

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

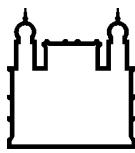
JULIANA BARRETO DE ALBUQUERQUE

Análise da resposta imune nos modelos murinos de infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* e *Listeria monocytogenes*

Orientadora: Prof. Dr^a. Juliana de Meis

RIO DE JANEIRO

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JULIANA BARRETO DE ALBUQUERQUE

**Análise da resposta imune nos modelos murinos de infecção oral pelo
Trypanosoma cruzi e *Listeria monocytogenes***

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Juliana de Meis

RIO DE JANEIRO

2017

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

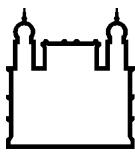
A345 Albuquerque, Juliana Barreto de

Análise da resposta imune nos modelos murinos de infecção oral pelo
Trypanosoma cruzi e *Listeria monocytogenes* / Juliana Barreto de
Albuquerque. – Rio de Janeiro, 2017.
xix, 125 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2017.
Bibliografia: f. 108-122

1. Infecção oral. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. *Listeria monocytogenes*.
4. Resposta imune. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JULIANA BARRETO DE ALBUQUERQUE

**Análise da resposta imune nos modelos murinos de infecção oral pelo
Trypanosoma cruzi e *Listeria monocytogenes***

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Juliana de Meis

Aprovada em: 05/04/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado, Fundação Oswaldo Cