parasito quanto na célula, levando à mobilização de Ca^{+2} intracelular que é essencial para a internalização do parasito na célula (Staquicini *et al.*, 2010, Yoshida, 2009, Yoshida *et al.*, 2011). No entanto, a gp30 possui menor afinidade pela mucina gástrica quando comparado à gp82, portanto *T. cruzi* que não possuem gp82, como observados nos isolados de humanos 569 e 588, mesmo expressando gp30, são menos infectivas (Cortez *et al.*, 2003). A gp82 é resistente ao suco gástrico, foi demonstrado que parasitos submetidos às condições do meio gástrico *in vivo* ou *in vitro*, quando tratados com pepsina em pH ácido, permanecem com gp82 intacta e funcional (Cortez *et al.*, 2012, Cortez *et al.*, 2006). A gp90, outra glicoproteína estágio-específica, presente nos tripomastigotas metacíclicos, também se liga aos receptores nas células hospedeiras, mas não induz aumento de Ca^{2+} intracelular, promovendo um efeito negativo na invasão. Portanto, cepas que expressam baixos níveis dessa molécula, possuem maior infectividade (Malaga and Yoshida, 2001).

As manifestações clínicas na fase aguda da doença de Chagas transmitida por via oral parecem ser mais intensas do que se observa nas formas tradicionais da infecção. Os pacientes

infectados pela via oral apresentam febre de longa duração, dor de cabeça, tosse, edema facial, edema palpebral, edema de membros inferiores, mialgia, dor abdominal, meningoencefalite e miocardite grave (Rueda *et al.*, 2014, Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012, Toso *et al.*, 2011). O período de incubação é de 3-22 dias e não se observam os sinais de porta de entrada como chagoma de inoculação ou sinal de Romaña. A febre de longa duração é um sintoma comum, ocorrendo com frequência (80-100% dos pacientes), sendo relatado em todos os surtos da infecção. O edema também é um dos sintomas mais frequentes ocorrendo principalmente na face (edema facial ou palpebral) sendo descrito em 57-70% dos casos, sendo relatado também em membros inferiores (24-57%) e de forma generalizada (3-14%)(de Noya, 2015, Pinto *et al.*, 2008, Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). Em um surto na Venezuela envolvendo cinco membros de uma mesma família foi observada a presença de edema de face na região da cavidade oral, com edema na parte interna das bochechas e inchaço e parestesia na língua em todos os pacientes (Añez *et al.*, 2013). Já os sintomas digestivos (dor abdominal, gastrite, hemorragia gastrointestinal e diarreia) são menos observados (de Noya, 2015). As alterações cardíacas também são um sinal frequente. As alterações no eletrocardiograma têm sido observadas em 50-100% dos casos (Bastos *et al.*, 2010, Marques *et al.*, 2013, Pinto *et al.*, 2008, Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991, Souza *et al.*, 2013). Souza e colaboradores analisaram o eletrocardiograma de 161 pacientes na fase aguda da infecção oral e observaram que 72% dos pacientes apresentavam alterações no eletrocardiograma (Souza *et al.*, 2013). Em outro estudo realizado na Venezuela com 103 pacientes na fase aguda da infecção oral, Marques e colaboradores observaram que 66% dos pacientes apresentaram alterações no eletrocardiograma, principalmente no segmento ST e onda T (37,86%), bem mais frequente do que relatado no estudo com transmissão vetorial clássica realizada por Parada e colaboradores, com 58 pacientes na fase aguda da infecção vetorial clássica, que observaram alterações no eletrocardiograma em 40% dos casos, com alteração no segmento ST e onda T em 4,4% dos casos (Marques *et al.*, 2013, Parada *et al.*, 1997).

A gravidade dos sintomas e a mortalidade variam, dependendo do tempo entre o início dos sintomas, o diagnóstico etiológico e o início do tratamento. No entanto, o que se tem observado é que a infecção oral tem uma alta taxa de mortalidade durante as primeiras semanas de infecção, estimado em 8-35%, maior que a da transmissão vetorial clássica. A mortalidade tem sido associada principalmente as manifestações cardíacas, como insuficiência cardíaca congestiva aguda e miocardite, e às manifestações neurológicas, como meningoencefalite. A alta na mortalidade também está associada à dificuldade em se ter um diagnóstico mais precoce, já que é difícil associar os sintomas com uma doença transmitida

pelo vetor. Nos casos em que a infecção aguda não é diagnosticada precocemente se observa uma forma mais severa da doença com presença de miocardite (Alarcon de Noya *et al.*, 2010, Bastos *et al.*, 2010, de Noya, 2015, Rassi *et al.*, 2010). No maior surto por infecção oral na Venezuela (103 pessoas infectadas), 75% dos pacientes diagnosticados apresentaram sintomas, sendo que 20% necessitaram ser hospitalizados, porém a taxa de mortalidade foi baixa sendo atribuída ao rápido diagnóstico e tratamento dos indivíduos afetados (Alarcon de Noya *et al.*, 2010).

1.1.3.3 Transmissão do *T. cruzi* por transfusão sanguínea

Em meados das décadas de 1970 e 1980, a transfusão sanguínea era um dos principais mecanismos de transmissão da doença de Chagas na América Latina. A alta prevalência de doadores com doença de Chagas nos bancos de sangue no Brasil (6,9%) e na América Latina (6,5%), associada à falta da triagem sorológica, fez com que a transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue fosse estimada em aproximadamente 6 a 10 mil novos casos por ano apenas no Brasil em meados de 1960 (Coura and Vinas, 2010, Moraes-Souza and Ferreira-Silva, 2011). Nos últimos 20 anos, com a implementação dos programas de controle da doença de Chagas promovidos pelos sistemas nacionais de saúde em países da América Latina e pela Organização Pan-Americana da Saúde, a triagem de doadores em bancos de sangue passou a ser obrigatória levando a uma redução significativa da transmissão por via transfusional. O índice de transmissão anual no Brasil passou de 20.000 para 13 casos em quatro décadas. Atualmente, 19 dos 21 países da América Latina apresentam 100% de triagem do sangue doado (Moraes-Souza and Ferreira-Silva, 2011, OMS, 2015, Wendel, 1998). No entanto, apesar dessa diminuição, a transmissão por transfusão sanguínea continua sendo um grande desafio. Nas últimas décadas, o número de pessoas infectadas com *T. cruzi* que vivem em países não endêmicos vem crescendo, devido ao aumento do fluxo migratório da população da América Latina para países da América do Norte, Europa, Japão e Austrália (Angheben *et al.*, 2015, Coura, 2015). Estima-se que existem mais de 300.000 pessoas infectadas com *T. cruzi* nos Estados Unidos, mais de 5.500 no Canadá, mais de 80.000 na Europa e na região do Pacífico, mais de 3000 no Japão e mais de 1.500 na Austrália. Casos de transmissão por transfusão sanguínea já foram relatados na Itália, Estados Unidos, Canadá e Espanha. Além disso, a identificação de um grande número de doadores positivos nos bancos de sangue levaram alguns países não endêmicos a realizarem triagens sorológicas nos bancos de sangue (Angheben *et al.*, 2015, Bern *et al.*, 2011, Coura and Vinas, 2010, Schmunis, 2007).

O risco de infecção da doença de Chagas após a transfusão de uma unidade de sangue de um doador infectado é de 10% a 20% e depende de vários fatores, como a concentração de parasitos no sangue do doador, o componente do sangue transfundido, a cepa do parasito, a quantidade de sangue transfundido, a capacidade infectante do parasito presente em cada componente do sangue, presença de parasitemia no momento da doação, o estado imunológico do destinatário e os testes de triagem. Com exceção do plasma liofilizado e derivados sangüíneos expostos a procedimentos industriais de esterilização, todos os componentes hemoterápicos são infectantes, porém o risco de transmissão tem sido relatado ser mais elevado para a transfusão de plaquetas do que para os outros componentes do sangue (Angheben *et al.*, 2015, Dias, 1997, Rassi *et al.*, 2012, Rassi *et al.*, 2010) .

Na fase aguda da doença de Chagas transfusional, as manifestações clínicas são semelhantes às encontradas pela transmissão pela via vetorial clássica com exceção dos sinais de porta de entrada, como chagoma de inoculação ou sinal de Romana, que não são observados. O período de incubação varia de 20 a 40 dias, porém períodos mais curtos (8 dias) e mais longos (120 dias) já foram descritos, sendo mais prolongado do que se observa na transmissão pela via vetorial clássica e oral. Cerca de 20% dos pacientes infectados são completamente assintomáticos, não levantando à suspeita da transmissão da doença por transfusão de sangue. A febre prolongada, não responsiva aos antibióticos, é o sintoma mais comum e às vezes é a única sintomatologia encontrada, acomete de 80 a 100% dos casos. A linfadenopatia e hepatoesplenomegalia também são sintomas frequentes, enquanto que a palidez cutânea, edema periorbital e perimaleolar, exantemas aparecem em menos de 50% dos casos. Pode ser observada a presença de distúrbios cardíacos, como alterações eletrocardiográficas, taquicardia ou redução da fração de ejeção, derrame pericárdico ou insuficiência cardíaca. Apesar de incomum, casos fatais podem ocorrer em casos mais graves, sendo geralmente associados a pacientes imunocomprometidos. O sistema nervoso central também pode ser afetado, sendo a sonolência, fadiga ou tremores os sintomas mais comuns. Mioclonia, convulsões, meningite e meningoencefalite podem ocorrer nos casos mais graves, mas são muito raros. As manifestações gastrointestinais na fase aguda são extremamente raras. Nos pacientes não tratados, pode ser observada uma recuperação espontânea da fase aguda em 6 a 8 semanas, que pode ser prorrogada por até 4 meses. Em seguida, a doença segue o seu curso normal para uma fase indeterminada, que pode persistir por anos ou décadas, representando a maioria dos casos, ou evoluir para estágios crônicos com alterações principalmente no coração, esôfago e cólon (Angheben *et al.*, 2015, Dias, 1997, Moraes-Souza and Ferreira-Silva, 2011, Wendel and Gonzaga, 1993).

1.1.3.4 Transmissão do *T. cruzi* por via congênita ou vertical

O risco de infecção por via congênita da doença de Chagas em crianças nascidas de mães infectadas em regiões endêmicas é de cerca 5%. O número de casos estimados por ano da transmissão congênita foi de 14.385 na América Latina, entre 66 a 638 nos Estados Unidos, e cerca de 20 a 183 na Europa. No Brasil, entre 2000 e 2013 foram registrados apenas 6 casos de transmissão congênita com prevalência no estado do Rio Grande do Sul (Cevallos and Hernandez, 2014, Saúde, 2015). A transmissão do parasito pode ocorrer através da placenta ou no momento do nascimento no canal do parto (Coura, 2015). A transmissão congênita deve ser considerada em todas as crianças nascidas de mães com sorologia positiva para o *T. cruzi*, sendo necessário para confirmação a identificação do parasito no sangue do recém-nascido ou sorologia positiva após os 6 meses de idade (Ministério da saúde, 2016). Existe uma grande variação na soroprevalência do *T. cruzi* entre as mulheres grávidas na América Latina, variando entre 0,7 e 70,5%, sendo maior na área rural da Bolívia (Oliveira *et al.*, 2010). Os recém-nascidos infectados geralmente são assintomáticos ou apresentam sintomas sutis, em trabalhos realizados no Brasil, Argentina, Chile e Paraguai, foi demonstrado que 60 a 90% das crianças com infecção congênita são assintomáticas, porém uma minoria pode desenvolver uma forma aguda grave com risco de vida. As manifestações clínicas da doença de Chagas congênita sintomática, incluem baixo peso ao nascer, nascimentos prematuros, índice de Apgar baixo, hepatoesplenomegalia, anemia e trombocitopenia. Os recém-nascidos severamente afetados podem apresentar meningoencefalite, anasarca, síndrome do desconforto respiratório e/ou pneumonite associado com o parasitismo da parede alveolar. A hepatoesplenomegalia e icterícia também são comuns. Em raras ocasiões, o trato digestivo e os olhos podem estar envolvidos. O megaesôfago e megacólon podem estar presentes ao nascimento ou no início da doença congênita. Quando o trato gastrointestinal está envolvido a doença congênita é grave e com elevada taxa de mortalidade. O envolvimento ocular, com coriorretinite e opacificação do corpo vítreo, também tem sido relatado. A mortalidade entre recém-nascidos infectados varia entre 5% a 20% dos casos. Além disso, a doença de Chagas congênita, mesmo nas formas mais graves, pode não ser diagnosticada, devido aos sinais e sintomas serem muito inespecíficos ou por não ser considerado uma possível infecção congênita doença de Chagas (Bern *et al.*, 2011, Cevallos and Hernandez, 2014, Dias *et al.*, 2011). A detecção precoce da infecção em recém-nascidos e o tratamento imediato reduzem significativamente a morbidade e a mortalidade. Uma vez que os recém-nascidos apresentam boa resposta ao tratamento específico (nifurtimox e benzonidazol), com cura acima de 90% e com poucos efeitos

colaterais, os pacientes tratados e avaliados ao longo dos anos vêm apresentando boa resposta terapêutica e nenhuma seqüela clínica da infecção (Dias *et al.*, 2011)

Segundo o Ministério da Saúde, a solicitação dos exames para detecção da doença de Chagas crônica deve ser realizada pelo ginecologista, baseado no histórico clínico e no local e condições da residência atual e passada da gestante (Ministério da Saúde 2016). Segundo a OMS, as triagens dos recém-nascidos de mães infectadas devem ser realizadas para fornecer o diagnóstico e tratamento precoce (OMS, 2016). A triagem da transmissão vertical da doença de Chagas pode ser feita por meio do exame de sangue no pré-natal da gestante e/ou através do exame na triagem neonatal (teste do pezinho). A gestante infectada deve ser acompanhada durante toda a gestação, sendo contra indicado nesta fase o tratamento. A doença de Chagas congênita é considerada aguda e, portanto, de notificação obrigatória (Ministério da Saúde, 2016).

1.1.3.5 Transmissão do *T. cruzi* por transplante de órgãos

A doença de Chagas pode ser transmitida através do transplante de órgãos ou tecidos de um doador infectado com *T. cruzi* para um receptor que não apresenta a doença. No entanto, nem todos os pacientes que recebem os órgãos de doadores infectados adquirem a doença. Em um estudo envolvendo o transplante renal de doadores infectados para 16 pacientes não infectados, observou-se que apenas 3 pacientes (19%) haviam adquirido a infecção por *T. cruzi*. Além do rim, alguns casos de transmissão da doença de Chagas já foram relatados por transplante de fígado e coração (Bern *et al.*, 2011, Riarte *et al.*, 1999). A infecção aguda da doença de Chagas em pacientes que receberam transplante de órgãos infectados apresenta algumas características distintas da infecção por via vetorial, incluindo um período de incubação prolongado e um espectro clínico mais grave (Bern, 2015). O período médio de incubação, conforme descrito em estudo com 15 pacientes transplantados, é de 112 dias, podendo ocorrer com 23 a 420 dias. As manifestações clínicas incluem febre, mal-estar, anorexia, hepatoesplenomegalia, miocardite aguda, e diminuição da função cardíaca. Nos casos mais graves observa-se uma miocardite fulminante e insuficiência cardíaca congestiva (Bern, 2015, Bern *et al.*, 2011).

Além disso, pode se observar a reativação doença de Chagas aguda em pacientes chagásicos crônicos que passaram por um processo de imunossupressão devido ao transplante de órgãos ou também em indivíduos imunocomprometidos co-infectados com *T. cruzi*, tais como os que têm infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV). As manifestações clínicas diferem da doença de Chagas aguda clássica e entre os pacientes transplantados e os co-infectados com HIV. Especificamente, a reativação da doença de Chagas em indivíduos

com HIV, causa uma meningoencefalite e lesões cerebrais. Por outro lado, os pacientes submetidos a transplante são mais propensos a desenvolver lesões cutâneas de morfologia variada, tais como, placas de celulite, nódulos e placas inflamatórias endurecidas, úlceras, escaras necróticas e paniculite. Em ambas as situações, os pacientes com reativação apresentam um quadro febril e podem desenvolver miocardite (Bern *et al.*, 2011, Parker and Sethi, 2011).

1.1.4 Mecanismos de infecção e impactos na patogenia da doença de Chagas

Durante a infecção do *T. cruzi*, a resposta imune é essencial na contenção da replicação do parasito, influenciando na resistência do hospedeiro, bem como na gravidade da doença, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção (Gutierrez *et al.*, 2009, Zhang and Tarleton, 1999). As células NK, macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como anticorpos produzidos pelos linfócitos B, têm participação crucial na geração de uma resposta imune efetiva. A depleção, inibição ou diminuição dessas células levam ao aumento da parasitemia e da mortalidade (Devera *et al.*, 2003, Melo and Machado, 2001, Pুনukollu *et al.*, 2007, Rottenberg *et al.*, 1988, Silva *et al.*, 1995, Tarleton, 2015, Tarleton *et al.*, 1994). Além disso, as citocinas desempenham papéis fundamentais na regulação da resposta imune, no qual, um balanço entre produção das citocinas do tipo T_H1, T_H2 e T_H17 é essencial para manter a homeostasia tecidual e gerar uma resposta imune efetiva (Bilate and Cunha-Neto, 2008, Gutierrez *et al.*, 2009) (Box1).

Nos últimos anos vêm sendo demonstrado que a via de inoculação pode influenciar diretamente na resposta imune do hospedeiro, bem como na evolução da doença. Foi demonstrado que a infecção por bactérias, tais como *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* e *Francisella tularensis*, por via de mucosa (intranasal ou oral) promove uma resposta do tipo T_H17, enquanto que a infecção por via sistêmica (intravenosa ou subcutânea) desencadeia uma resposta do tipo T_H1 (Hu and Pasare, 2013).

Na doença de Chagas, vem sendo demonstrado que a via de inoculação é um fator chave na patogênese, podendo influenciar nas manifestações clínicas e na resistência do hospedeiro (de Meis *et al.*, 2013, de Noya, 2015). Foi demonstrado que camundongos CFI infectados por diferentes vias sistêmicas (intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea) com a cepa Peruvian do *T. cruzi* (TcII) apresentaram maiores taxas de infecção (67-100%) e mortalidade do que por diferentes vias de mucosas (intragástrico, intra-rectal, genitália, ou conjuntival) (17-67%) (Marsden *et al.*, 1967). Resultados semelhantes foram observados em outro estudo comparando diferentes rotas de inoculação, no qual camundongos infectados por via subcutânea com a cepa Tulahuén (TcVI) do *T. cruzi* apresentaram maior mortalidade e

parasitemia do que por via intranasal. Além disso, os camundongos infectados pela via intranasal apresentaram um maior parasitismo no cérebro, sugerindo uma preferência de migração do parasito para o cérebro após administração por via intranasal (Caradonna and Pereiraperrin, 2009). Em outro estudo comparando a infectividade por via oral e cutânea (parasito adicionado na pele lesionada) utilizando a cepa Tulahuén (TcVI) do *T. cruzi*, demonstrou que a transmissão por via oral é mais eficiente do que a transmissão por via cutânea (Eickhoff *et al.*, 2013).

Dados do nosso grupo demonstraram que o local de entrada do parasito, na cavidade oral, como observado na infecção natural, ou diretamente no estômago, via gavagem, afeta diferentemente a resposta imune do hospedeiro e a mortalidade. Os animais infectados pela via oral apresentaram uma doença aguda mais grave, com parasitemia, taxa de mortalidade e níveis séricos de TNF- α mais elevados em comparação com os animais infectados pela via intragátrica. Além disso, os animais infectados pela via oral apresentaram uma hepatite mais intensa, porém com menos danos ao tecido cardíaco (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015).

Em conjunto, estes dados sugerem que a via de entrada do parasito no hospedeiro é um fator chave na patogenia e fisiopatologia da doença de Chagas. O local inicial de entrada do parasito afeta criticamente a resposta imune do hospedeiro, possivelmente modulando mecanismos imunes locais que terão impacto na imunidade sistêmica. Além disso, podem influenciar nas manifestações clínicas e na sobrevivência do hospedeiro (de Meis *et al.*, 2013, de Noya, 2015).

Box 1: Citocinas na Doença de Chagas

Diversos estudos da infecção aguda da doença de Chagas em modelos murinos vêm demonstrando que uma resposta imune do tipo T_H1, com produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-12, é essencial para o controle do *T. cruzi* (Abrahamssohn and Coffman, 1996, Martins *et al.*, 1999, Silva *et al.*, 1998), através da ativação de macrófagos e subsequente síntese de óxido nítrico, o qual tem importante função tripanossomicida (Chandra *et al.*, 2002, Gutierrez *et al.*, 2009). Por outro lado, a produção de IL-4, IL-10 e TGF- β , citocinas T_H2, antiinflamatórias, está relacionada com a susceptibilidade à infecção por *T. cruzi*, devido à inibição da atividade tripanossomicida do macrófago, levando ao aumento da replicação do parasito (Reed *et al.*, 1994, Silva *et al.*, 1991). No entanto, durante a fase aguda da infecção, uma resposta imune exarcebada leva a danos teciduais, que em casos extremos geram uma resposta inflamatória sistêmica e a morte (Gutierrez, *et al.*, 2009), com isso, as citocinas T_H2 desempenham um papel fundamental na regulação desses efeitos destrutivos da inflamação. Níveis elevados de TNF- α têm sido associados com danos teciduais no coração, baço e fígado e com o choque tóxico (Andrade *et al.*, 2008, Holscher *et al.*, 2000). Além das citocinas T_H1 e T_H2, tem-se demonstrado também o papel das células T_H17 durante a infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos infectados e tratados com anticorpos monoclonais anti-IL17 apresentam aumento da expressão da citocinas TNF- α e IFN- γ no soro e no coração e da miocardite, mortalidade prematura e diminuição da carga parasitária no coração (da Matta Guedes *et al.*, 2010). Em conjunto esses estudos demonstram que um balanço entre produção das citocinas é essencial para manter a homeostasia tecidual e gerar uma resposta imune efetiva (Bilate and Cunha-Neto, 2008)

1.2 Bioluminescência

1.2.1 Técnica de imagem de bioluminescência (*bioluminescence imaging*- BLI)

Existe na natureza uma grande variedade de espécies marinhas e terrestres naturalmente luminescentes. As enzimas luciferases, responsáveis pela produção da luminescência nessas espécies, vêm sendo amplamente utilizadas como genes repórteres para estudos de imagem de bioluminescência *in vitro* e *in vivo* (de Almeida *et al.*, 2011). A técnica de imagem de bioluminescência (BLI) é uma ferramenta versátil, sensível e não invasiva, que permite a análise em tempo real de diferentes processos biológicos em culturas de células e animais vivos. A técnica é baseada na conversão da energia química em luz, a qual pode ser detectada externamente através da utilização de sensores altamente sensíveis. A bioluminescência é gerada através de uma reação química, no qual se tem uma enzima oxidando um substrato levando a emissão de fótons (Sato *et al.*, 2004).

A célula ou patógeno de interesse são geneticamente modificados para expressar o gene repórter da luciferase. No caso do gene da luciferase *Firefly*, a célula ou patógeno passam a produzir a enzima luciferase, que na presença de adenosina trifosfato (ATP), magnésio e oxigênio, cataliza a oxidação do substrato D-luciferina resultando na produção de oxiluciferina, CO₂, AMP, pirofosfato inorgânico (PPI) e luz verde-amarelo, com pico de comprimento de onda em 562 nm (Badr, 2014, de Almeida *et al.*, 2011). A bioluminescência gerada pela atividade da luciferase é capturada por uma câmera de dispositivo de carga acoplada (CCD) arrefecida que pode detectar níveis muito baixos de luz visível emitida a partir de órgãos internos (de Almeida *et al.*, 2011, Prescher and Contag, 2010). Os detectores medem o número de fótons emitidos por unidade de área e convertem os fótons em elétrons. Em seguida, o software é capaz de converter os sinais de elétrons para uma imagem bidimensional e quantificar a intensidade da luz emitida (Sato *et al.*, 2004) (Figura 1.2).

A bioluminescência emitida é capaz de penetrar uma profundidade de milímetros a centímetros de tecido, porém o sinal de bioluminescência é reduzido em aproximadamente 10 vezes para cada centímetro que a luz penetra no tecido. As imagens geradas apresentam um sinal de *background* muito baixo, pois os tecidos de mamíferos não emitem bioluminescência naturalmente, permitindo assim detectar um número relativamente pequeno de patógenos em tecidos de modelos murinos (Hutchens and Luker, 2007, Sato *et al.*, 2004). Em modelos murinos, a D-luciferina injetada por via intraperitoneal ou intravenosa é rapidamente distribuída por todo corpo do animal e pode atravessar as barreiras do sangue, como hematoencefálica e placentária. O máximo de luz emitida com a reação é alcançado após 10-

12 min da injeção da D-luciferina e sua emissão se mantém relativamente constante por 30 min (Badr, 2014, Hutchens and Luker, 2007).

Os principais fatores que podem influenciar na sensibilidade da detecção e na emissão do sinal de bioluminescência são: a propagação da luz pelo tecidos, a profundidade em que estão localizadas as células expressando luciferase no organismo do animal, a disponibilidade do substrato, a disponibilidade dos cofatores, o número de células que expressam o gene repórter, o tempo entre a injeção do substrato e o sinal máximo para o ensaio e a sensibilidade do sistema de detecção. O ambiente celular também pode influenciar na emissão dos fótons. A luciferase no interior da célula pode estar sujeita a diversos fatores que podem afetar diretamente a sua atividade como: degradações proteolíticas, pH, temperatura e níveis de peróxido de hidrogênio (de almeida *et al* , 2011 and Bards, 2014).

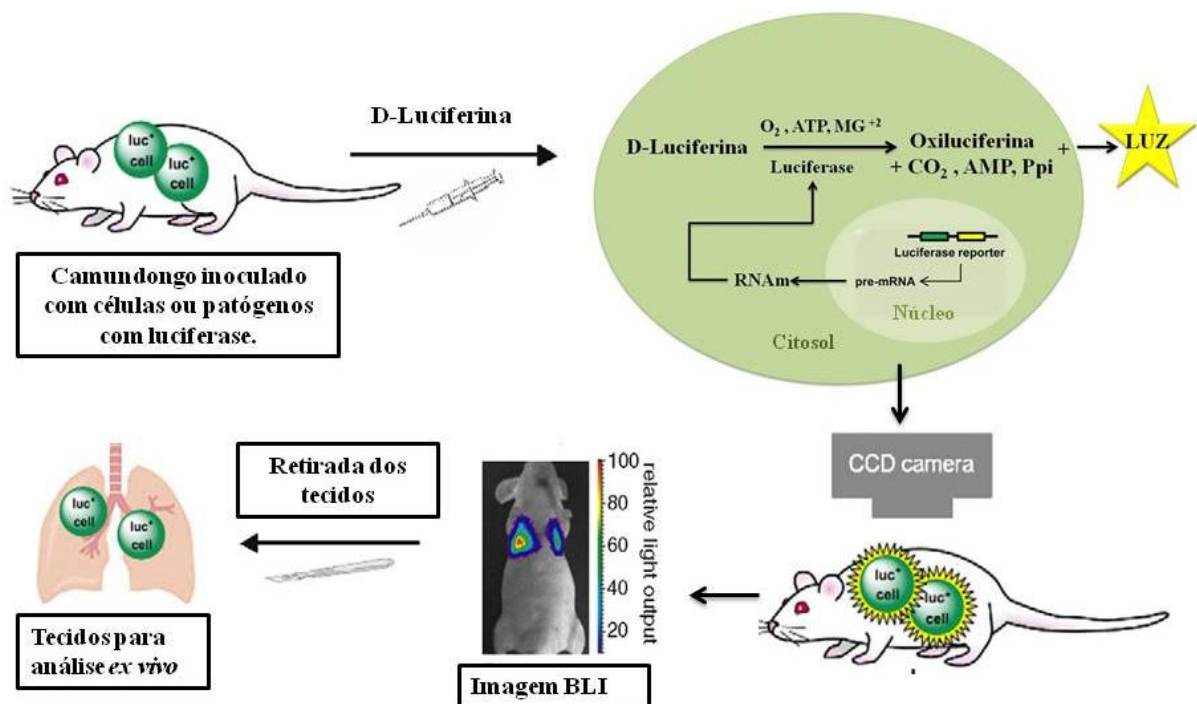


Figura 1.2 Representação esquemática da reação de bioluminescência e da aquisição de imagem. Para a aquisição da imagem, camundongos são inoculados com células ou patógenos geneticamente modificados para produzirem a enzima luciferase Firefly. Em seguida, esses camundongos recebem a injeção do substrato D-luciferina que na presença da luciferase, oxigênio, Mg^{+2} e ATP é oxidada em oxiluciferina, CO_2 , PPI, AMP, gerando luz. A luz produzida a partir das células ou patógenos é detectada por uma câmera de dispositivo de carga acoplada (CDD). Os fótons capturados são usados para criar uma imagem de cores relacionada com a intensidade de luz emitida que é transferida para uma imagem de referência do animal. Estas imagens proporcionam uma interpretação da localização e da quantidade de células ou patógenos e pode, orientar a seleção de tecidos para melhor análises *ex vivo* (adaptado de: de Almeida, *et al* 2011 e Prescher and Contag 2010).

1.2.2. Aplicações da bioluminescência para o estudo de doenças infecciosas

A imagem de bioluminescência vem sendo amplamente utilizada para detecção e monitoramento de doenças infecciosas. A detecção e a quantificação da luz emitida permitem observar a distribuição espacial e temporal dos processos biológicos e patológicos em animais vivos e monitorar longitudinal o curso de uma doença no mesmo animal (Sato *et al.*, 2004). Os ensaios convencionais de interação patógeno-hospedeiro necessitam que os animais sejam eutanasiados em diferentes tempos para que se possa identificar e quantificar os tecidos e órgãos infectados. Este tipo de análise individual em pontos específicos impede o monitoramento em tempo real da progressão espacial da infecção, podendo perder variações biológicas relevantes para a patogênese da doença, como a identificação de uma infecção em um determinado órgão ou tecido, que não foi descrito por não ter sido coletado e/ou analisado (Badr, 2014, Hutchens and Luker, 2007).

A **BLI** *in vivo* foi desenvolvida pela primeira vez usando como modelo a infecção bacteriana com *Salmonella typhimurium* geneticamente modificada para expressar o gene da luciferase. Após a infecção, as bactérias luminescentes foram detectadas em várias regiões do corpo do camundongo, indicando que o sinal de bioluminescência pode ser detectado *in vivo*. Estudos recentes demonstraram que a **BLI** também pode ser utilizada para o estudo das infecções parasitárias, tais como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* e *T.cruzi* (Hitziger *et al.*, 2005, Hyland *et al.*, 2008, Thalhoffer *et al.*, 2010).

De uma maneira geral, a análise das diferentes fases do desenvolvimento do *T. cruzi* baseia-se nas observações morfológicas e alterações histopatológicas em pequenas regiões dos órgãos. Com o desenvolvimento da técnica de imagem de bioluminescência, é possível seguir o parasito *in vivo* em todo o corpo do animal permitindo estudos mais amplos da propagação da infecção em hospedeiros invertebrados e vertebrados, bem como, testes mais eficientes de novas drogas e vacinas (Andriani *et al.*, 2011, Dias *et al.*, 2015, Henriques *et al.*, 2012, Hyland *et al.*, 2008). O primeiro estudo longitudinal da doença de Chagas, utilizando a técnica **BLI**, foi realizado por Hyland e colaboradores em 2008, com a cepa Brazil geneticamente modificada para expressar a luciferase *Firefly*. Com esta técnica eles puderam avaliar a disseminação do parasito e os órgãos alvo na fase aguda da infecção e constataram que nos momentos iniciais da infecção o parasito se concentrava no local de inoculação (via intraperitoneal) e posteriormente se distribuía para diferentes regiões do corpo. A análise *ex vivo* dos órgãos (coração, pulmão, fígado, baço, rim, músculo esquelético, sangue, intestino grosso e delgado) com 25 dpi observou uma emissão de bioluminescência principalmente no intestino grosso, pulmões, rins e, em menor intensidade, no coração, no músculo esquelético e no sangue (Hyland *et al.*, 2008).

Na mesma linha de pesquisa, Henriques e colaboradores modificaram geneticamente a cepa Dm28c do *T.cruzi* para expressar o gene da luciferase e avaliaram a progressão da infecção em camundongos infectados pela via intraperitoneal, tanto na fase aguda como na fase crônica (Henriques *et al.*, 2012, Henriques *et al.*, 2014). Na fase aguda da infecção, observaram com 7 dpi, que o parasito se localizava distribuído na região do abdômen, principalmente na região correspondente ao intestino grosso, urogenital e no nariz. Com 14 dpi, observaram a bioluminescência já distribuída por diferentes regiões do corpo, como abdominal, urogenital e dos membros posteriores e anteriores, porém o principal foco se localizava na região da cabeça, localizado no nariz e olhos. Já com 29dpi, a emissão da bioluminescência começou a diminuir no corpo, ficando restrita a pequenos focos principalmente a região urogenital. Na avaliação *ex vivo* com 14 e 29 dpi observaram emissão de bioluminescência principalmente nos intestinos e em menor intensidade nos testículos, reto, base da cauda e nariz. Já na fase crônica da infecção (180dpi), detectaram uma menor bioluminescência no corpo do animal, apresentando pequenos focos principalmente nas regiões abdominal e urogenital, com uma presença do parasito no reto e intestinos. Para confirmar os tecidos infectados e que o parasito transgênico não apresentava alterações na infecção realizaram análises histológicas (HE) dos órgãos de camundongos infectados com o Dm28c-luc e Dm28c sem luciferase e observaram a presença de ninhos de amastigota no intestino, reto, coração e nariz em ambos os parasitos (Henriques *et al.*, 2014)

Uma outra abordagem que a técnica de BLI permite é a análise da distribuição do *T.cruzi* em vetores invertebrados infectados (Dias *et al.*, 2015, Henriques *et al.*, 2012). Henriques e colaboradores, utilizando cepa Dm28c -luc do *T.cruzi*, acompanharam por um mês a infecção no vetor *R. prolixus* e observaram a disseminação do parasito ao longo do tempo no trato digestivo do vetor (Henriques, *et al* 2012).

Nesse contexto, o sistema de análise por imagem de bioluminescência tem contribuído para uma maior compreensão de diversos mecanismos envolvendo infecções, como a distribuição do patógeno no hospedeiro, mecanismos de interação parasito-hospedeiro, bem como a visualização *in vivo* dos efeitos de tratamentos terapêuticos e de vacinas. A capacidade de monitorar um processo biológico ou uma doença longitudinalmente no mesmo camundongo é uma grande vantagem da tecnologia **BLI**. A análise cronológica sequencial não só reduz o número de animais necessários, mas permite o recolhimento de dados científicos mais robustos. Além disso, a patofisiologia da doença pode ser melhor compreendida através da análise da progressão ou regressão da doença no mesmo animal (Hutchens and Luker, 2007, Sato *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. Justificativa

Atualmente, a infecção por via oral pelo *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é a principal via de transmissão no Brasil. Nosso grupo demonstrou a importância do contato do *T. cruzi* na cavidade oral para induzir uma infecção aguda mais grave (Barreto-De-Albuquerque *et al.*, 2015). No entanto ainda permanece incerto o primeiro local de entrada e multiplicação do parasito durante a infecção oral. Estudos vêm demonstrando que o local inicial de entrada do parasito é um fator chave na patogênese da doença de Chagas, podendo afetar criticamente a resposta imune e a sobrevivência do hospedeiro (De Meis *et al.*, 2013, Marsden *et al.*, 1967, Caradonna e Pereiraperrin, 2009 and Eickhoff *et al.*, 2013). A intensidade das manifestações clínicas, o período de incubação e a mortalidade se apresentam de forma diferente dependendo da via de transmissão. Estudos experimentais demonstraram que a via de inoculação do parasito tem impacto na sobrevivência do hospedeiro possivelmente por modulações na resposta imune sistêmica. Dessa forma, uma melhor caracterização do local inicial de entrada do *T. cruzi*, avaliando sua distribuição e interação com o hospedeiro, pode contribuir para uma maior compreensão da fisiopatologia da doença e de suas manifestações clínicas. Nesse sentido, pretendemos conhecer de forma mais detalhada, em modelo experimental, os órgãos e tecidos envolvidos na infecção oral pelo *T. cruzi*. Além disso, pretendemos identificar as diferenças de distribuição do *T. cruzi* nas vias de infecção oral, intragátrica, intravenosa e subcutânea, a fim de melhor entendermos a importância da porta de entrada do parasito na evolução da infecção aguda da doença de Chagas.

2.2. Objetivo geral

Avaliar, ao longo da infecção oral aguda pelo *T. cruzi*, a dinâmica de distribuição do parasito nos principais órgãos e tecidos-alvo. Além disso, pretendemos comparar a disseminação do *T. cruzi* na via oral com as vias de inoculação intragátrica, intravenosa e subcutânea.

2.3. Objetivos específicos

- Avaliar a parasitemia de camundongos infectados por via oral com a cepa Dm28c-luc do *T. cruzi*.
- Avaliar por imagem de bioluminescência o(s) primeiro(s) órgão(s) alvos do *T. cruzi* durante a infecção aguda experimental transmitida por via oral.

- Analisar por imagen de bioluminescência a dinâmica da distribuição do *T. cruzi* ao longo da fase aguda em órgãos e tecidos de camundongos infectados por via oral.
- Quantificar por qPCR o *T. cruzi* em órgãos e tecidos de camundongos infectados por via oral em diferentes tempos de infecção.
- Comparar por imagen de bioluminescência a distribuição do *T.cruzi* durante a infecção oral, intragástrica, intravenosa e subcutânea ao longo da fase aguda da doença de Chagas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c machos com idade variando de 6-8 semanas. Os animais foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). O estudo possui licença pela comissão de Ética de Uso de animais da FIOCRUZ (CEUA), LW-23/12.

3.2. Parasito e infecções

Nos protocolos experimentais, utilizamos o *T. cruzi* da cepa Dm28c geneticamente modificada para expressar o gene da luciferase *Firefly* (Dm28c-luc) e o gene da proteína fluorescente verde (GFP) (Dm28c-GFP). Os parasitos foram gentilmente cedidos pelas Dras. Mariana C. Waghbi (FIOCRUZ –RJ) e Cristina Henriques (FIOCRUZ- MS). Os animais foram infectados por via oral (**IO**), intragástrica (**IG**), intravenosa (**IV**) ou subcutânea (**SC**) com 1×10^6 formas tripomastigotas no volume final de 50 μ L (suspensão de parasitos e RPMI com SBF 10 %). A manutenção e a obtenção dos parasitos foram realizadas em cultura de células da linhagem VERO, utilizando o meio de cultura RPMI com SBF 10%. Nos protocolos de infecção por via oral e intragástrica, os animais foram mantidos sem água e comida por 4 horas antes do inóculo do parasito e 15 minutos depois do inóculo. A infecção intragástrica foi realizada por gavagem com inoculação dos parasitos diretamente no estômago do animal, utilizando uma agulha especial confeccionada em aço inox com ponta em esfera evitando lesões na mucosa oral/esofágica dos camundongos. Para infecção oral foram utilizados micropipetadores com ponteiras de plástico e o parasito foi depositado diretamente na boca do camundongo. Para a infecção por via intravenosa e subcutânea os parasitos foram inoculados na veia da base da cauda e no membro posterior direito do camundongo, respectivamente, utilizando seringas de 1mL.

3.3. Parasitemia

A parasitemia foi realizada pela avaliação do número de parasitos circulantes observados em 5 μ L do sangue da cauda dos camundongos infectados durante a fase aguda. A quantificação foi realizada através da contagem do número de parasitos presentes em 50 campos entre lâmina e lamínula (18x18mm) de vidro com auxílio do microscópio óptico de campo claro (400x). A determinação do número de parasitos por mililitro de sangue foi calculada de acordo com o método de Pizzi-Brener (Araújo-Jorge & Castro, 2000).

3.4. Análise *in vitro* da bioluminescência da cepa Dm28c-luc

Para a avaliação *in vitro* de emissão de bioluminescência da cepa Dm28c-luc do *Trypanosoma cruzi*, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase, 5×10^4 formas tripomastigotas da cepa foram distribuídas em placas de 24 poços com 1 mL de meio RPMI com 10% SFB e incubadas com 150 $\mu\text{g/mL}$ do substrato D-luciferina. Como controle utilizamos somente o meio usado na cultura do parasito (RPMI com 10% SFB) e incubamos com substrato D-luciferina na mesma concentração. Após 5 minutos, a imagem foi adquirida no sistema de imagem IVIS[®] Lumina (Xenogen Corp, CA, EUA). A bioluminescência foi medida com 5 minutos de exposição.

3.5. Obtenção de imagem por bioluminescência *in vivo* e *ex vivo* em camundongos infectados

A infecção com Dm28c-luc foi monitorada através da detecção da bioluminescência em todo corpo do animal, na posição ventral, lateral e dorsal, utilizando o sistema de imagem IVIS[®] Lumina (Xenogen Corp, CA, EUA). Os tempos analisados foram de 15 minutos, 7, 14 e 21 dpi para todos os grupos de infecção e 60 min para o grupo IO. O número total de animais analisados por bioluminescência *in vivo* foi de 5 animais com 15min, 3 animais com 60min, 6 animais com 7dpi, 3 animais com 14dpi e 6 animais com 21dpi no grupo **IO**; 1 animal no grupo **IG**; 2 animais no grupo **SC** e 1 animal no grupo **IV**. O número total de animais analisados por bioluminescência *ex vivo* foi de 3 animais com 15min, 2-5 animais com 60min, 5 animais com 48h, 6 animais com 7dpi e 6 animais com 21dpi no grupo **IO**; 1 animal no grupo **IG**; 2 animais no grupo **SC** e 1 animal no grupo **IV**. O substrato utilizado foi a D-luciferina sal de potássio (Xenogen), com solução de estoque preparada a 15 mg/mL em PBS e armazenada no freezer a -80°C .

Para a obtenção das imagens de bioluminescência com 15 min pós-infecção, realizamos uma pré-incubação de 5 min do Dm28c-luc com 0,15 mg da solução de D-luciferina diluída em PBS antes da infecção. Em seguida foi realizada a infecção dos camundongos utilizando o parasito misturado previamente com a luciferina nas diferentes vias de inoculação e as imagens foram adquiridas após 15 min de infecção. Nas imagens com 60 min pós-infecção, na via oral, foi efetuada uma injeção intraperitoneal de 150 mg/kg de peso corporal de D-luciferina e após 15 minutos as imagens foram adquiridas para permitir a difusão adequada do substrato D-luciferina, por toda parte do corpo. No entanto, imediatamente antes da captura das imagens, além da injeção da D-luciferina por via intraperitoneal os camundongos receberam 0,75 mg de D-luciferina em PBS (50 μL) diretamente na cavidade oral. Para a obtenção das imagens com 7, 14 e 21 dpi, o

camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de 150 mg/kg de peso corporal de D-luciferina e, após 15 minutos, as imagens foram adquiridas.

Para análise e quantificação das imagens os camundongos foram previamente anestesiados com 1,5% isoflurano em câmaras do sistema de anestesia a gás XGI-8 (Xenogen XGI-8 Gas Anesthesia system). Após a anestesia, os camundongos foram então colocados na câmara de imagem do sistema de imagem IVIS® Lumina (Xenogen Corp, CA, EUA) e mantidos durante todo o procedimento com fluxo de ar controlado de 1,5 % de isoflurano concebido para trabalhar em conjunto com o sistema de imagem por bioluminescência.

Para a análise *ex vivo* da presença do *T. cruzi* em órgãos específicos em diferentes momentos após a infecção, os camundongos foram injetados com D-luciferina como descrito em cada tempo de infecção e após 10 minutos os camundongos foram eutanasiados. Em seguida, os órgãos e tecidos foram removidos, transferidos para uma placa de cultura de células de 24 poços e as imagens adquiridas no sistema de imagem IVIS® Lumina (Xenogen Corp, CA, EUA). A bioluminescência, tanto dos camundongos como dos órgãos e tecidos, foi medida com 5 minutos de exposição. Os fótons emitidos a partir dos parasitos luminescentes foram quantificados utilizando o programa de software Living Image 3.0 (Xenogen Corp, CA, EUA).

3.6. Microscopia de fluorescência

Para análise da presença de ninhos de amastigotas, dois camundongos foram infectados com 1×10^6 formas tripomastigotas Dm28c-GFP por via oral e com 6 dpi removemos o tecido da cavidade nasal. Os tecidos foram colocados em um molde de plástico e envolvidos em solução crioprotetora (Tissue Tek OCT, Sakura), congelados em gelo seco e armazenados em freezer -80°C até o momento do processamento. Posteriormente, foram realizados cortes nos tecidos com espessura de 5 micrômetros, utilizando o criostato na temperatura de -25°C (criossecção), os cortes foram colocados sobre lâminas e analisados em microscópio de fluorescência.

3.7. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada nos tecidos da cavidade nasal, palato, língua, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, fígado, coração, baço, linfonodos mandibulares, hipófise e cérebro utilizando o QIAamp DNA Mini-kit (Qiagen, CA). Os tecidos e órgãos foram obtidos a partir de camundongos infectados pela via oral em diferentes tempos de infecção (60 min, 7 e 21 dias). Os órgãos foram pesados individualmente

(adicionou-se no máximo 10 mg de baço e 30 mg dos outros órgãos e tecidos), lavados em PBS (exceto os tecidos da cavidade nasal, linfonodo mandibular e hipófise) e armazenadas no freezer a -20 °C até a extração do DNA. O tecido da cavidade nasal foi obtido após raspagem da região. Os tecidos e órgãos de camundongos não infectados foram usados como controle negativo. Antes do início da extração do DNA e após a homogeneização das amostras foi adicionado 5 µL (40 pg / mL) do controle interno de amplificação (IAC), plasmídeo pZErO-2 com inserção do gene *A. thaliana* aquaporin, nas amostras. O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e o DNA foi eluído em 100 µL de tampão de eluição (AE). As amostras de DNA foram armazenadas no freezer a -20 °C e sua pureza e concentração foi determinada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

3.8. PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR)

Para a detecção e quantificação da carga parasitária do *T. cruzi* nos tecidos realizamos ensaios de PCR em tempo real quantitativa utilizando o sistema TaqMan em multiplex, com alvos direcionados para o DNA nuclear satélite do *T. cruzi* e o IAC, descrito por Duffy et al. (2009). As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas com volume final de 10 µL, contendo 1,5 µL do DNA extraído, 5 µL TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, USA), 0,75 µL dos primers cruzi 1 e cruzi 2 na concentração final de 750nM, 0,1 µL da sonda cruzi na concentração final de 350nM (específicos para a região do DNA nuclear satélite do *T. cruzi*), 0,2 µL dos primers IAC Fw e IAC Rv na concentração final de 100nM e 0,1 µL da sonda IAC Tq na concentração final de 50nM (Tabela 2.1). As amostras e o mix da reação foram distribuídas em placas de 400 poços utilizando o pipetador automático epMotion® 5070 (Eppendorf). As reações de qPCR foram realizadas no sistema ViiA™7 (Applied Biosystems). As condições para reação da qPCR foram: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto. A curva padrão para a quantificação absoluta das amostras foi preparada a partir da diluição seriada do DNA total, que foi extraído a partir de uma amostra contendo água enriquecida com 1x10⁶ formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Dm28c-luc). A curva padrão variou de 10⁶ a 0,5 equivalentes de parasito (Eq. par.). Após a quantificação por qPCR, os dados foram normalizados por massa de tecido (g) e os valores expressos em equivalentes de parasito / massa de tecido (Eq. par /g).

Tabela 3.1- Sequência dos *primers* e sondas utilizadas

Alvos	Primers e sondas	Sequência (5' – 3')
DNA satélite nuclear de <i>T. cruzi</i>	cruzi 1	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA
	cruzi 2	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA
	cruzi 3	FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB
Contorle interno de amplificação	IAC Fw	ACCGTCATGGAACAGCACGTA
	IAC Rv	CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT
	IAC Tq	VIC-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-NFQ-MGB

3.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 5, utilizando-se os testes não-paramétricos Mann-Whitney. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise *in vitro* da emissão de bioluminescência pelo *Trypanosoma cruzi* Dm28c-luc.

Para a análise *in vitro* da atividade bioluminescente da cepa Dm28c-luc do *T. cruzi*, 5×10^4 formas tripomastigotas foram plaqueadas em placa de cultura de 24 poços e incubadas com $150 \mu\text{g/mL}$ do substrato D-luciferina (1). Como controle negativo utilizamos o meio RPMI com 10% de SFB incubado com o substrato D-luciferina na ausência do parasito, na mesma concentração utilizada no poço anterior (2). Após 5 minutos de incubação, a placa foi colocada no interior da câmara e a imagem foi adquirida no sistema de imagem IVIS[®] Lumina (Xenogen Corp, CA, EUA). A bioluminescência foi medida durante 5 minutos de exposição. A análise da imagem demonstrou a presença da emissão de fótons na cepa Dm28c-luc (Figura 4.1- 1), o que não foi constatado no poço sem o *T. cruzi* (somente meio) (Figura 4.1- 2).

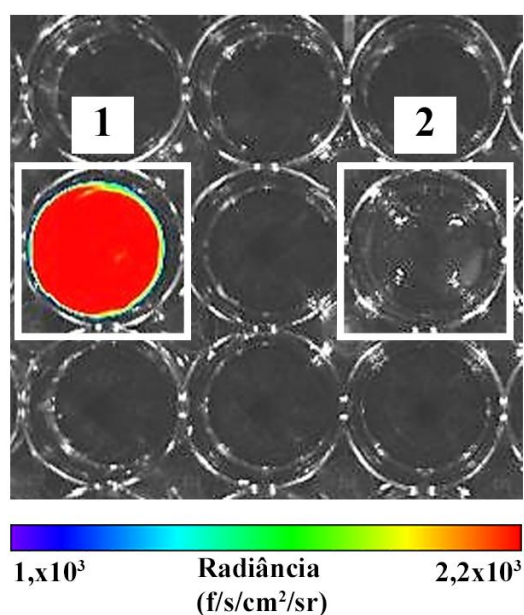


Figura 4.1 Bioluminescência das formas tripomastigotas da cepa Dm28c-luc do *Trypanosoma cruzi*. Para a avaliação da atividade da luciferase *in vitro* da cepa Dm28c-luc do *T. cruzi* geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase, 5×10^4 formas tripomastigotas foram distribuídas em placa de 24 poços (1) e como controle utilizamos meio de cultura RPMI com 10% SFB na ausência do parasito (2). O substrato D-luciferina foi adicionado a cada poço ($150 \mu\text{g/mL}$) e após uma incubação de 5min a imagem foi adquirida pelo sistema IVIS[®] Lumina (Xenogen Corp, CA, EUA). A bioluminescência foi medida durante 5 minutos de exposição. A barra de escala de cores (abaixo da figura) está relacionada com a intensidade da radiação (fótons/segundos/cm²/esferorradiana), onde o azul e o vermelho indicam o mínimo e o máximo de intensidade de sinal, respectivamente. Os valores dos sinais máximo e mínimo são indicados à direita e à esquerda, abaixo da barra de escala de cores, respectivamente. f=fótons; s =segundos; sr =esferorradiana.

4.2. Parasitemia dos camundongos infectados pela via oral.

Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene da luciferase, e a parasitemia foi monitorada em diferentes dias pós-infecção (dpi) (4, 7, 11, 14, 21dpi). Os parasitos circulantes começaram a ser detectados no sangue periférico com 7dpi, com pico de parasitemia em 11 dpi (Figura 4.2). Além disso, a porcentagem de camundongos com parasitemia sanguínea patente, infectados com 7 e 21 dpi foi de 25% e 56%, respectivamente. Por outro lado, as técnicas de bioluminescência e qPCR do *T. cruzi* demonstraram 100% de camundongos que apresentavam-se infectados com 7 e 21dpi (Tabela 4.1). Observamos que a detecção de parasitos circulantes no sangue é pouco sensível para determinar o percentual de infecção em animais inoculados pela via oral em nosso modelo, uma vez que as técnicas de bioluminescência e qPCR mostraram sinais de infecção ativa em camundongos sem parasitemia.

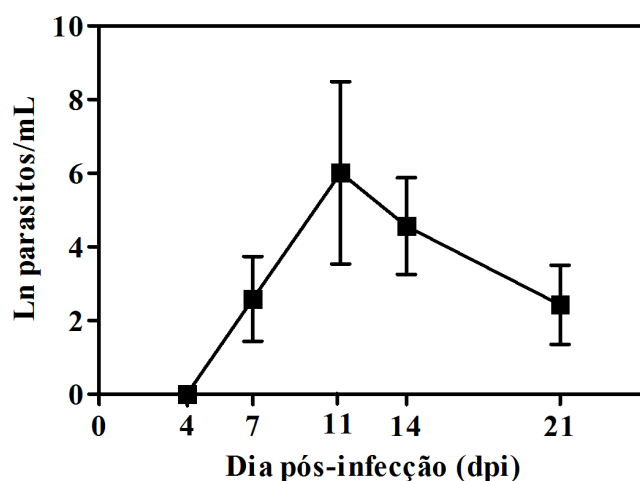


Figura 4.2. Parasitemia dos camundongos infectados por via oral com a cepa Dm28c-luc do *Trypanosoma cruzi*. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. O número de parasitos circulantes em 50 campos foi quantificado utilizando microscópio óptico de campo claro (400X) e o cálculo de parasitos/mL de sangue foi realizado pelo método de Pizzi-Brener. Os valores representam médias \pm erro padrão do logaritmo natural (ln) de parasitos/mL. Os dados representam a análise de dois experimentos independentes totalizando os seguintes números de animais/dpi: 4 e 11 dpi= 6 e 7, 14 e 21 dpi= 16.

Table 4.1. Percentual de Infectividade

Dia pós- infecção	tripomastigotas no sangue	sinal de bioluminescência nos tecidos	amplificação de DNA de <i>T. cruzi</i> nos tecidos
7 dpi	25% (n=16)	100% (n=6)	100% (n=5)
21dpi	56% (n=16)	100% (n=4)	100% (n=5)

A infectividade foi obtida a partir da porcentagem de camundongos que apresentaram parasitemia, sinal de bioluminescência ou amplificação de DNA de *T. cruzi* sobre o número total de camundongos inoculados com parasitos. n: número total de animais analisados.

4.3. Análise *in vivo* com 15 e 60 min pós-infecção pelo *T. cruzi* por via oral

Para determinar a rota anatômica do *T. cruzi* nos momentos iniciais da infecção oral, utilizamos a **BLI** que permite observar a distribuição espacial e temporal do parasito em todo o corpo do animal. Camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^6 formas tripomastigotas da cepa Dm28c-luc do *T. cruzi* e analisados com 15 e 60 min pós infecção. Para obtenção das imagens com 15 min pós-infecção, realizamos uma pré-incubação dos parasitos com o substrato D-luciferina por 5 min para posteriormente infectarmos os camundongos. Já nas imagens com 60 min pós-infecção, além da injeção da D-luciferina por via intraperitoneal, os camundongos receberam a D-luciferina diretamente na cavidade oral. Os camundongos foram colocados no interior da câmara do sistema IVIS[®] lumina e as imagens foram obtidas na posição ventral (painéis superiores) e lateral (painéis inferiores) (Figura 4.3). A análise das imagens após 15 min de infecção por via oral, mostrou que todos os camundongos infectados tiveram maior intensidade de bioluminescência na região da cabeça, correspondente à região da boca, nariz e olhos. Embora menos intensa, a bioluminescência também foi observada na região do pescoço e abdômen. Os sinais de bioluminescência foram consistentes entre as posições ventral e lateral (Figura 4.3 A). A quantificação do sinal de bioluminescência foi realizada nas regiões da cabeça, tórax e abdômen e como esperado a região da cabeça apresentou o maior sinal de bioluminescência quando comparada com o tórax e abdômen (Figura 4.3 B). Após uma hora de infecção, a região da cabeça permanecia sendo a principal área de detecção do *T. cruzi* (Figura 4.3C), sendo confirmado pela quantificação do sinal bioluminescente (Figura 4.3 D).

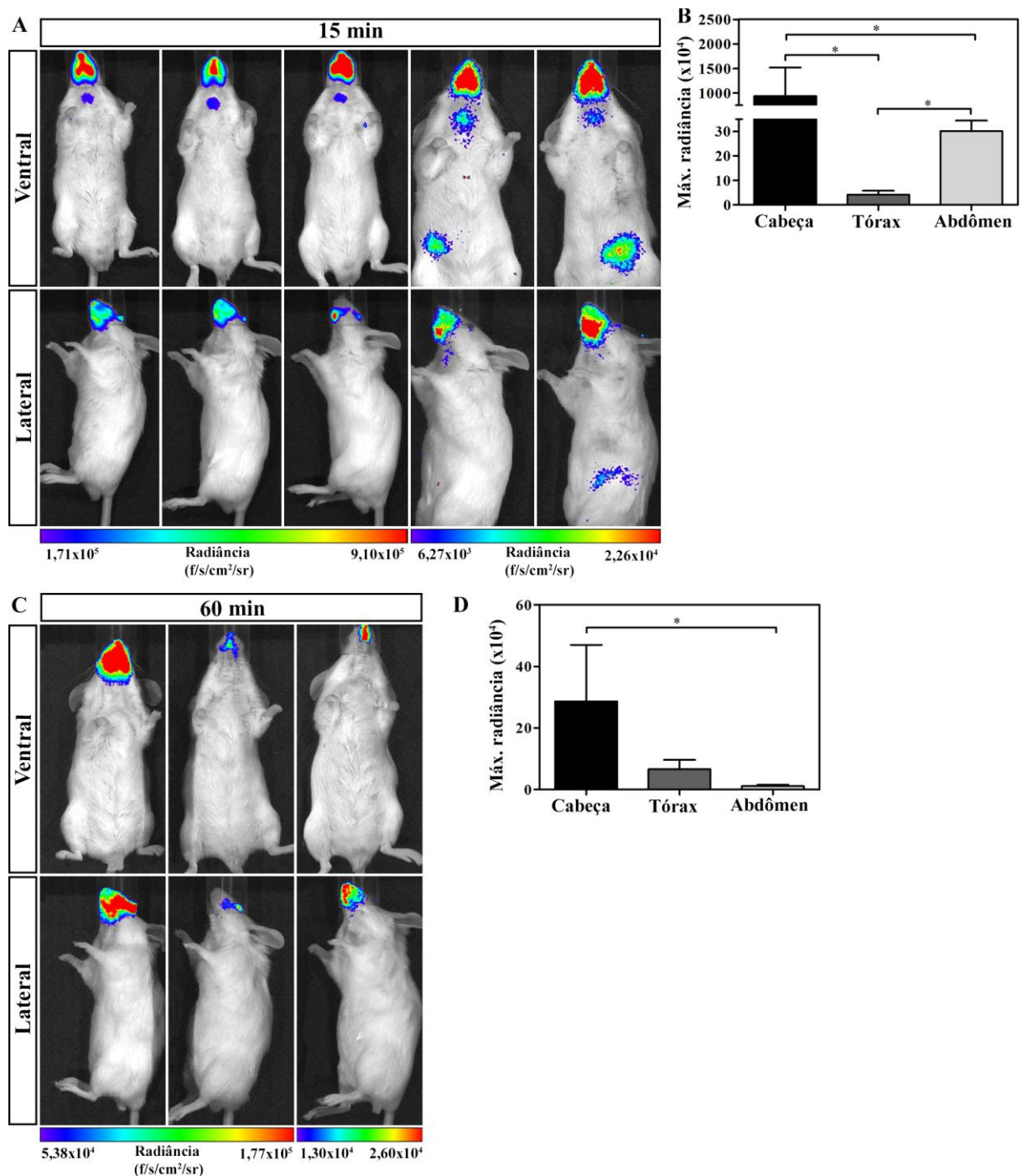


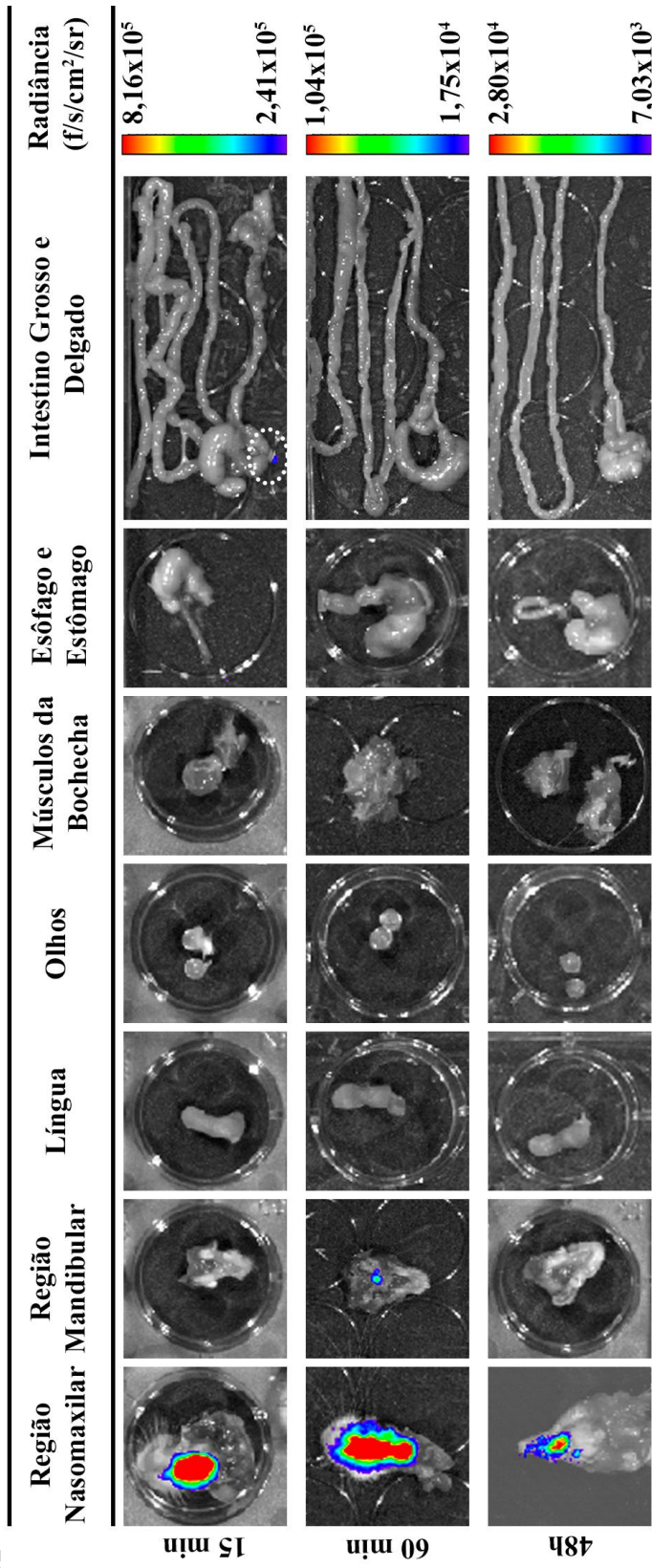
Figura 4.3. Imagem *in vivo* de bioluminescência dos camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* pela via oral com 15 e 60 min pós-infecção. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. O monitoramento *in vivo* da infecção oral foi realizado com 15 (A e B) e 60 min (C e D) pós-infecção usando o sistema de imagem IVIS® Lumina (Xenogen). A administração da D-luciferina foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. (A) Imagem *in vivo* com 15 min pós-infecção na posição lateral e ventral (n=5). (B) Quantificação da emissão de bioluminescência das imagens *in vivo* com 15 min pós-infecção (n=3). (C) Imagem *in vivo* representativa com 60 min pós-infecção na posição lateral e ventral (n=4). (D) Quantificação *in vivo* de emissão de bioluminescência das imagens com 60min pós-infecção (n=3). Observamos que com 15 e 60 min pós-infecção a região da cabeça, correspondente à área da boca, nariz e olhos, foi a principal área de detecção da bioluminescência. A barra de escala de cores (abaixo da imagem) está relacionada com a intensidade da radiância (fótons/segundos/cm²/esferorradiano), onde o azul e o vermelho indicam o mínimo e o máximo de intensidade de sinal, respectivamente. Os valores dos sinais máximo e mínimo são indicados à direita e à esquerda, abaixo da barra de escala de

cores, respectivamente. Os dados representam a análise de dois experimentos independentes em cada ponto. As quantificações foram realizadas nas regiões da cabeça, tórax e abdômen na posição ventral. Os valores representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$. Os dados foram analisados no programa Graphpad Prism 5 utilizando o teste de Mann-Whitney. f=fótons; s =segundos; sr =esferorradiano.

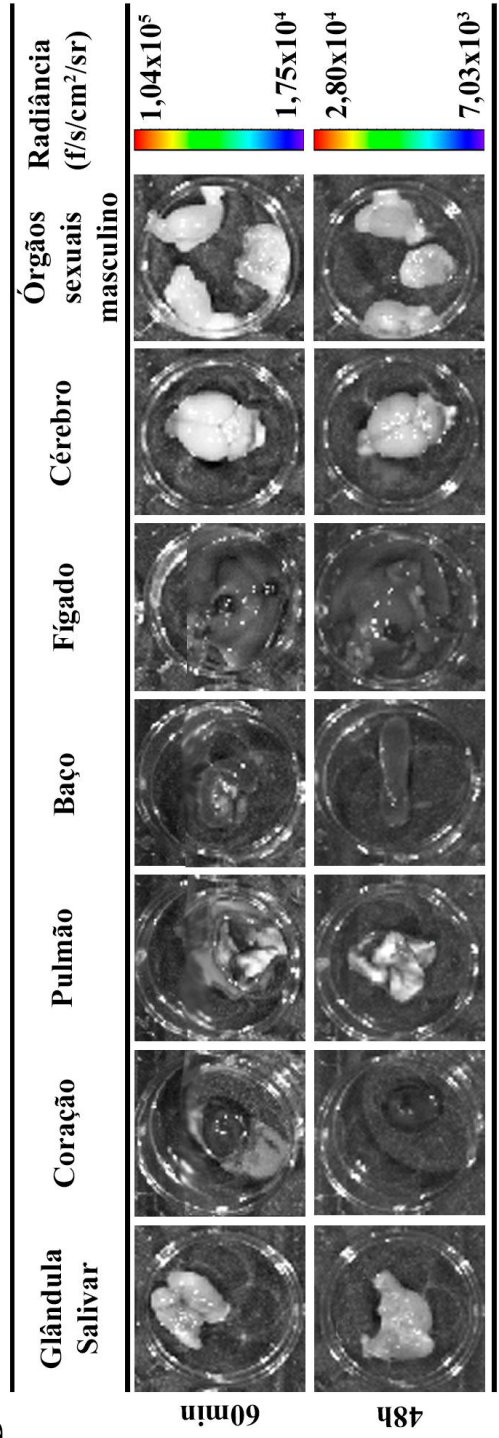
4.4. Análise *ex vivo* por imagem de bioluminescência dos órgãos e tecidos dos camundongos infectados por via oral com 15 e 60 min e 48h pós-infecção.

Para melhor compreendermos os tecidos e órgão afetados nos momentos iniciais da IO, foi realizada uma avaliação *ex vivo* dos órgãos e tecidos por imagem de bioluminescência. Para isto, camundongos foram eutanasiados com 15 e 60 min e 48h pós-infecção oral e os tecidos e órgãos selecionados da cabeça, como região nasomaxilar, região mandibular, músculos das bochechas, língua e olhos (Figura 4 C), e do trato gastrointestinal, como esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, foram removidos e colocados no interior da câmara do sistema IVIS[®] lumina para detecção da bioluminescência. A avaliação *ex vivo* por imagem de bioluminescência dos órgãos e tecidos retirados, confirmou os focos de bioluminescência presentes na análise *in vivo*, em que observamos que a cabeça foi a principal região com bioluminescência, especificamente a região nasomaxilar, que inclui a cavidade oral superior, nariz e cavidade nasal (Figure 4.4A e C). O sinal de bioluminescência na região nasomaxilar foi detectado em todos os animais analisados com 15 e 60 min pós-infecção e em 40% dos animais com 48h pós-infecção (Tabela 4.2). Um pequeno sinal de bioluminescência foi detectado no ceco (círculo pontilhado branco) e na região mandibular, com 15 min e 48h pós-infecção, respectivamente, em apenas um animal (Figura 4.4 A). Não detectamos nenhum sinal de bioluminescência na língua, nos olhos, nos músculos das bochechas, no esôfago, no estômago e no intestino delgado nesses tempos (Figura 4.4 A). Além disso, realizamos análises *ex vivo* por imagem de bioluminescência com 60 min e 48 horas pós-infecção no cérebro, baço, fígado, coração, pulmão, glândula salivar e não detectamos o sinal de bioluminescência nesses órgãos (Figura 4.4 B). Em conjunto, nossos dados sugerem que o principal local de interação e invasão do *T. cruzi* na IO é a cavidade oral, especificamente a região nasomaxilar.

A



B



C

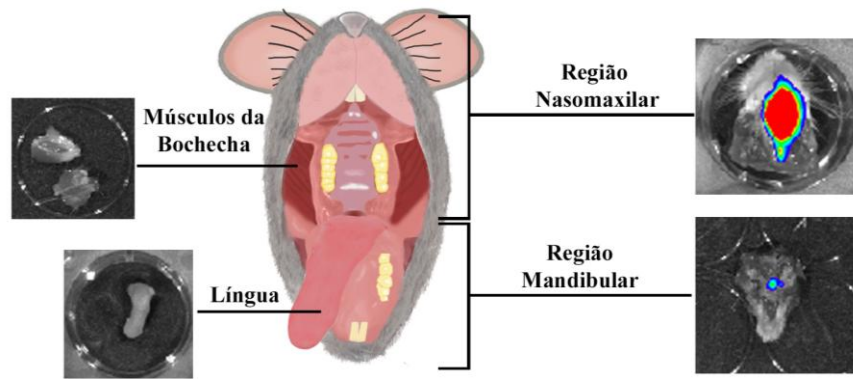


Figura 4.4. Imagem *ex vivo* de bioluminescência dos órgãos e tecidos dos camundongos infectados por via oral com 15 e 60 min e 48h pós-infecção. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T.cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. Após 15 e 60 min e 48h, os animais foram eutanasiados, os órgãos e tecidos foram recolhidos e as imagens foram capturadas usando o sistema IVIS® Lumina (Xenogen). A administração da D-luciferina foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. **(A)** Imagens *ex vivo* de bioluminescência representativas dos órgãos e tecidos com 15 min (n=3), 60 min (n=5 na região nasomaxilar; n = 2 nos outros órgãos) e 48 horas (n = 5) pós-infecção dos animais analisados que apresentaram sinais de bioluminescência. Os Sinais bioluminescentes foram detectados na região nasomaxilar em todos os animais infectados analisados com 15 e 60 min pós-infecção e na região mandibular e no ceco em um único animal com 15 min e 48h pós-infecção, respectivamente. **(B)** Imagens *ex vivo* de bioluminescência representativas dos órgãos e tecidos com 60 min (n= 2) e 48 horas (n=5) pós-infecção dos animais analisados. A barra de escala de cores (ao lado) está relacionada com a intensidade da radiância (fótons/segundos/cm²/esferorradiano), onde o azul e o vermelho indicam o mínimo e o máximo de intensidade de sinal, respectivamente. Os valores dos sinais máximo e mínimo são indicados acima e abaixo na barra de escala de cores, respectivamente. Os dados representam a análise de dois experimentos independentes em cada ponto. f=fótons; s =segundos; sr =esferorradiano. **(C)** Desenho esquemático que identifica as posições dos órgãos e tecidos visualizados. A região nasomaxilar inclui todos os tecidos das regiões do nariz, cavidade nasal e a porção superior da cavidade oral, com exceção dos músculos das bochechas. A região mandibular inclui todos os tecidos da mandíbula e a porção inferior da cavidade oral, com exceção da língua.

Tabela 4.2. Porcentagem de órgãos e tecidos que apresentaram sinal de bioluminescência

Órgãos	Tempos pós- infecção		
	15min (n=3)	60min (n=2; na região nasomaxilar n=4)	48h (n=5)
Região nasomaxilar	100 %	100%	40%
Região mandibular	0%	0%	20%
Músculos da bochecha	0%	0%	0%
Olhos	0%	0%	0%
Língua	0%	0%	0%
Estômago	0%	0%	0%
Esôfago	0%	0%	0%
Intestino Delgado ¹	0%	0%	0%
Intestino Grosso ²	33%	0%	0%
Glândula Salivar	NA	0%	0%
Coração	NA	0%	0%
Pulmão	NA	0%	0%
Baço	NA	0%	0%
Fígado	NA	0%	0%
Cérebro	NA	0%	0%
Órgãos sexuais masculinos	NA	0%	0%

1-Duodeno, jejuno e íleo; 2- Ceco, colón e reto; NA= não analisado.

4.5. Análise *in vivo* por imagem de bioluminescência da distribuição do *Trypanosoma cruzi* em camundongos infectados por via oral com 7, 14 e 21 dpi.

Para avaliar a dinâmica da distribuição do *T. cruzi* ao longo da fase aguda da **IO**, analisamos por imagem *in vivo* de bioluminescência camundongos infectados com 7, 14 e 21 dpi. As análises com 7 e 21 dpi foram realizadas nos mesmos animais. Com 7 dpi, o sinal de bioluminescência foi observado na região da cabeça, pescoço e abdômen. No entanto, vale ressaltar que a região da cabeça (boca, nariz e olhos) permaneceu como a principal área de infecção do *T. cruzi* na **IO** (Figura 4.5 A). Com 14 dpi, observamos a disseminação do parasito pelo corpo do animal, com detecção do sinal de bioluminescência em todas as regiões (Figura 4.5 B). Na análise com 21dpi, também observamos a presença do parasito em diferentes regiões do corpo, principalmente na cabeça, abdômen e região genital. Curiosamente, nesse tempo de infecção, a região genital foi um dos principais focos de infecção do *T. cruzi* (Figura 4.5 A). Os sinais de bioluminescência foram consistentes entre as posições ventral, lateral e dorsal.

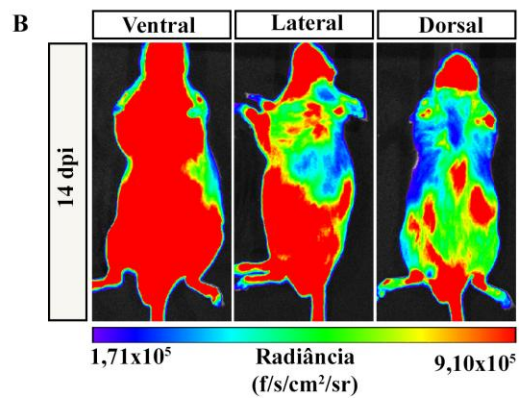
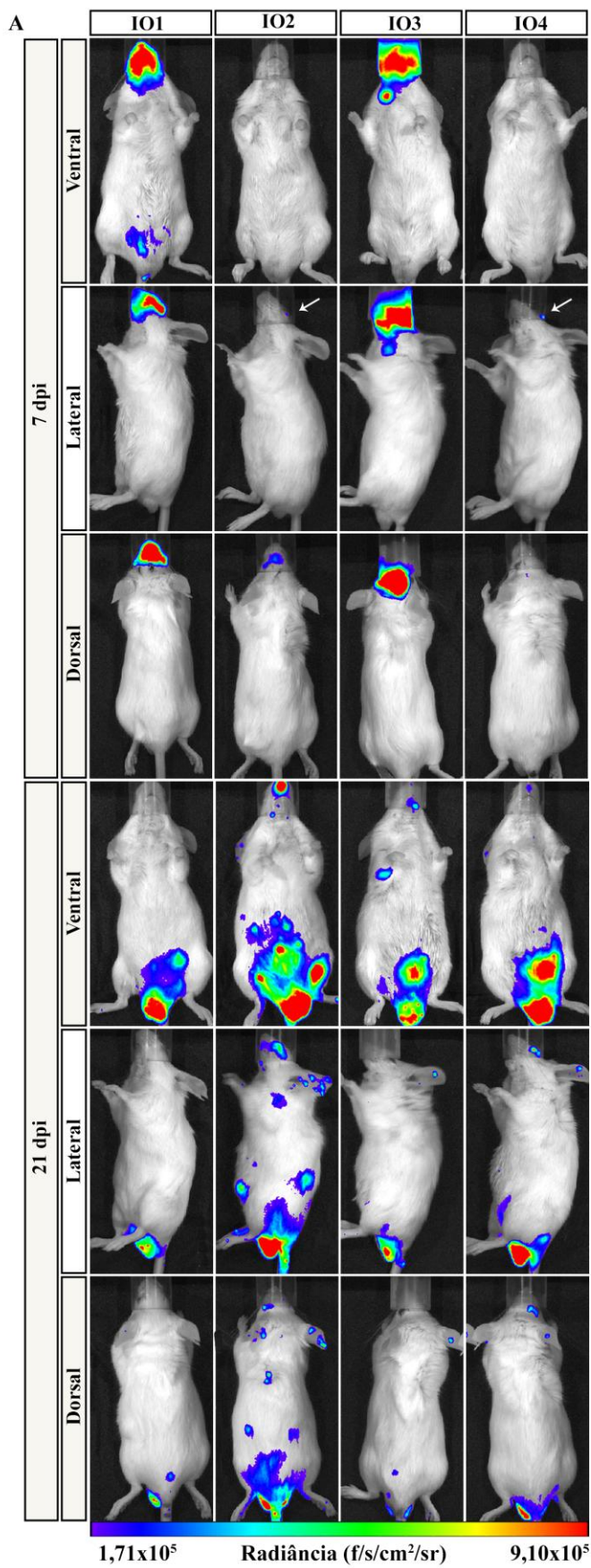


Figura 4.5. Imagem *in vivo* de bioluminescência da disseminação do *T.cruzi* na infecção oral da doença de Chagas com 7, 14 e 21 dpi. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. As imagens *in vivo* de bioluminescência foram adquiridas com 7, 14 e 21 dpi, usando o sistema de imagem IVIS[®] Lumina (Xenogen), após 10 minutos da administração da D-luciferina (150 mg/kg) por via i.p. (A) Imagens *in vivo* representativas da infecção com 7 e 21 dpi adquiridas nos mesmos camundongos (n=6). (B) Imagens *in vivo* da infecção com 14 dpi (n=1). Com 7 dpi, observamos que região da cabeça é o principal sítio de infecção do parasito. Com 14 e 21dpi, a infecção se apresenta disseminada com diferentes regiões do corpo afetadas pela infecção. A barra de escala de cores (abaixo) está relacionada com a intensidade da radiação (fótons/segundos/cm²/esferorradiano), onde o azul e o vermelho indicam o mínimo e o máximo de intensidade de sinal, respectivamente. Os valores dos sinais máximo e mínimo são indicados à direita e à esquerda, abaixo da barra de escala de cores, respectivamente. Os dados representam a análise de dois experimentos independentes com 7 dpi e com um experimento com 14 e 21dpi. IO= infecção oral; f=fótons; s=segundos; sr =esferorradiano.

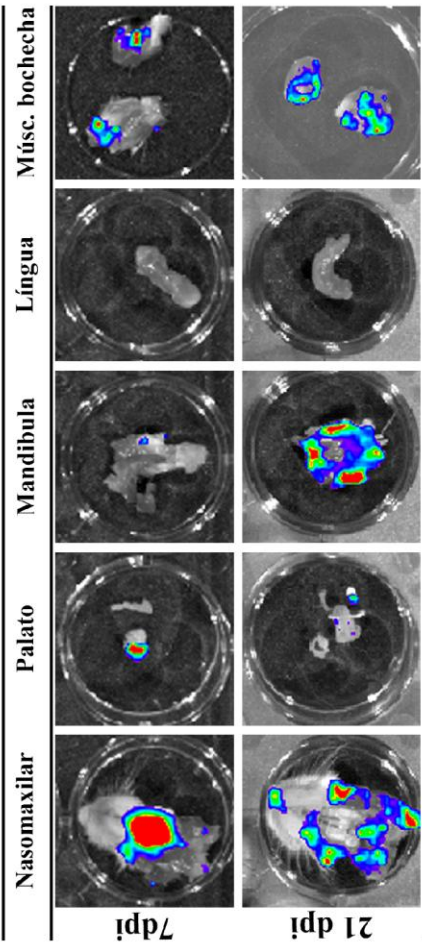
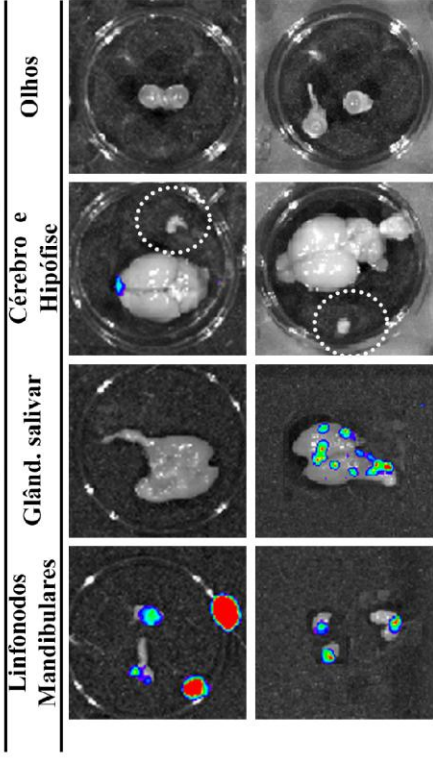
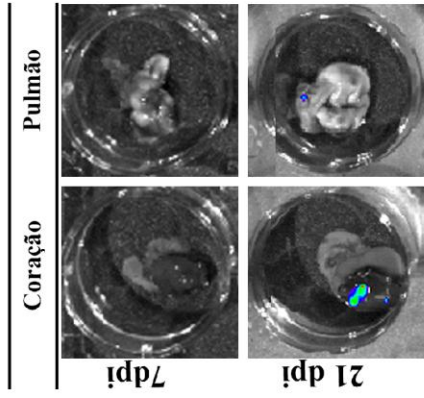
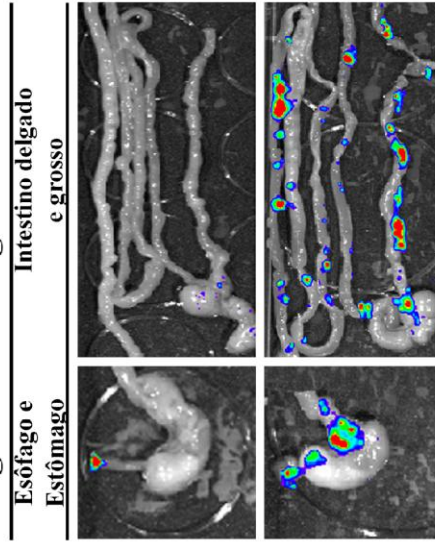
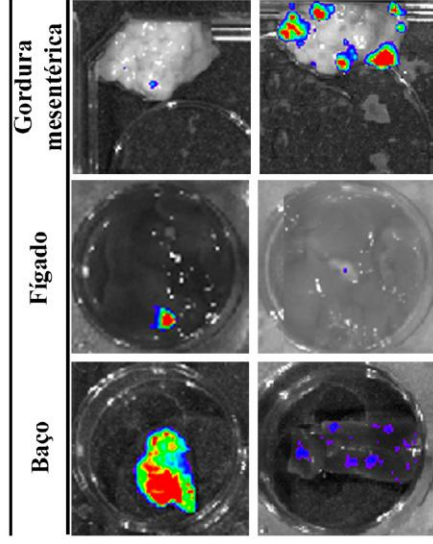
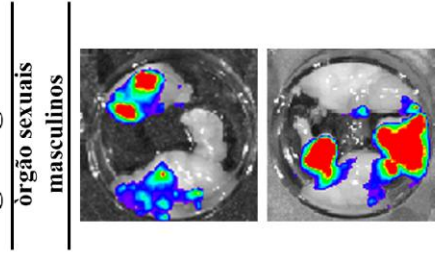
4.6. Análise *ex vivo* por imagem de bioluminescência dos órgãos e tecidos de camundongos infectados por via oral com 7 e 21 dpi.

Para identificarmos com precisão os tecidos e órgão afetados ao longo da fase aguda da IO, foi realizada uma avaliação *ex vivo* por imagem de bioluminescência em camundongos infectados com 7 e 21 dpi. Os tecidos e órgãos analisados foram: região nasomaxilar, palato, região mandibular, língua, olhos, músculos da bochecha, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, linfonodos mandibular, glândula salivar, coração, pulmão, baço, fígado, cérebro, hipófise, gordura e linfonodos mesentéricos e órgãos sexuais masculino, incluindo glândula prepucial, testículos, gordura epididimal e pênis (somente com 21dpi). Para melhor avaliar a região nasomaxilar, removemos o palato duro e mole expondo o septo nasal e a cavidade nasal, como podemos observar no desenho esquemático, a cavidade nasal se localiza acima do palato (Figura 4.6 G).

A avaliação *ex vivo* dos órgãos e tecidos removidos com 7 dpi, demonstrou que a principal região de infecção do *T.cruzi* continua sendo a região nasomaxilar, com presença do sinal de bioluminescência em todos os camundongos analisados (Figura 4.6 A e Tabela 4.3). Além disso, após a remoção do palato, observamos que a região da cavidade nasal e do septo nasal apresentou maior emissão de bioluminescência (Figura 4.6A). Corroborando esses dados, observamos através de microscopia de fluorescência a presença de ninhos de amastigotas na cavidade nasal de animais infectados com Dm28c-GFP com 6 dpi (Figura 4.7). Focos bioluminescentes também foram detectados no palato (Figura 4.6A) em 75% dos camundongos infectados (Tabela 4.3). Curiosamente, neste tempo de infecção, observamos a presença do *T. cruzi* no cérebro, especificamente na região do bulbo olfatório (Figura 4.6 B), em 50% dos camundongos infectados (Tabela 4.3). Sinais de bioluminescência também foram observados nos músculos da bochecha, no linfonodo mandibular e na região mandibular em 50% dos camundongos infectados (Figura 4.6 A e C e Tabela 4.3) e em 66,6% no baço

(Figura 4.6 E e Tabela 4.3). Pequenos focos de bioluminescência foram observados no esôfago, intestino grosso e delgado, fígado e na gordura e linfonodos mesentéricos (Figura 4.6 D e E). Nos órgãos sexuais masculinos detectamos o sinal de bioluminescência em 33,3% dos camundongos infectados, especificamente na gordura epididimal, epidídimo e testículo (Figura 4.6 F e Tabela 4.3). Nesse ponto de infecção, não foram detectados sinais de bioluminescência na língua, olhos, estômago, hipófise, glândula salivar, coração e pulmão (Figura 4.6 A, B, C e D). Vale ressaltar que com 7 dpi, os principais órgãos e tecidos acometidos se encontram na região da cavidade oral e adjacência (Tabela 4.3).

Na avaliação *ex vivo* com 21 dpi, o sinal de bioluminescência foi detectável em quase todos os tecidos e órgãos examinados. Observamos a presença da bioluminescência na região nasomaxilar, palato, região mandibular, músculos das bochechas, esôfago, linfonodos mandibulares, baço, fígado, gordura e linfonodos mesentéricos e órgãos sexuais masculinos (Figura 4.6 A, B, D, E e F). Os principais órgãos sexuais masculinos infectados foram o pênis e a glândula prepucial, que apresentaram sinais de bioluminescência em todos os camundongos analisados (Figura 4.6 F Tabela 4.3). Além disso, nesse ponto de infecção, começamos a detectar a presença do parasito no coração, pulmão, estômago e glândulas salivares (Figura 4.6 B, C e D) e observamos um aumento nos focos de bioluminescência nos intestinos e na gordura e linfonodo mesentérico (Figura 4.6 D e E). Além disso, o sinal de bioluminescência foi observado em 75% dos intestinos e em 50% dos estômagos e esôfagos analisados. Em conjunto, podemos concluir que com 7 dpi, os principais órgãos e tecidos acometidos se encontram na cavidade oral e adjacências e com 21 dpi, o *T.cruzi* se distribuiu para outras regiões do corpo, infectando outros órgãos e tecidos. A persistência do sinal de bioluminescência emitido pela região nasomaxilar em todos os pontos analisados, sugere uma manutenção da proliferação do parasito nesta região.

A**Órgãos da cavidade oral e adjacência****B****Outro órgãos da cabeça e pescoço****C****Órgãos tórax****D****Órgãos do trato gastrointestinal****E****Órgãos abdominais****F****Órgãos genitais**

G

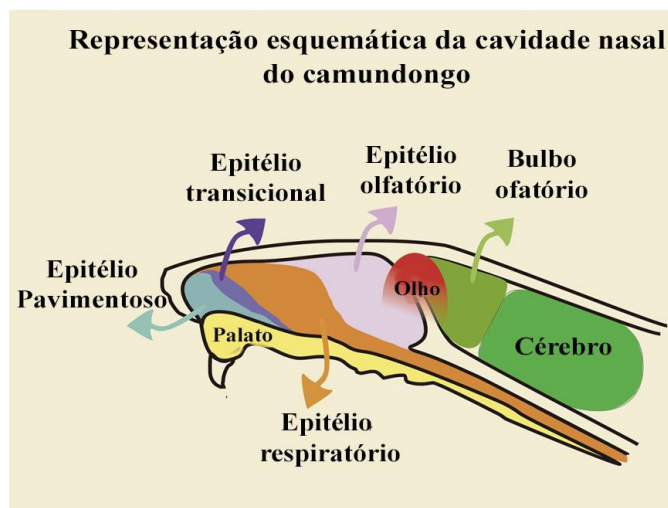


Figura 4.6. Imagens *ex vivo* de bioluminescência dos tecidos e órgãos de camundongos infectados pela via oral com 7 e 21dpi. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. Com 7 e 21 dpi, foram inoculados com o substrato de D-luciferina (150mg/kg) por via i.p e após 10min eutanasiados. Os órgãos e tecidos foram removidos e as imagens foram capturadas usando sistema IVIS[®] Lumina (Xenogen). Imagens *ex vivo* representativas dos órgãos que apresentaram sinais de bioluminescência: **(A)** Órgãos da cavidade oral e adjacência com 7 dpi (n=4 palato e músculo da bochecha e n=6 outros órgãos) e 21 dpi (n=4); **(B)** Outras órgãos da cabeça e do pescoço com 7dpi (n=4 hipófise e linfonodos mandibulares e n=6 outros órgãos) e 21dpi (n=4). Hipófise: dentro do círculo branco; **(C)** Órgãos do tórax com 7dpi (n=6) e 21 dpi (n=4); **(D)** Órgãos do trato gastrointestinal com 7dpi (n=6) e 21 dpi (n=4); **(E)** Órgãos abdominais com 7 dpi (n=4 gordura e linfonodo mesentérico e n=6 outros órgãos) e 21 dpi (n = 4); **(F)** Órgãos sexuais masculinos com 7 dpi (n = 6) e 21 dpi (n=4). Testículos, epidídimos e gordural epididimal nas laterais; glândula prepucial na parte inferior; e pênis na parte superior (somente com 21 dpi). Na avaliação *ex vivo* observamos a presença do *T. cruzi* em diferentes órgãos do corpo com 7 e 21 dpi. A escala de cores está relacionada com a intensidade da radiância (fótons/segundos/cm²/esferorradiano), onde o azul e o vermelho indicam o mínimo e o máximo de intensidade de sinal, respectivamente. Os sinais máximos e mínimos foram: com 7 dpi: LN mandibular e músculos da bochecha (min=1,17e4 e máx=6,51e4), estômago e esôfago (min=6,02e3 e máx=1,5e4), intestino (min=7,13e3 e máx =4,08e4), fígado (min = 1,58e4 e máx = 8,02e4) e os outros órgãos (min=9,86e4 e máx=4,12e5); com 21 dpi: baço (min=3,5e5 e máx=2,57e6), gânglios linfáticos cervical superficiais e glândula salivar (min=4,74e4 e máx=1,75e5) e outros órgãos (min=7,92e4 e máx=2,93e5). **(G)** Desenho esquemático da anatomia da cabeça do camundongo. No desenho, o septo nasal foi removido, expondo a parede lateral, onde observamos algumas das principais estruturas da cabeça. Nesta imagem, temos o palato (amarelo), olhos (vermelho), cérebro (verde escuro e claro), bulbo olfatório (verde claro) e a cavidade nasal, com seus tecidos epiteliais. As cores estão representando cada epitélio presente na cavidade nasal: tecido epitelial pavimentoso (azul), tecido epitelial de transição (roxo), tecido epitelial respiratório (laranja) e tecido epitelial olfativo (lilás).

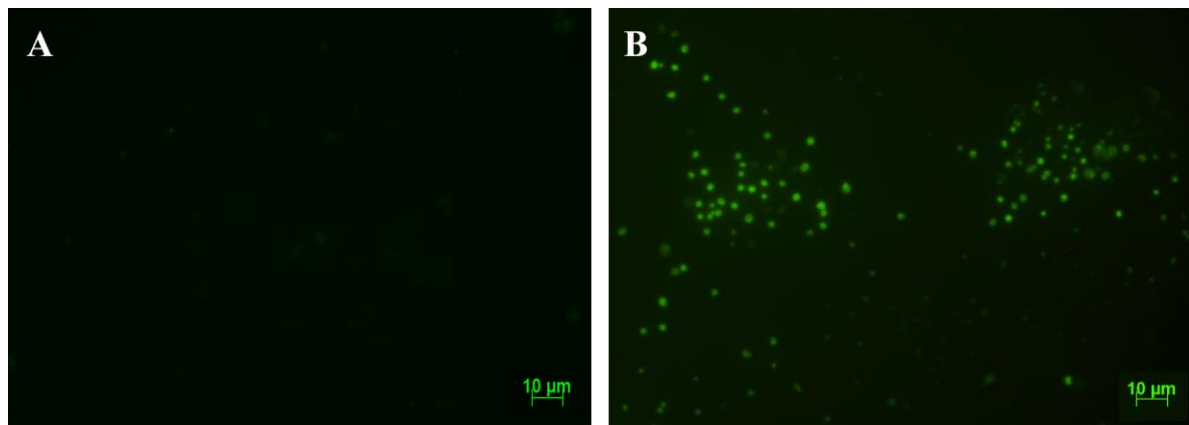


Figura 4.7. Microscopia de fluorescência da cavidade nasal de camundongo infectado com Dm28c-GFP. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* da cepa Dm28c, geneticamente modificada para expressar o gene reporter GFP (Dm28c-GFP). Com 6 dpi, os tecidos da cavidade nasal foram removidos, congelados e cortados para análise por microscopia de fluorescência. (A) Imagem de fluorescência representativa da cavidade nasal de camundongo não infectado. (B) Imagem de fluorescência representativa da cavidade nasal de camundongo infectado. Podemos observar a presença de diversos ninhos de amastigostas (em verde) na cavidade nasal. Os dados representam a análise de um experimento com $n=2$.

4.7. Quantificação da carga parasitária nos tecidos alvo por PCR em tempo real quantitativa após infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi*

Em contraste com as técnicas clássicas, a técnica de imagem de bioluminescência é capaz de identificar pequenos focos de infecção em todo o corpo do animal, mas em alguns casos o sinal de bioluminescência pode estar abaixo dos limites de detecção. As técnicas moleculares, como a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) são técnicas sensíveis que permitem detectar pequenas quantidades do parasito nos tecidos, podendo ser associadas à imagem por bioluminescência permitindo a análise mais precisa dos órgãos alvo. Para examinar a carga parasitária do *T. cruzi* nos tecidos alvo, camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase, e com 60min, 7 e 21 dias pós-infecção, coletamos os tecidos para realizarmos a qPCR.

Inicialmente, analisamos os tecidos da cavidade oral, do trato gastrintestinal e tecidos adjacentes, como cavidade nasal, língua, palato, linfonodo mandibular, esôfago, estômago, intestinos grosso e delgado. Consistente com o sinal de bioluminescência observado na região nasomaxilar com 60 min (Figura 4.4A) e com 7 dias pós-infecção (Figura 4.6A) detectamos números elevados de equivalentes de parasito/grama (eq.par./g) na cavidade nasal por qPCR. Nesses pontos de infecção, a cavidade nasal apresentou a maior carga parasitária entre os tecidos analisados. Com 60min pós-infecção, detectamos DNA Satélite (DNA Sat) do *T. cruzi* na cavidade nasal de 80% dos animais infectados, apresentando uma média de carga

parasitária de 180 equivalentes de parasito/g (variando de 0 a 560 eq.par./g) (Figura 4.8A). Nesse tempo, a amplificação do *T.cruzi* também foi detectada no esôfago (Figura 4.8 C), no intestino delgado (Figura 4.8 E), no intestino grosso (Figura 4.8 F), no estômago e no linfonodo mandibular, apesar de não termos detectado por imagem de bioluminescência (Figura 4.4 A e C). A amplificação do DNA Sat do *T.cruzi* foi observada em um animal no esôfago (Figura 4.8B) , no intestino delgado (Figura 4.8D) e no intestino grosso (Figura 4.8E) nesse tempo. Além disso, detectamos a presença do *T.cruzi* no estômago (Figura 4.8D) e nos linfonodos mandibulares em 75% dos animais infectados (Figura 4.8B), porém, as médias da carga parasitária do estômago e dos linfonodos mandibulares, foram menores do que as observadas na cavidade nasal, com média de 52,0 equivalentes de parasito/g (variando de 0 a 191,1 eq.par./g) e com média de 1,0 equivalentes de parasito/g (variando de 0 a 1,63 eq.par./g), respectivamente.

Com 7dpi, a quantificação do *T. cruzi* na cavidade nasal foi elevada, apresentando uma média de carga parasitária de $2,2 \times 10^6$ equivalentes de parasito/g (variando de $6,2 \times 10^3$ a $7,5 \times 10^6$ eq.par./g) (Figura 4.8A). Nesse mesmo tempo, o linfonodo mandibular também apresentou uma média de carga parasitária elevada com $3,5 \times 10^3$ equivalentes de parasito/g (variando de 31,2 a $6,3 \times 10^3$ eq.par./g) (Figura 4.8B). No entanto, a média da carga parasitária detectada na cavidade nasal foi 10^3 vezes mais elevada do que nos outros órgãos analisados (Figura 4.8A). Em conjunto, estes dados sugerem fortemente que a cavidade nasal é um dos principais sítios de infecção e replicação do *T. cruzi* durante a infecção oral.

Com 21 dpi, devido à disseminação do *T.cruzi*, detectamos níveis elevados de equivalentes de parasito/g em quase todos os tecidos analisados (Figura 4.8), consistente com os resultados de imagem de bioluminescência. Além disso, não foi possível detectar o *T. cruzi* no palato e na língua devido à inibição da reação do qPCR, uma vez que o controle interno IAC também não amplificou.

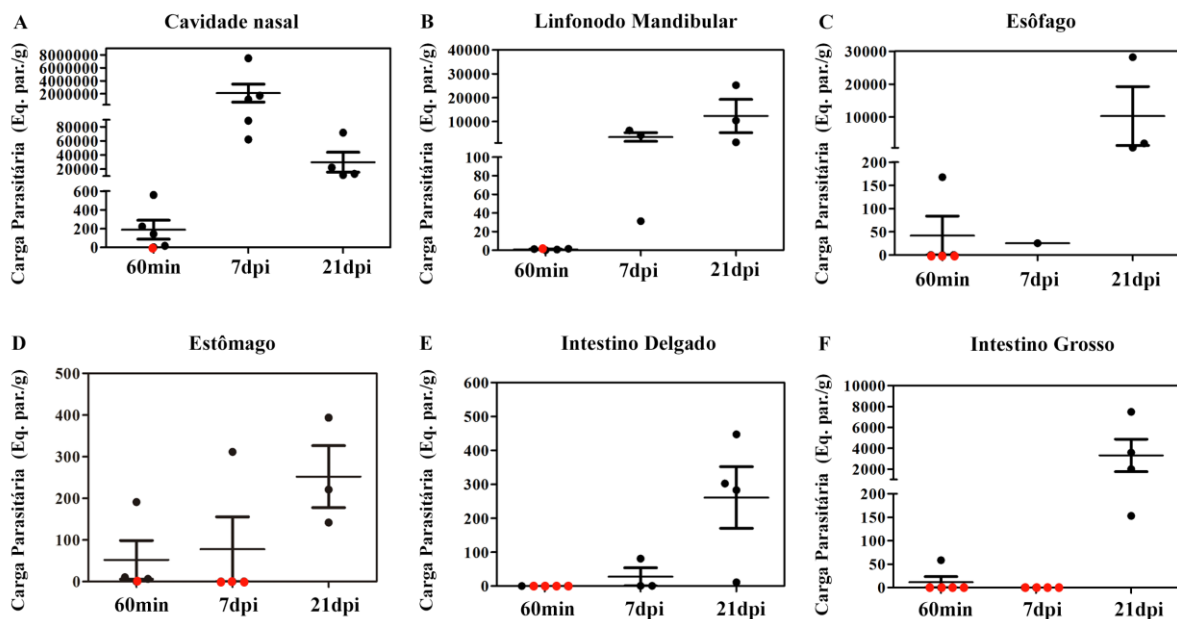


Figura 4.8. Quantificação da carga parasitária do *T. cruzi* em tecidos de camundongos infectados oralmente. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. Com 60 min, 7 e 21 dias pós infecção, os órgãos e tecidos foram removidos para análise por qPCR da carga parasitária. A qPCR foi desenhada com alvos direcionados para o DNA nuclear satélite do *T. cruzi* e o controle interno de amplificação (IAC). O valor da carga parasitária foi obtido a partir da quantificação absoluta normalizada pelo peso das amostras em grama, sendo expressa em equivalentes de parasito/grama (Eq. par./g). (A) Carga parasitária na cavidade nasal (n:60min e 7dpi=5, 21dpi=4). (B) Carga parasitária no linfonodo mandibular (n:60min=4, 7 e 21dpi=3). (C) Carga parasitária no esôfago (n:60min=4, 7dpi=1, 21dpi=3). (D) Carga parasitária no estômago (n:60min e 7dpi=4, 21dpi=3). (E) Carga parasitária no intestino delgado (N: 60min=5, 7dpi=3, 21dpi=4). (F) Carga parasitária no intestino grosso (n:60min=5, 7 e 21dpi=4). Os valores representam a média \pm SEM. Os pontos em vermelho significam que não houve nenhuma detecção do parasito.

Para avaliar a distribuição do *T. cruzi* no organismo e correlacionar com as imagens de bioluminescência, analisamos por qPCR a carga parasitária na hipófise, o cérebro, o coração, o baço e o fígado com 60min, 7 e 21 dias pós-infecção. Como visto nas análises *ex vivo* por imagem de bioluminescência do cérebro, fígado e baço com 60 min pós-infecção, não observamos qualquer sinal de bioluminescência, sugerindo uma baixa quantidade ou ausência do parasito (Figura 4.4 B). Os resultados da qPCR confirmaram os resultados das imagens de bioluminescência e não detectamos a amplificação do DNA do *T. cruzi* nesses órgãos e nem na hipófise (Figura 4.9 A, B, D e E). No entanto, detectamos uma pequena quantidade de parasito (0, 8 Eq. par./g) no coração de um animal com 60 min pós-infecção (Figura 4.9C).

Com 7dpi, detectamos o *T. cruzi* no coração, baço e fígado com uma média de carga parasitária de 77,80, $1,7 \times 10^3$ e 75,30 equivalentes parasito/g, respectivamente (Figura 4.9C, D e E). Nesse ponto de infecção, detectamos uma quantidade baixa de *T. cruzi* no cérebro de apenas um animal (Figura 4.9B), apesar de termos observado a presença do *T. cruzi* nas imagens *ex vivo* de bioluminescência nesse órgão (Figura 4.6 A). Porém a região retirada para

análise da qPCR foi uma área mais central do cérebro, afastado do bulbo olfatório, local que apresentou sinal de bioluminescência. Curiosamente, neste ponto de infecção, detectamos o *T. cruzi* também na hipófise com uma média de carga parasitária de 413 equivalentes parasito/g (variando 0 a $1,1 \times 10^3$ eq.par./g) (Figura 4.9 A). Como esperado, com 21dpi, após a disseminação do parasito, foram detectadas quantidades elevadas de equivalentes parasito/g em todos os tecidos e órgãos analisados (Figura 4.9).

Tomado em conjunto os resultados da bioluminescência e da qPCR, observamos que nos primeiros momentos após a infecção por via oral, a cavidade oral é uma das principais regiões de interação do parasito. No início da infecção observamos que o *T. cruzi* é capaz de infectar principalmente as regiões adjacentes à cavidade oral (como cavidade nasal e linfonodo mandibular) além do estômago, porém a cavidade nasal é o principal foco de permanência e replicação do *T. cruzi* após IO. Estes resultados mostram a cinética da disseminação do parasito pela via oral, a partir da cavidade oral o *T. cruzi* infecta principalmente a cavidade nasal, e após multiplicação nesse órgão se dissemina para outros órgãos (hipófise, cérebro, coração, baço e fígado)

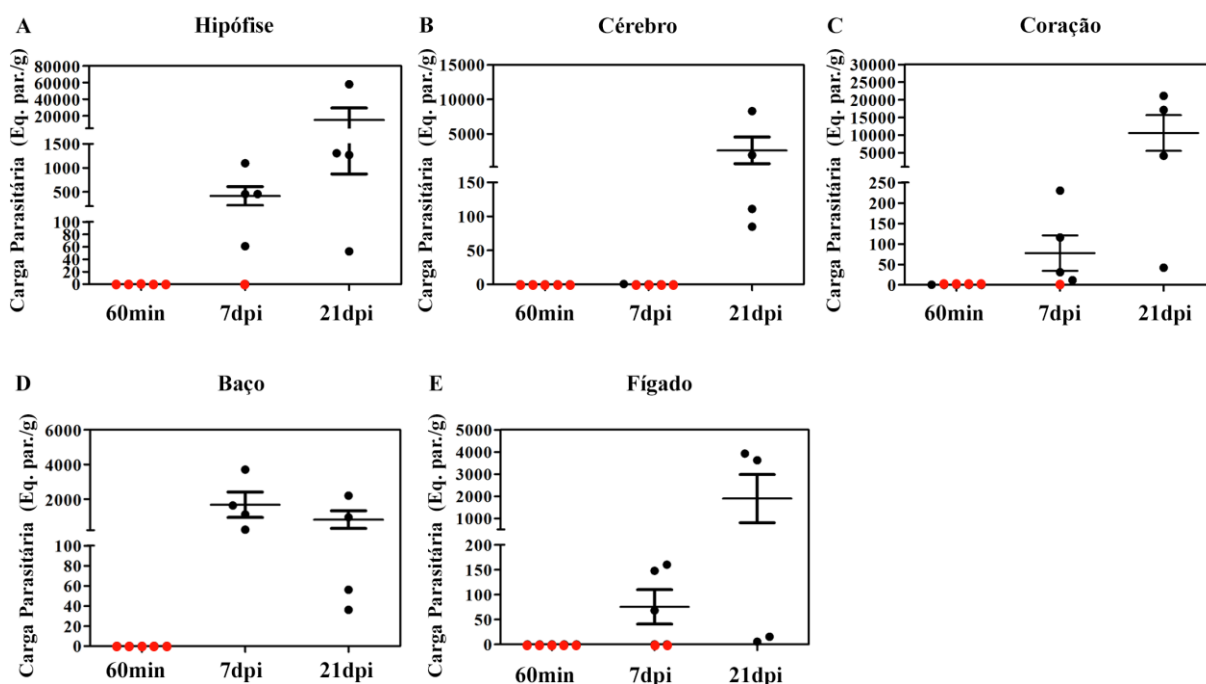


Figura 4.9. Quantificação da carga parasitária em tecidos de camundongos infectados oralmente com *T. cruzi*. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. Com 60 min, 7 e 21 dias pós infecção, os órgãos e tecidos foram removidos para análise por qPCR da carga parasitária. A qPCR foi desenhada com alvos direcionados para o DNA nuclear satélite do *T. cruzi* e o controle interno de amplificação (IAC). O valor da carga parasitária foi obtido a partir da quantificação absoluta normalizada pelo peso das amostras em grama, sendo expressa em equivalentes de parasito/grama (Eq. par./g). **(A)** Carga parasitária na hipófise (n:60min e 7dpi=5, 21dpi=4). **(B)** Carga parasitária no cérebro (n:60min e 7dpi=5, 21dpi=4). **(C)**

Carga parasitária no coração (n:60min e 7dpi=4, 21dpi=3). **(D)** Carga parasitária no baço (n:60min =5, 7 e 21dpi=4). **(E)** Carga parasitária no fígado (n:60min e 7dpi=5, 21dpi=4). Os valores representam a média \pm SEM. Os pontos em vermelho significam que não houve nenhuma detecção do parasito.

Tabela 4.3. Frequência de órgãos infectados pelo *T. cruzi* analisados por bioluminescência e qPCR.

		Tempo pós- infecção					
		60min		7dpi		21dpi	
Região	Tecidos	Biol. (n)	qPCR (n)	Biol. (n)	qPCR (n)	Biol. (n)	qPCR (n)
Órgãos da cavidade oral e adjacente	Cavidade nasal	100% (4)	80% (5)	100% (6)	100% (5)	50% (4)	100% (4)
	Palato	NA	NA	75% (4)	NA	25% (4)	NA
	Mandíbula	50% (2)	NA	50% (6)	NA	75%(4)	NA
	Músc. Bochecha	ND (2)	NA	50% (4)	NA	100% (4)	NA
	Língua	ND (2)	NA	ND (6)	NA	ND (4)	NA
Órgãos da cabeça e pescoço	LN _s mandibulares	NA	75% (4)	50% (4)	100% (3)	25% (4)	100% (3)
	Glând. Salivar	ND (2)	NA	ND (6)	NA	75%(4)	NA
	Cérebro	ND (2)	ND (5)	75% (6)	20% (5)	ND (4)	100% (4)
	Hipófise	NA	ND (5)	ND (4)	80% (5)	ND (4)	100% (4)
	Olhos	ND (2)	NA	ND (6)	NA	ND (4)	NA
Órgãos abdominais	Baço	ND (2)	ND (5)	66,6%(6)	100% (4)	25% (4)	100% (4)
	Fígado	ND(2)	ND (5)	33,3%(6)	60% (5)	25% (4)	100% (4)
	Gordura e LN mesentérico	NA	NA	25% (4)	NA	100%(4)	NA
Órgãos do trato gastrointestinal	Esôfago	ND (2)	25% (4)	16,6% (6)	100% (1)	50% (4)	100% (3)
	Estômago	ND (2)	75% (4)	ND (6)	25% (4)	50% (4)	100% (3)
	Intestino Delgado	ND (2)	20% (5)	50% (6)	100% (3)	75% (4)	100% (4)
	Intestino Grosso	ND (2)	20% (5)	16,6% (6)	ND (4)	75% (4)	100% (4)
Órgãos Genitais	Órgãos sexuais masc.	ND (2)	NA	33,3% (6)	NA	100% (4)	NA
Órgãos tórax	Coração	ND (2)	20% (5)	ND (6)	80% (5)	50% (4)	100% (4)
	Pulmão	ND (2)	NA	ND (6)	NA	25% (4)	NA

Biol.: Bioluminescência; n: número total de animais analisados; LN: linfonodo; NA- não analisado ND- não detectado.

4.8. Análise da distribuição do *T. cruzi* ao longo da fase aguda da infecção oral, intragástrica, intravenosa e subcutânea.

Estudos vêm demonstrando que o local inicial de entrada do parasito, é um fator chave na patogênese da doença de Chagas podendo afetar criticamente na manifestação clínica, no período de incubação e na sobrevivência do hospedeiro. Estudos experimentais mostraram que a via de inoculação do *T. cruzi*, via sistêmica ou mucosa, tem impacto na sobrevivência do hospedeiro. Dados do nosso grupo demonstraram que a **IO** é diferente da infecção intragástrica (**IG**) com maior parasitemia e mortalidade e diferenças nos órgãos afetados. Os animais **IO** apresentam maior hepatite, porém uma menor cardite em relação aos camundongos **IG**. Para melhor entendermos a importância da porta de entrada do parasito na

evolução da infecção aguda da doença de Chagas, pretendemos identificar as diferenças de distribuição do *T. cruzi* nas vias de infecção oral, intragátrica, intravenosa e subcutânea.

Para isto, camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via **IO**, **IG**, subcutânea (**SC**) e intravenosa (**IV**) com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene da luciferase, e analisados por imagem *in vivo* de bioluminescência com 15min e 7, 14 e 21 dias pós-infecção.

Com 15 min pós-infecção, observamos que na **IO**, **IG** e **SC**, como esperado, as principais regiões com presença de bioluminescência foram próximas ao local de inoculação, na **IO** a principal região foi principalmente a cavidade oral (Figura 4.10 A), na **IG** a região abdominal (Figura 4.10 B) e na **SC** a região do membro posterior direito (Figura 4.10 C). Já na **IV**, observamos a presença do sinal de bioluminescência em quase todas as regiões do corpo, demonstrando que a inoculação intravenosa foi bem sucedida e o parasito através da circulação sanguínea se disseminou para todas as regiões do corpo, se concentrando principalmente na região torácica, um dos principais locais com maior fluxo sanguíneo (Figura 4.10 D).

Com 7 dpi observamos diferenças na distribuição do parasito entre as vias de inoculação, nos camundongos **IO**, observamos que a principal região infectada foi próximo a cavidade oral (Figura 4.10 A), já nos camundongos **SC** foi a região abdominal e genital mais próximos ao local de inoculação (Figura 4.10 C). Além disso, na **IV** detectamos a presença do *T. cruzi* em todas as regiões do corpo do animal, principalmente na região abdominal e genital (Figura 4.10 D). Curiosamente na **IG** não observamos sinais de infecção, provavelmente devido a uma baixa emissão de bioluminescência, já que com 14dpi esse animal voltou apresentar imagem de bioluminescência (Figura 4.10 B).

Com o avançar da infecção, com 14 e 21 dpi, observamos a disseminação do parasito para outras regiões do corpo em todas as vias de inoculação. No entanto, com 21dpi, observamos uma diminuição na distribuição do sinal de bioluminescência, apresentando pequenos focos em regiões específicas, como genital, abdominal e boca, em todas as vias de inoculação. Vale ressaltar que nesse ponto de infecção, a região genital foi a principal região com sinal de bioluminescência em todas as vias de inoculação (Figura 4.10).

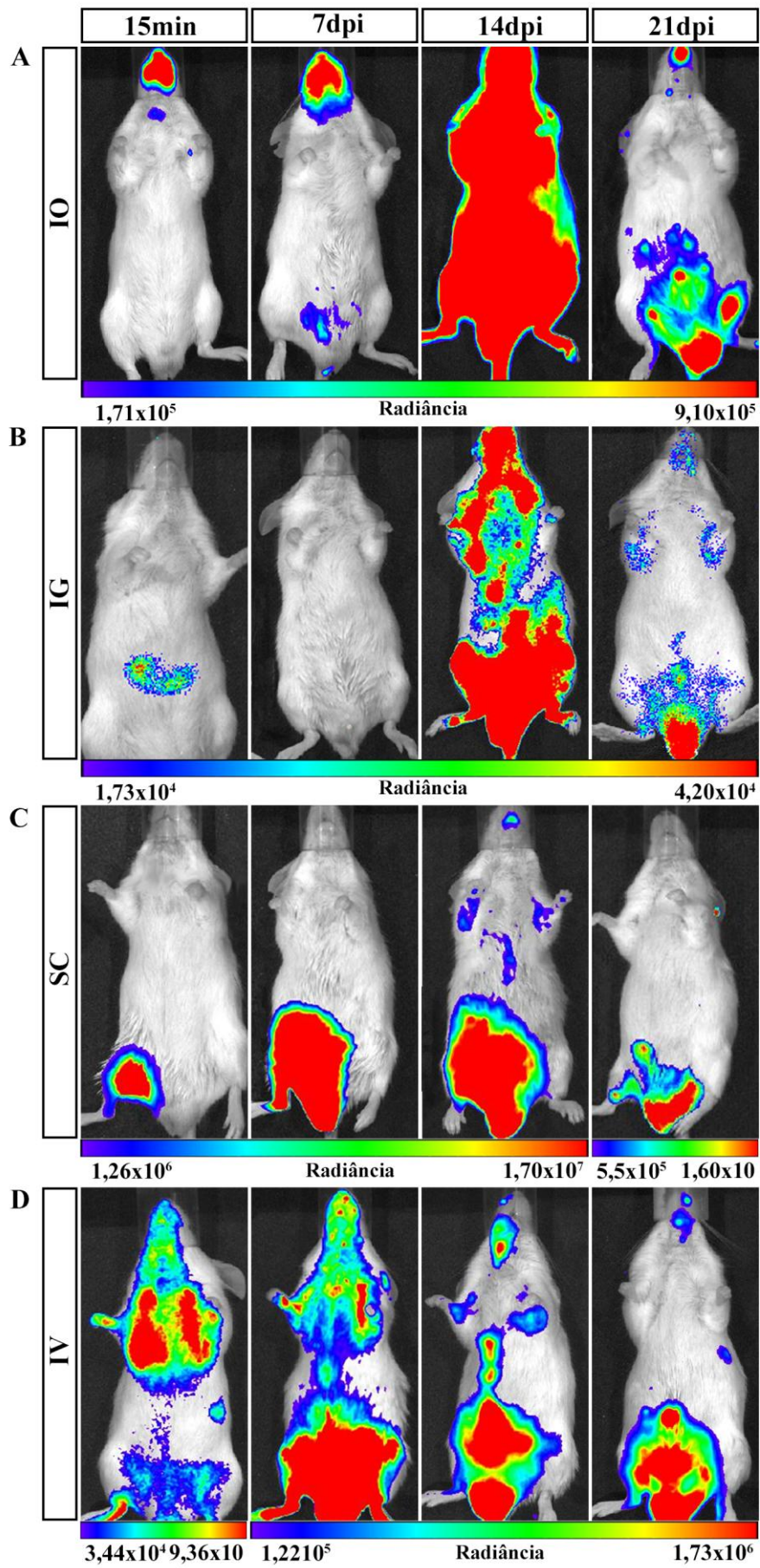


Figura 4.10. Imagens *in vivo* de bioluminescência de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* por via oral, intragástrica, subcutânea e intravenosa durante a infecção aguda. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral (**IO**), intragástrica (**IG**), subcutânea (**SC**) e intravenosa (**IV**) com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. O monitoramento *in vivo* da infecção foi realizado nos mesmos animais nos diferentes tempos, usando o sistema de imagem IVIS® Lumina (Xenogen) e a administração da D-luciferina foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. **(A)** Imagens *in vivo* dos animais **IO** com 15min (n=5), 7 dpi (n=6), 14dpi (n=3) e 21dpi (n=6), que apresentaram sinais de bioluminescência. **(B)** Imagens *in vivo* dos animais **IG** com 15min, 7 dpi, 14dpi e 21dpi (n=1), que apresentaram sinais de bioluminescência. **(C)** Imagens *in vivo* dos animais **SC** com 15min, 7 dpi, 14dpi e 21dpi (n=2), que apresentaram sinais de bioluminescência. **(D)** Imagens *in vivo* do animal **IV** com 15min, 7 dpi, 14dpi e 21dpi (n=1). A barra de escala de cores (abaixo) está relacionada com a intensidade da radiação (fótons/segundos/cm²/esferorradiano), onde o azul e o vermelho indicam o mínimo e o máximo de intensidade de sinal, respectivamente. Os valores dos sinais máximo e mínimo são indicados à direita e à esquerda, abaixo da barra de escala de cores, respectivamente.

Para melhor compreendermos os tecidos e órgãos afetados realizamos a avaliação *ex vivo* por imagem de bioluminescência com 21dpi. Ao analisarmos os órgãos, detectamos sinal de bioluminescência elevado nos órgãos sexuais masculinos, principalmente no epidídimo e glândula prepucial, neste ponto de infecção em todas as vias de inoculação (Figura 4.11). Além dos órgãos sexuais, os órgãos do trato gastrointestinal também apresentaram sinal de bioluminescência em todas as vias de infecção, principalmente o intestino grosso. Em algumas vias de inoculação observamos o parasito em órgãos específicos, detectamos o sinal de bioluminescência no coração nas vias **IO**, **IG** e **SC**. Presença do sinal de bioluminescência foi detectada na glândula salivar nas vias **IO** e **IG** e no baço somente na via **IO**. Focos de bioluminescência foram observados no pulmão e fígado nas vias **IO** e **SC**. Além disso, a presença do *T. cruzi* foi também observada no olho na via **SC** (Figura 4.11).

Em conjunto observamos que dependendo da via de inoculação, nos momentos iniciais da infecção (15min e 7dpi), temos um comportamento distinto em relação às regiões do corpo que são afetadas e provavelmente os órgãos e tecidos infectados. No entanto, de uma maneira geral, com o avançar da infecção (14 e 21dpi), todas as vias apresentam uma distribuição sistêmica do parasito. Com sinal de bioluminescência principalmente na região genital e abdominal, e uma preferência do parasito pelos órgãos sexuais masculinos e do trato gastrointestinal.

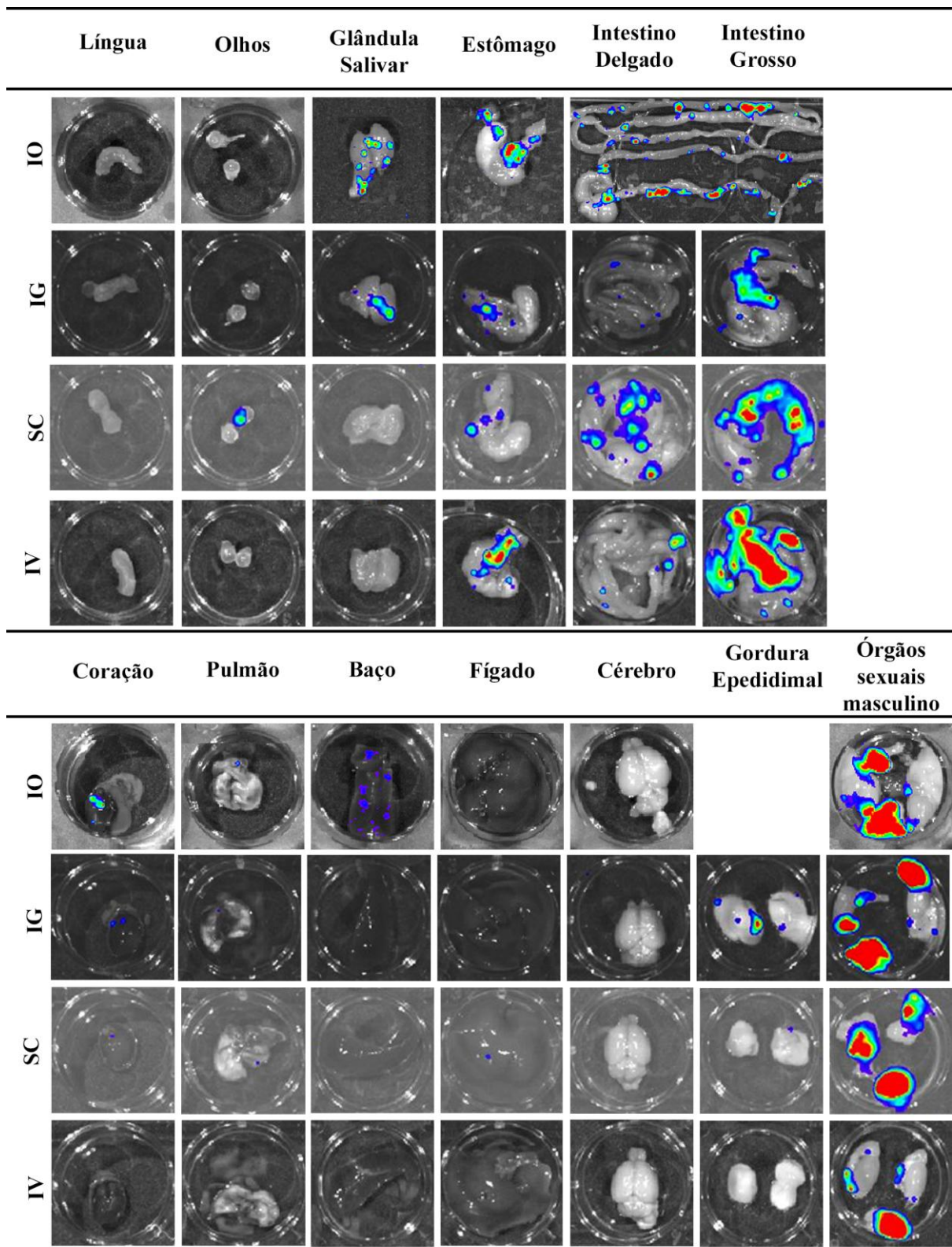


Figura 4.11. Imagens *ex vivo* de bioluminescência representativas dos órgãos e tecidos dos camundongos infectados por via oral, intragástrica, subcutânea e intravenosa com 21dpi. Camundongos BALB/c machos de 6-8 semanas foram infectados por via oral (IO), intragástrica (IG), subcutânea (SC) e intravenosa (IV) com 1×10^6 formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Dm28c-luc, geneticamente modificada para expressar o gene reporter da luciferase. O monitoramento *ex vivo* da infecção foi realizado com 21 dias pós-infecção. Os órgãos e tecidos foram recolhidos e as imagens foram capturadas usando o sistema IVIS® Lumina (Xenogen). A administração da D-luciferina foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Observamos que os principais órgãos que

apresentaram bioluminescência foram o intestino grosso, os órgãos sexuais e o estômago. A escala de cores está relacionada com a intensidade da radiação, onde o azul e o vermelho indicam o mínimo e o máximo de intensidade de sinal, respectivamente. A distribuição dos órgãos sexuais masculinos: testículo no lado esquerdo e direito e a glândula prepucial na parte inferior e na infecção oral: testículo no lado esquerdo e direito, com a gordural epididimal aderida, a glândula prepucial na parte inferior e o penis na parte superior.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, surtos por infecção oral da doença de Chagas têm sido descritos no Brasil e em outros países da América Latina, como Colômbia, Guiana Francesa, Bolívia, Argentina e Equador (da Silva *et al.*, 1968, Sanchez and Ramirez, 2013, Toso *et al.*, 2011). Atualmente, a infecção oral é a principal via de transmissão no Brasil, sendo responsável por aproximadamente 70% dos casos agudos da doença (Ministério da Saúde, 2015). Os pacientes infectados pela via oral têm demonstrado uma fase aguda mais intensa, com febre de longa duração, dor de cabeça, edema facial, edema palpebral, edema de membros inferiores, mialgia, dor abdominal, meningoencefalite e miocardite. Além disso, a infecção oral tem uma alta taxa de mortalidade durante as primeiras semanas de infecção, estimada em 8-35%, maior que a da transmissão vetorial clássica (<5-10%) (Rueda *et al.*, 2014, Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012, Toso *et al.*, 2011).

Apesar de ser uma importante via de infecção, há poucos estudos sobre a transmissão oral, além disso, o local exato e os tecidos-alvo envolvidos na entrada do parasito no hospedeiro descritos na literatura ainda são controversos. Estudos anteriores realizados por Diaz-Ungría e colaboradores, utilizando técnicas histopatológicas, demonstraram possíveis sinais de invasão do *T. cruzi* na cavidade oral, no esôfago, no estômago e no intestino, onde se observou uma reação inflamatória local com eosinofilia, infiltrado de linfócitos e monócitos, após infecção oral em cães (de Noya, 2015, Diaz-Ungría and Bracho, 1970). No entanto, outros estudos realizados em camundongos infectados pela via oral com o *T. cruzi*, sugeriram que a invasão do epitélio da mucosa gástrica é a principal porta de entrada para a infecção sistêmica. Hoft e colaboradores infectaram pela via oral camundongos com cepa Tulahuén do *T. cruzi* e realizaram análises histopatológicas (HE) nos tecidos da cabeça, glândula salivar, coração, pulmão, trato gastrointestinal (esôfago, estômago e intestinos), linfonodo mesentérico, baço, fígado, rim e músculo esquelético. Com 4 dpi observaram a presença de uma reação inflamatória no estômago, não sendo observada nos outros tecidos analisados. Já com 14 dpi, as lesões inflamatórias foram encontradas em diferentes órgãos, como estômago, pâncreas, baço, fígado, medula óssea, coração, estômago, duodeno, glândula adrenal, cérebro e músculo esquelético. Nas análises imunohistoquímicas, observaram a presença do *T. cruzi* na mucosa gástrica com 4 e 14 dpi, porém não detectaram o parasito no esôfago e nem na orofaringe, sugerindo então que na **IO** a entrada do parasito ocorre através do epitélio da mucosa gástrica e a partir deste tecido se estabelece uma infecção sistêmica (Hoft *et al.*, 1996). Em vista disso, outros grupos passaram a utilizar protocolos de infecção intragástrica (**IG**) ou intrafaringeana no estudo da infecção oral, facilitando o direcionamento dos parasitos

para o estômago. Nesses estudos foram analisados, dentre outros fatores, aspectos moleculares da interação do parasito com mucosa gástrica, mostrando que as glicoproteínas, gp82 e gp30, presentes na superfície do parasito são resistentes ao suco gástrico e ligam-se à mucina gástrica, permitindo a invasão e replicação do parasito na célula (Cortez *et al.*, 2006, Covarrubias *et al.*, 2007, Staquicini *et al.*, 2010, Yoshida, 2009). Esses estudos consideravam a infecção oral e intragástrica como vias similares de infecção. Nossos dados sugerem que, a cavidade oral não pode ser excluída, uma vez que, observamos que a principal região afetada na **IO** são os tecidos da cavidade oral e adjacências e não o estômago (Figura 4.4 A e 4.6 A). Demonstramos que nos momentos iniciais da **IO** (15, 60 min e 48h), o *T.cruzi* se concentra principalmente na região da cavidade oral, especificamente na região nasomaxilar (Figura 4.4 A). Da mesma forma, com 7 dpi, as imagens de bioluminescência revelaram que a região nasomaxilar permanecia como o principal foco da **IO** e, em conjunto, com os outros tecidos da cavidade oral e adjacências, como palato, músculo da bochecha, mandíbula e linfonodos mandibulares apresentaram o maior percentual de órgãos infectados (Figura 4.6 A e B e Tabela 4.3). Além disso, o *T. cruzi* foi detectado principalmente na cavidade nasal e no linfonodo mandibular com 60 min pós-infecção por qPCR (Figura 4.8 A e B). Em conjunto, os nossos dados demonstraram que a cavidade oral é o principal local de infecção e interação do *T. cruzi* com o hospederiro nos momentos iniciais da **IO**. Esses resultados corroboram os resultados do nosso grupo que demonstram que a infecção por via oral é diferente da infecção por via intragástrica, apresentando taxa de mortalidade, produção de citocinas e órgão afetados distintos. Nesse trabalho, foi observado que os camundongos **IO** desenvolvem uma doença aguda mais grave, com maior parasitemia, mortalidade e maiores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias em comparação aos camundongos **IG**. Estes dados em conjunto com nossos resultados, demonstram que o primeiro tecido-alvo de entrada do parasito é diferente entre as vias **IO** e **IG**, e que isso pode afetar a sobrevivência e a resposta imune sistêmica do hospedeiro (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015).

O estômago e o intestino podem ser alvos do *T.cruzi*, uma vez que, o parasito foi detectado nessas regiões no início da infecção, e animais inoculados diretamente no estômago (**IG**) apresentam infecção aguda (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015, Cortez *et al.*, 2003, Domingues *et al.*, 2015). Além disso, a infecção por via **IG** não parece ser a mais efetiva, visto que, como já descrito pelo nosso grupo e em outro estudo, o percentual de animais infectados por via **IG** é baixo, 49,3% (cepa Tulahuén) e 36% (cepa SC2005), respectivamente (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015, Domingues *et al.*, 2015).

A cavidade oral tem sido descrita como o local de várias infecções virais, bacterianas e fúngicas, como herpes vírus tipo 1 e 2, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, entre outras

(Salvatori *et al.*, 2016, Stoopler and Sollecito, 2014, Yee, 2016). A superfície da cavidade oral apresenta diferentes tipos de epitélios, desde epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado até ortoqueratinizado, compostos por estruturas e moléculas especializadas (Treuting *et al.*, 2012). A mucosa oral é coberta por um filme de muco que consiste de lipídeos, mucinas e outras proteínas, como imunoglobulinas, fatores de crescimento, dentre outras. As mucinas são grandes glicoproteínas, consideradas como primeira linha de defesa da cavidade oral, impedindo a ligação de certos patógenos ao epitélio ou formando agregados facilitando a eliminação pelo organismo, porém alguns patógenos podem se ligar as estruturas de carboidrato, presentes nas mucinas, como ácidos siálicos, facilitando o acesso dos patógenos às células epiteliais, promovendo a invasão celular (Derrien *et al.*, 2010, Tabak, 1995, Wu *et al.*, 2014). Já foi descrito que o *Streptococcus* sp. adere às mucinas salivares que revestem a superfície do dente, sendo um dos primeiros passos para a formação da placa dentária (Murray *et al.*, 1992). Estudos utilizando a *Tannerella forsythia*, uma das principais bactérias responsáveis pela periodontite, demonstraram que os ácidos siálicos presentes na cavidade oral são importantes para a adesão e invasão dessas bactérias nas células epiteliais da boca. Nesse estudo, demonstraram que a inativação da sialidase NanH, por mutação ou inibição, diminuía a adesão e invasão da *T. forsythia* em linhagens de cultura de células epiteliais de gengivas humanas (OBA-9) e que essa ligação era específica para o α -2-3 ácido siálico presente na superfície das células epiteliais (Honma *et al.*, 2011, Roy *et al.*, 2011). Estudo recente desenvolvido por Lakdawala e seus colaboradores demonstrou que o palato mole é um importante local de infecção e adaptação do vírus da gripe A, podendo fornecer um microambiente rico em mucinas e ácidos siálicos, o principal ligante da hemaglutinina do vírus da gripe. A presença dos ácidos siálicos facilita a infecção, sendo talvez a região inicial de entrada do vírus. A expressão do α -2,3 ácido siálico, um dos ligantes do vírus, foi descrita no palato mole em regiões da superfície da cavidade oral, principalmente nas células basais, e na região da nasofaringe de humanos (Lakdawala *et al.*, 2015). Curiosamente, o α -2,3 ácido siálico é a principal molécula ligante da transialidase presente na superfície do *T. cruzi*. Entre todas as moléculas conhecidas, a transialidase tem sido considerada como um dos principais fatores de virulência do *T. cruzi*, principalmente quanto à sua capacidade para limitar a resposta imune do hospedeiro bem como mediar a adesão celular do parasito à célula (Freire (Freire-de-Lima *et al.*, 2015). Recentemente, estudos sobre a capacidade da adesão da transialidase, demonstraram que a interação da transialidase com ácidos siálicos gera um sinal de "eat me" (coma-me) nas células epiteliais, o que poderia facilitar a entrada do parasito em células não fagocíticas, uma vez que, os tecidos epiteliais representam uma barreira natural para as infecções, pois as células epiteliais são consideradas não susceptíveis a realizarem

fagocitose de grandes corpos, tais como parasitos (Butler *et al.*, 2013). Além disso, vários componentes moleculares das células hospedeiras e do parasito participam da invasão da célula pelo *T. cruzi* (Barrias *et al.*, 2013). Moléculas envolvidas na adesão, como a transialidase, glicoproteínas, entre outras moléculas, podem estar envolvidas na interação do *T. cruzi* com a mucosa da cavidade oral. Possivelmente, o início da infecção do *T. cruzi* por **IO** ocorra através da interação com a superfície do palato, visto que, em todos os momentos da infecção a região com maior quantidade de parasito foi a cavidade nasal, adjacente ao palato. Curiosamente, o edema na face é uma das manifestações clínicas mais comuns em pacientes infectados pela via oral, presente em 57 a 100% dos casos no Brasil (Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). No surto de 1986 no estado da Paraíba, 92% dos pacientes apresentaram edema de face relacionado com a ingestão de caldo de cana contaminado. Na Venezuela após um surto com suco de goiaba fresco, 40% dos pacientes hospitalizados apresentam incidência de edema facial (Alarcon de Noya *et al.*, 2013). Em outro surto na Venezuela envolvendo cinco membros da mesma família, estes apresentaram edema na face, principalmente na boca, na parte interna das bochechas, além de edema e parestesia da língua (Añez *et al.*, 2013). Outras manifestações clínicas, como gengivite e tosse seca, têm sido atribuídas à penetração do parasito pela cavidade oral ou faringe (Alarcon de Noya *et al.*, 2010). Curiosamente, a infecção do *T. cruzi* com focos inflamatórios na gengiva tem sido demonstrada em pacientes com doença de Chagas crônico (Anez *et al.*, 2011). Estes dados podem ser associados com os nossos resultados, que descrevem pela primeira vez, a região nasomaxilar como principal tecido-alvo após infecção por via oral com *T. cruzi*.

Com 7 dpi observamos que os tecidos da cavidade oral e outros tecidos da cabeça, como cavidade nasal, palato, músculo da bochecha, mandíbula, linfonodo mandibular e cérebro, foram os principais tecidos infectados na **IO**. Surpreendentemente, a média da carga parasitária detectada por qPCR na cavidade nasal foi 10^3 vezes mais elevada do que nos outros tecidos, sugerindo que a cavidade nasal é o principal sítio de manutenção e de replicação do *T. cruzi* durante a **IO**. Giddings e colaboradores também observaram que a cavidade nasal é um dos principais tecidos infectados após inoculação conjuntival com *T. cruzi* da cepa Tulahuén (TcVI) em camundongos. Ao analisarem por PCR e imunohistoquímica a cavidade nasal, o ducto lacrimal, os linfonodos de drenagem (mandibular e parotídeo) e o baço, observaram com 3 e 5 dpi que 33% e 44% dos animais apresentavam infecção na cavidade nasal com ducto lacrimal e nos linfonodos, respectivamente e não encontraram nenhuma evidência no baço. Com 6 e 8 dpi observaram que a cavidade nasal e o ducto lacrimal apresentavam a maior porcentagem de infecção entre os órgãos analisados, já com 12 e 14 dpi, 100% dos animais apresentavam infecção na a cavidade nasal, no ducto lacrimal e nos linfonodos de drenagem,

enquanto que 44% dos animais apresentavam infecção no baço. Ninhos de amastigotas foram observados por imunohistoquímica em diferentes regiões da cavidade nasal, incluindo o epitélio de revestimento, a submucosa do epitélio de revestimento do septo nasal, o tecido linfóide nasal associado (NALT) e a medula óssea dos ossos faciais em torno da cavidade nasal. Estes dados demonstram que após a inoculação conjuntival a invasão e a replicação do *T. cruzi* ocorrem predominantemente no epitélio de revestimento do ducto nasolacrimal, da cavidade nasal e linfonodo de drenagem e a partir desses tecidos o parasito se dissemina para outras regiões do corpo (Giddings *et al.*, 2006)

Em outro estudo, camundongos infectados com *T. cruzi* cepa Tulahuén (TcVI) por via intranasal apresentaram maior parasitismo no cérebro do que camundongos infectados pela via subcutânea. Os autores propuseram que nos primeiros momentos da infecção, os parasitos invadem as células da cavidade nasal, multiplicam-se e, em seguida, migram para o cérebro através dos tecidos olfatórios da cavidade nasal (Caradonna and Pereiraperrin, 2009). Existem aproximadamente 2 milhões de neurônios sensoriais olfativos presentes no epitélio olfatório da cavidade nasal do camundongo que formam feixes de nervos que se projetam para o bulbo olfatório no cérebro, através da lâmina crivosa do osso etmóide, que separa a cavidade nasal do cérebro (Treuting *et al.*, 2012). Na mesma linha, observamos que nos momentos iniciais da **IO**, o *T. cruzi* predomina na cavidade nasal, não sendo detectado no cérebro ou no bulbo olfatório. Com 7 dpi a presença do *T. cruzi* é observada por imagem de bioluminescência no bulbo olfatório. No entanto, o parasito não foi detectado na região central do cérebro, nesse momento, por qPCR, estando presente apenas com 21 dpi. Isto sugere que a infecção do cérebro é posterior à da cavidade nasal e provavelmente ocorra através dos tecidos nervosos olfativos. Detectamos também o *T. cruzi* por qPCR na hipófise dos animais **IO** com 7 e 21 dpi. A infecção na hipófise pelo *T. cruzi* já foi descrita por Corrêa-de-Santana e colegas, que detectaram DNA de *T. cruzi* na hipófise após infecção intraperitoneal com a cepa Colombiana (Correa-de-Santana *et al.*, 2006). A infecção pelo *T. cruzi* tem sido associada a perturbações nos sistemas imune e endócrino, levando à ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), com elevação da produção de glicocorticóides. A secreção de glicocorticóides alta parece limitar a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, protegendo o hospedeiro de uma lesão tecidual e alterações metabólicas. Além disso, a produção de glicocorticóide na fase aguda está relacionada com a atrofia do timo e a apoptose de células T imaturas CD4⁺CD8⁺ (Roggero *et al.*, 2009, Roggero *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que a via de transmissão, é um fator chave na patogênese da doença de Chagas, podendo ter impacto diretamente nas manifestações clínicas e na resistência do hospedeiro (de Meis *et al.*, 2013, de Noya, 2015). No maior surto por

infecção oral registrado na Venezuela, com 103 pessoas infectadas, 75% dos pacientes apresentaram sintomatologia, semelhantes às estimativas da infecção por transfusão de sangue com cerca de 80% dos pacientes sintomáticos. Por outro lado, indivíduos infectados pela via vetorial apresentam-se assintomáticos, apenas 1 em cada 30 indivíduos infectados (3%) apresentam sintomas. O período de incubação varia de acordo com a via de infecção. A transmissão pelas vias vetorial e oral apresentam um período de incubação semelhante, de 4 a 15 dias e 3 a 22 dias, respectivamente. Por transfusão de sangue o tempo de incubação é diferente, varia de 8 a 120 dias. A via de transmissão também pode interferir na taxa de mortalidade. Foi demonstrado que a infecção por via oral pode apresentar uma alta mortalidade de 8-35%, maior que a observada na transmissão vetorial clássica, estimada em < 5-10% (Rueda *et al.*, 2014, Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012).

Estudos em modelos experimentais, utilizando diferentes vias de infecção, demonstraram que a via de inoculação interfere significativamente na suscetibilidade do hospedeiro. Foi demonstrado que camundongos infectados com a cepa *Peruvian* do *T. cruzi* (TcII) por vias sistêmicas (intraperitoneal, **IV** ou **SC**) apresentam maiores taxas de infecção e mortalidade quando comparados à infecção por vias de mucosas (**IO**, **IG**, intra-rectal, órgão genital, ou conjuntiva) (Marsden, 1967). Resultados semelhantes foram observados por Caradonna e Pereiraperrin em camundongos infectados por via subcutânea com a cepa Tulahuén (TcVI) do *T. cruzi* que apresentaram maior mortalidade do que camundongos infectados por via intranasal (Caradonna and Pereiraperrin, 2009). Dados do nosso grupo, demonstraram que camundongos infectados com *T. cruzi*, cepa Tulahuén (TcVI), pela via **IO** ou **IG**, apresentam diferenças na suscetibilidade e na produção de citocinas. Os camundongos **IO** desenvolvem uma doença aguda mais grave com maior parasitemia e mortalidade, em comparação aos camundongos **IG**. Na histopatologia do coração foram observadas maiores áreas de infiltrado inflamatório nos animais **IG**, enquanto que lesões hepáticas foram mais graves nos animais **IO**, acompanhadas por maiores níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). O padrão de citocinas analisadas foi diferente, os animais **IO** apresentaram maiores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , do que os animais **IG**, que apresentaram maiores níveis de TGF- β e IL-17. Além disso, a mortalidade dos animais **IO** estava associada a altos níveis de TNF- α , sendo parcialmente revertida como tratamento dos animais **IO** com anti-TNF (etanercept) (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015). Estes trabalhos em conjunto demonstram que a via de entrada do parasito no hospedeiro é um fator fundamental na progressão da doença de Chagas, sendo passível de afirmar que, após a entrada do parasito no organismo, as primeiras células-alvo

podem contribuir para o desenvolvimento de uma resposta imune local que terá impacto na imunidade sistêmica e na sobrevivência do hospedeiro (de Meis *et al.*, 2013).

Estes estudos podem ser associados aos nossos resultados que demonstram que nos momentos iniciais da infecção (15 min e 7 dpi), as principais regiões infectadas são diferentes entre as vias de infecção (**IO**, **IG**, **SC** e **IV**) e conseqüentemente as primeiras células e tecidos alvos. Observamos que na **IO**, a principal região afetada foi a região da cavidade oral, principalmente a região nasomaxilar, já na **IG** a principal região infectada foi a região do abdômen, compreendendo o estômago e intestinos. Enquanto ao analisarmos os animais infectados por via **SC**, observamos a presença do parasito na região do membro posterior e abdômen, já na **IV** observamos a presença do sinal de bioluminescência em quase todas as regiões do corpo (Figura 4.10). Estas diferenças nas regiões infectadas podem estar associadas às diferenças na modulação da resposta imune e na sobrevivência. Esta modulação da resposta imune e na evolução da doença também já foi observada em infecções bacterianas. Foi demonstrado que a infecção por via de mucosa (intranasal ou **IO**) com *Listeria monocytogene* ou *Streptococcus pyogenes* ou *Francisella tularensis* promove uma resposta do tipo T_H17, enquanto que a infecção por via sistêmica (**IV** ou **SC**) desencadeia uma resposta do tipo T_H1 (Hu and Pasare, 2013).

Curiosamente, com o avançar da infecção (14 e 21 dpi) e disseminação do *T. cruzi* ao longo do corpo, todas as vias apresentam sinal de bioluminescência principalmente na região genital, sendo confirmada na análise *ex vivo*, a presença do parasito principalmente nos órgãos sexuais masculinos (testículos, gordura epididimal, glândula prepucial e epidídimo). Como descrito em trabalhos anteriores, os órgãos sexuais masculinos são regularmente parasitados em infecções experimentais pelo *T. cruzi* (Carvalho *et al.*, 2009, Carvalho *et al.*, 1991, Lenzi *et al.*, 1996). Carvalho e colaboradores observaram com 15 dpi a presença do *T. cruzi* nos testículos, ductos e glândulas sexuais acessórias (próstata, glândula prepucial e vesícula seminal) de camundongos infectados com a cepa Bolívia (Carvalho *et al.*, 1991). O parasito foi observado na camada muscular, presente nos ductos deferentes, próstata, testículo, vesícula seminal e epidídimo, já na glândula prepucial os ninhos de amastigotas foram observados dentro das células secretoras. Foram observadas também formas amastigotas no lúmen do epidídimo misturadas com espermatozoides (Carvalho *et al.*, 1991). Lenzi e colaboradores também observaram uma grande quantidade do *T. cruzi* nos órgãos reprodutivos masculinos, presente nos ductos deferentes, próstata, vesícula seminal, penis, epidídimo, glândula prepucial, glândula bulbouretral, glândula uretral e testículo com 15 dpi em camundongos infectados via intraperitoneal com a cepa CL (Lenzi *et al.*, 1996). Curiosamente os dois trabalhos relatam que o parasitismo foi mais intenso na glândula prepucial e no

epidídimo, corroborando os nossos dados, em que observamos nesses órgãos um sinal de bioluminescência mais intenso quando comparados com o testículo e a gordura epididimal (Carvalho *et al.*, 1991, Lenzi *et al.*, 1996). Já foi relatada também a presença do *T. cruzi* nos órgãos reprodutivos femininos como ovário, oviduto, clitóris e vagina, sendo menos intenso no útero (Lenzi *et al.*, 1996).

Em humanos alguns casos de orquite já foram descritos, causados por parasitismo gonadal presente nas células do epitélio germinativo durante a fase aguda da doença de Chagas (Hartz and Toledano, 1954). Em outros estudos, evidências de disfunções na espermatogênese e lesão nas células germinativas, assim como depleção da população de células Leydig foram observadas nos testículos de homens chagásicos, embora não tenha sido detectado o parasito. Além disso, manifestações clínicas de disfunções sexuais, como diminuição da libido, da ereção e da ejaculação, já foram descritas em alguns pacientes (Carvalho *et al.*, 1982b, Carvalho *et al.*, 1982a, Haddad and Raia, 1969).

Estes dados sugerem a possibilidade da transmissão da doença de Chagas pela via sexual. Já foi demonstrado que a inoculação de semen proveniente de camundongos infectados na fase aguda da infecção, na cavidade peritoneal de animais saudáveis leva a uma infecção com presença de ninhos de amastigotas no coração (Alencar *et al.*, 1991). Em outro estudo, em que foi realizado o acasalamento de machos infectados com *T. cruzi* (cepa CL), pela via **IP** na fase aguda da infecção, com fêmeas não infectadas e imunossuprimidas, foi observada a infecção por PCR de uma fêmea num total de 61 acasalamentos, indicando um potencial baixo, mas não risco zero da transmissão sexual do *T. cruzi* do macho para fêmea na fase aguda da infecção (Martin *et al.*, 2015). Ribeiro e colaboradores avaliaram o potencial da transmissão sexual do *T. cruzi* de machos infectados para fêmeas não infectadas e *vice-versa* na fase crônica da infecção, utilizando camundongos infectados com a cepa Berenice pela via **IP** e observaram que 100% dos animais, tanto machos quanto fêmeas, apresentaram soroconversão (ELISA e IF) e presença de DNA de *T. cruzi* no coração e músculo esquelético, após a cópula, apesar de somente 20% desses animais apresentarem parasitemia. Estes dados confirmam pela primeira vez a transmissão sexual do *T. cruzi* na fase crônica da infecção, sendo de grande importância, uma vez que a maioria dos indivíduos com doença de Chagas, está na fase crônica da infecção (Ribeiro *et al.*, 2015). No ser humano, há descrição de casos de transmissão ao homem pelo sangue menstrual após relações sexuais com mulheres com doença de Chagas aguda. A possibilidade de transmissão sexual aumenta muito a partir de indivíduos com alta parasitemia (em fase aguda ou imunossuprimidos), recomendando-se a prevenção sexual (Coura *et al.*, 2007, Dias *et al.*, 2011).

Nossos dados demonstram que nos momentos iniciais da infecção pelo *T. cruzi*, diferentes regiões do corpo são afetadas dependendo da via de inoculação e consequentemente diferentes órgãos e tecidos são infectados. No caso da **IO**, observamos que a cavidade nasal é o principal local de infecção e multiplicação do *T. cruzi*. Porém, os estudos dos aspectos patológicos da infecção em modelos experimentais, têm sido direcionados principalmente para o coração e o trato gastrointestinal que são os principais tecidos acometidos nas manifestações clínicas, subestimando-se a importância de outros órgãos e tecidos na patogênese da doença de Chagas. Nossos dados mostram que o *T. cruzi* é capaz de invadir uma grande variedade de órgãos e tecidos dependendo da via de inoculação/transmissão, o que poderia influenciar o estabelecimento da doença e consequentemente modular a resposta imune, mortalidade e manifestações.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram claramente que a cavidade oral, especificamente a região nasomaxilar, é o principal local de interação do *T. cruzi* logo após a infecção oral, levando à infecção na fossa nasal.

No início da infecção observamos que o *T. cruzi* é capaz de infectar principalmente as regiões adjacentes à cavidade oral (como cavidade nasal e linfonodo mandibular) além do estômago, porém a cavidade nasal é o principal foco de permanência e replicação do *T. cruzi* após **IO**. A persistência do sinal de bioluminescência emitido pela região nasomaxilar em todos os pontos analisados, sugere uma manutenção da proliferação do parasito nesta região.

Estes resultados mostram a cinética da disseminação do parasito pela via oral, a partir da cavidade oral o *T. cruzi* infecta principalmente a cavidade nasal, e após multiplicação nesse órgão se dissemina para outros órgãos (hipófise, cérebro, coração, baço e fígado)

Demonstramos também que dependendo da via de inoculação do parasito, nos momentos iniciais da infecção (15min e 7dpi), temos um comportamento distinto em relação às regiões do corpo que são afetadas e provavelmente os órgãos e tecidos infectados. No entanto, de uma maneira geral, com o avançar da infecção (14 e 21dpi), todas as vias apresentam uma distribuição sistêmica do parasito. Com sinal de bioluminescência principalmente na região genital e abdominal, e uma preferência do parasito pelos órgãos sexuais masculinos e do trato gastrointestinal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamsohn I. A., Coffman R. L. *Trypanosoma cruzi* : IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol.* 1996;84(2):231-44.
- Alarcon de Noya B., Diaz-Bello Z., Colmenares C., Ruiz-Guevara R., Mauriello L., Zavala-Jaspe R., *et al.* Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010;201(9):1308-15.
- Alarcon de Noya B., Veas J., Ruiz-Guevara R., Martín A., Rojas C., Machado I., *et al.* Clinical and laboratory evaluation of hospitalized patients from the first oral transmitted urban outbreak of Chagas disease in Venezuela. *Rev Patol Trop* 2013;42:177-86.
- Andrade L. O., Machado C. R., Chiari E., Pena S. D., Macedo A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;100(2):163-72.
- Andrade S. G., Magalhaes Ldos A., Pessina D. H. Importance of TNF-alpha in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi* : influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(1):21-6.
- Andrade Z. A., Silva H. R. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi* . *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995;90(4):521-2.
- Andriani G., Chessler A. D., Courtemanche G., Burleigh B. A., Rodriguez A. Activity in vivo of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds selected from a high throughput screening. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1298.
- Anez N., Crisante G., Caraballo F., Delgado W., Parada H. *Trypanosoma cruzi* persistence at oral inflammatory foci in chronic chagasic patients. *Acta Trop.* 2011;117(3):207-11.
- Añez N., Crisante G., Rojas A., Dávila D. Acute Chagas disease outbreak of possible oral transmission in Merida, Venezuela. *Boletín de malarología y salud ambiental.* 2013;LIII(1):1- 11.
- Angheben A., Boix L., Buonfrate D., Gobbi F., Bisoffi Z., Pupella S., *et al.* Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus.* 2015;13(4):540-50.
- Badr C. E. *Bioluminescent imaging : methods and protocols.* New York: Humana Press ; Springer; 2014. xi, 276 p. p.
- Barreto-de-Albuquerque J., Silva-dos-Santos D., Perez A. R., Berbert L. R., de Santana-van-Vliet E., Farias-de-Oliveira D. A., *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):e0003849.
- Barrias E. S., de Carvalho T. M., De Souza W. *Trypanosoma cruzi* : Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol.* 2013;4:186.
- Bastos C. J., Aras R., Mota G., Reis F., Dias J. P., de Jesus R. S., *et al.* Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(6):e711.
- Bermudez J., Davies C., Simonazzi A., Pablo Real J., Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* 2015;156:1-16.
- Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2527-34.
- Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373(5):456-66.
- Bern C., Kjos S., Yabsley M. J., Montgomery S. P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):655-81.
- Bern C., Montgomery S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 2009;49(5):e52-4.

- Bilate A. M., Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(2):67-74.
- Buckner F. S., Wilson A. J., Van Voorhis W. C. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase. *Infect Immun*. 1999;67(1):403-9.
- Burleigh B. A., Woolsey A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol*. 2002;4(11):701-11.
- Butler C. E., de Carvalho T. M., Grisard E. C., Field R. A., Tyler K. M. Trans-sialidase stimulates eat me response from epithelial cells. *Traffic*. 2013;14(7):853-69.
- Caradonna K., Pereiraperrin M. Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2009;77(4):1349-56.
- Cardoso M. S., Reis-Cunha J. L., Bartholomeu D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front Immunol*. 2015;6:659.
- Carvalho L. O., Abreu-Silva A. L., Hardoim Dde J., Tedesco R. C., Mendes V. G., da Costa S. C., *et al.* *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(1):52-7.
- Carvalho T. L., Ferreira A. L., Sahaio M. A. Alterações do testículo humano na molestia de Chagas. II - Estudo morfométrico do tecido intersticial. *Rev Ins Med Trop*. 1982b;24:214-21.
- Carvalho T. L., Ferreira A. L., Sahaio M. A. Alterações do testículo na molestia de Chagas. I - Avaliação da cinética da espermatogênese. *Rev Ins Med Trop*. 1982a;24:205-13.
- Carvalho T. L., Ribeiro R. D., Lopes R. A. The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. I. Morphometric study of the vas deferens in the acute phase of the disease. *Exp Pathol*. 1991;41(4):203-14.
- Castro-Sesquen Y. E., Gilman R. H., Yauri V., Cok J., Angulo N., Escalante H., *et al.* Detection of soluble antigen and DNA of *Trypanosoma cruzi* in urine is independent of renal injury in the guinea pig model. *PLoS One*. 2013;8(3):e58480.
- Cevallos A. M., Hernandez R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. *Biomed Res Int*. 2014;2014:401864.
- Chandra M., Tanowitz H. B., Petkova S. B., Huang H., Weiss L. M., Wittner M., *et al.* Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Int J Parasitol*. 2002;32(7):897-905.
- Combs T. P., Nagajyothi, Mukherjee S., de Almeida C. J., Jelicks L. A., Schubert W., *et al.* The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem*. 2005;280(25):24085-94.
- Correa-de-Santana E., Paez-Pereda M., Theodoropoulou M., Kenji Nihei O., Gruebler Y., Bozza M., *et al.* Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J Neuroimmunol*. 2006;173(1-2):12-22.
- Cortez C., Yoshida N., Bahia D., Sobreira T. J. Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. *PLoS One*. 2012;7(7):e42153.
- Cortez M., Neira I., Ferreira D., Luquetti A. O., Rassi A., Atayde V. D., *et al.* Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infect Immun*. 2003;71(11):6184-91.
- Cortez M., Silva M. R., Neira I., Ferreira D., Sasso G. R., Luquetti A. O., *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect*. 2006;8(1):36-44.
- Coura J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:113-22.
- Coura J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):277-82.

Coura J. R., Dias J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 Suppl 1:31-40.

Coura J. R., Junqueira A. C. Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region--Medical attention in the Brazilian Amazon Region: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(7):825-30.

Coura J. R., Junqueira A. C. V., Carvalho-Moreira C. J., Borges-Pereira J., Albajar P. V. Uma visão sistêmica da endemia chagásica. In: y OPdIS, Sano FM, editors. *La Enfermedad de Chagas a la Puerta de los 100 Años del Conocimiento de Una Endemia Americana Ancestral*. Buenos Aires 2007. p. p. 25-35.

Coura J. R., Vinas P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 2010;465(7301):S6-7.

Covarrubias C., Cortez M., Ferreira D., Yoshida N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int J Parasitol.* 2007;37(14):1609-16.

da Matta Guedes P. M., Gutierrez F. R., Maia F. L., Milanezi C. M., Silva G. K., Pavanelli W. R., *et al.* IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(2):e604.

da Silva N. N., Clausell D. T., Nolibos H., de Mello A. L., Ossanai J., Rapone T., *et al.* [Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1968;10(5):265-76.

de Almeida P. E., van Rappard J. R., Wu J. C. In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(3):H663-71.

de Andrade A. L., Zicker F., de Oliveira R. M., Almeida Silva S., Luquetti A., Travassos L. R., *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 1996;348(9039):1407-13.

de Meis J., Barreto de Albuquerque J., Silva Dos Santos D., Farias-de-Oliveira D. A., Berbert L. R., Cotta-de-Almeida V., *et al.* *Trypanosoma cruzi* Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice. *Front Immunol.* 2013;4:216.

de Noya B. A. N., O. ; Robertson, L. J. *Trypanosoma cruzi* as a foodborne pathogen: Springer 2015. 92 p.

de Souza W., de Carvalho T. M., Barrias E. S. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol.* 2010;2010.

Derrien M., van Passel M. W., van de Bovenkamp J. H., Schipper R. G., de Vos W. M., Dekker J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes.* 2010;1(4):254-68.

Devera R., Fernandes O., Coura J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(1):1-12.

Dias F. A., Guerra B., Vieira L. R., Perdomo H. D., Gandara A. C., Amaral R. J., *et al.* Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of *Rhodnius prolixus* by Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques Provides New Insights into the Trypanosome Life Cycle. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):e0004186.

Dias J. C. [Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(4):370-5.

Dias J. C., Amato Neto V., Luna E. J. [Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):375-9.

Dias J. o. C. P. Clínica e terapêutica da doença de Chagas : um abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1997. 486 p. p.

Diaz-Ungría C., Bracho J. S. Camino que sigue el *Trypanosoma cruzi* en perros infectados por vía bucal: nuevos estudios. *Rev Vet Vzlana*. 1970;44:114–9.

Domingues C. S., Haridoim D. J., Souza C. S., Cardoso F. O., Mendes V. G., Previtalli-Silva H., *et al.* Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. *PLoS One*. 2015;10(10):e0122566.

Eickhoff C. S., Dunn B. A., Sullivan N. L., Hoft D. F. Comparison of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(4):508-11.

Ferreira A. V., Segatto M., Menezes Z., Macedo A. M., Gelape C., de Oliveira Andrade L., *et al.* Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect*. 2011;13(12-13):1002-5.

Freire-de-Lima L., Fonseca L. M., Oeltmann T., Mendonca-Previato L., Previato J. O. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology*. 2015;25(11):1142-9.

Giddings O. K., Eickhoff C. S., Smith T. J., Bryant L. A., Hoft D. F. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. *Infect Immun*. 2006;74(10):5549-60.

Guarner J., Bartlett J., Zaki S. R., Colley D. G., Grijalva M. J., Powell M. R. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(2):152-8.

Gutierrez F. R., Guedes P. M., Gazzinelli R. T., Silva J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol*. 2009;31(11):673-85.

Haddad J., Raia A. Alterações sexuais após o tratamento cirúrgico do megacolon congênito e adquirido. *Rev Assoc Med Brasil*. 1969;15: 509-12.

Hartz P. H., Toledano D. Specific orchitis in Chagas's disease. *Doc Med Geogr Trop*. 1954;6(2):124-30.

Henriques C., Castro D. P., Gomes L. H., Garcia E. S., de Souza W. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors*. 2012;5:214.

Henriques C., Henriques-Pons A., Meuser-Batista M., Ribeiro A. S., de Souza W. In vivo imaging of mice infected with bioluminescent *Trypanosoma cruzi* unveils novel sites of infection. *Parasit Vectors*. 2014;7:89.

Hitziger N., Dellacasa I., Albiger B., Barragan A. Dissemination of *Toxoplasma gondii* to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Cell Microbiol*. 2005;7(6):837-48.

Hoft D. F., Farrar P. L., Kratz-Owens K., Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun*. 1996;64(9):3800-10.

Holscher C., Mohrs M., Dai W. J., Kohler G., Ryffel B., Schaub G. A., *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi* -infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun*. 2000;68(7):4075-83.

Honma K., Mishima E., Sharma A. Role of *Tannerella forsythia* NanH sialidase in epithelial cell attachment. *Infect Immun*. 2011;79(1):393-401.

Hu W., Pasare C. Location, location, location: tissue-specific regulation of immune responses. *J Leukoc Biol*. 2013;94(3):409-21.

Hutchens M., Luker G. D. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell Microbiol*. 2007;9(10):2315-22.

Hyland K. V., Asfaw S. H., Olson C. L., Daniels M. D., Engman D. M. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Parasitol*. 2008;38(12):1391-400.

Lakdawala S. S., Jayaraman A., Halpin R. A., Lamirande E. W., Shih A. R., Stockwell T. B., *et al.* The soft palate is an important site of adaptation for transmissible influenza viruses. *Nature*. 2015;526(7571):122-5.

Lee B. Y., Bacon K. M., Bottazzi M. E., Hotez P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(4):342-8.

Lenzi H. L., Oliveira D. N., Lima M. T., Gattass C. R. *Trypanosoma cruzi* : paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp Parasitol.* 1996;84(1):16-27.

Malaga S., Yoshida N. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun.* 2001;69(1):353-9.

Marin-Neto J. A., Cunha-Neto E., Maciel B. C., Simoes M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115(9):1109-23.

Marques J., Mendoza I., Noya B., Acquatella H., Palacios I., Marques-Mejias M. ECG manifestations of the biggest outbreak of Chagas disease due to oral infection in Latin-America. *Arq Bras Cardiol.* 2013;101(3):249-54.

Marsden P. D. *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. II. Infections induced by different routes. *Ann Trop Med Parasitol.* 1967;61(1):62-7.

Martin D. L., Lowe K. R., McNeill T., Thiele E. A., Roellig D. M., Zajdowicz J., *et al.* Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop.* 2015;149:15-8.

Martins G. A., Vieira L. Q., Cunha F. Q., Silva J. S. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun.* 1999;67(8):3864-71.

Melo R. C., Machado C. R. *Trypanosoma cruzi* : peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp Parasitol.* 2001;97(1):15-23.

Messenger L. A., Miles M. A., Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(8):995-1029.

Moraes-Souza H., Ferreira-Silva M. M. [Control of transfusional transmission]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44 Suppl 2:64-7.

Morillo C. A., Marin-Neto J. A., Avezum A., Sosa-Estani S., Rassi A., Jr., Rosas F., *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015;373(14):1295-306.

Mortara R. A., da Silva S., Patricio F. R., Higuchi M. L., Lopes E. R., Gabbai A. A., *et al.* Imaging *Trypanosoma cruzi* within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. *Parasitol Res.* 1999;85(10):800-8.

Norman F. F., Lopez-Velez R. Chagas disease and breast-feeding. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(10):1561-6.

Oliveira I., Torrico F., Munoz J., Gascon J. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(8):945-56.

OMS. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates Weekly epidemiological record. 2015;90:33-44.

OMS. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases : first WHO report on neglected tropical diseases. 2010.

Parada H., Carrasco H. A., Anez N., Fuenmayor C., Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol.* 1997;60(1):49-54.

Parker E. R., Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin.* 2011;29(1):53-62.

Pinto A. Y., Valente S. A., Valente Vda C., Ferreira Junior A. G., Coura J. R. [Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Para, Amapa and Maranhao observed between 1988 and 2005]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(6):602-14.

Prescher J. A., Contag C. H. Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14(1):80-9.

Punukollu G., Gowda R. M., Khan I. A., Navarro V. S., Vasavada B. C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 2007;115(3):279-83.

Rachid M. A., Teixeira A. L., Barcelos L. S., Machado C. R., Chiari E., Tanowitz H. B., *et al.* Role of endothelin receptors in the control of central nervous system parasitism in *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *J Neuroimmunol.* 2010;220(1-2):64-8.

Rassi A., Jr., Rassi A., Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26(2):275-91.

Rassi A., Jr., Rassi A., Marin-Neto J. A. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375(9723):1388-402.

Reed S. G., Brownell C. E., Russo D. M., Silva J. S., Grabstein K. H., Morrissey P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 1994;153(7):3135-40.

Riarte A., Luna C., Sabatiello R., Sinagra A., Schiavelli R., De Rissio A., *et al.* Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. *Clin Infect Dis.* 1999;29(3):561-7.

Ribeiro M., Nitz N., Santana C., Moraes A., Hagstrom L., Andrade R., *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol.* 2015;162:1-6.

Roggero E., Perez A. R., Bottasso O. A., Besedovsky H. O., Del Rey A. Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1153:264-71.

Roggero E., Perez A. R., Tamae-Kakazu M., Piazzon I., Nepomnaschy I., Besedovsky H. O., *et al.* Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol.* 2006;190(2):495-503.

Rottenberg M., Cardoni R. L., Andersson R., Segura E. L., Orn A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.* 1988;28(5):573-82.

Roy S., Honma K., Douglas C. W., Sharma A., Stafford G. P. Role of sialidase in glycoprotein utilization by *Tannerella forsythia*. *Microbiology.* 2011;157(Pt 11):3195-202.

Rueda K., Trujillo J. E., Carranza J. C., Vallejo G. A. [Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* : a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries]. *Biomedica.* 2014;34(4):631-41.

Salvatori O., Puri S., Tati S., Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*-mediated Oral Diseases. *J Dent Res.* 2016;95(4):365-71.

Sanchez L. V., Ramirez J. D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology.* 2013;140(2):147-59.

Sato A., Klaunberg B., Tolwani R. In vivo bioluminescence imaging. *Comp Med.* 2004;54(6):631-4.

Saúde M. d. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Boletim Epidemiológico.* 2015;42(21).

Schijman A. G., Vigliano C. A., Viotti R. J., Burgos J. M., Brandariz S., Lococo B. E., *et al.* *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(2):210-20.

Schmunis G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102 Suppl 1:75-85.

Shikanai-Yasuda M. A., Carvalho N. B. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2012;54(6):845-52.

Shikanai-Yasuda M. A., Marcondes C. B., Guedes L. A., Siqueira G. S., Barone A. A., Dias J. C., *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991;33(5):351-7.

Silva J. S., Aliberti J. C., Martins G. A., Souza M. A., Souto J. T., Padua M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(1):111-5.

Silva J. S., Twardzik D. R., Reed S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med.* 1991;174(3):539-45.

Silva J. S., Vespa G. N., Cardoso M. A., Aliberti J. C., Cunha F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide

production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* 1995;63(12):4862-7.

Souza D. S. M., de Almeida A. J. B., Costa F. A., Elenild de Goes Costa E. G., Figueiredo M. T. S., Póvoa R. M. S. Electrocardiograms in the acute phase of Chagas Disease through oral transmission. *Rev Bras Cardiol.* 2013;26(2):127-30.

Staquicini D. I., Martins R. M., Macedo S., Sasso G. R., Atayde V. D., Juliano M. A., *et al.* Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(3):e613.

Stoopler E. T., Sollecito T. P. Oral mucosal diseases: evaluation and management. *Med Clin North Am.* 2014;98(6):1323-52.

Tabak L. A. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:547-64.

Tanowitz H. B., Machado F. S., Jelicks L. A., Shirani J., de Carvalho A. C., Spray D. C., *et al.* Perspectives on *Trypanosoma cruzi* -induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* 2009;51(6):524-39.

Tarleton R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin Immunopathol.* 2015;37(3):233-8.

Tarleton R. L., Sun J., Zhang L., Postan M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.* 1994;62(5):1820-9.

Thalhofer C. J., Graff J. W., Love-Homan L., Hickerson S. M., Craft N., Beverley S. M., *et al.* In vivo imaging of transgenic Leishmania parasites in a live host. *J Vis Exp.* 2010(41).

Toso M. A., Vial U. F., Galanti N. [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Med Chil.* 2011;139(2):258-66.

Treuting P. M., Dintzis S. M., Frevert C. W., Liggitt H. D., Montine K. S. Comparative anatomy and histology : a mouse and human atlas. 1st ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2012. xii, 461 p. p.

Vago A. R., Macedo A. M., Adad S. J., Reis D. D., Correa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet.* 1996;348(9031):891-2.

Viotti R., Vigliano C., Lococo B., Bertocchi G., Petti M., Alvarez M. G., *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006;144(10):724-34.

Wendel S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Curr Opin Hematol.* 1998;5(6):406-11.

Wendel S., Gonzaga A. L. Chagas' disease and blood transfusion: a New World problem? *Vox Sang.* 1993;64(1):1-12.

Wu R. Q., Zhang D. F., Tu E., Chen Q. M., Chen W. The mucosal immune system in the oral cavity-an orchestra of T cell diversity. *Int J Oral Sci.* 2014;6(3):125-32.

Yee J. K. Helicobacter pylori colonization of the oral cavity: A milestone discovery. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):641-8.

Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 Suppl 1:101-7.

Yoshida N., Tyler K. M., Llewellyn M. S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 2011;27(10):459-66.

Zhang L., Tarleton R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis.* 1999;180(2):480-6.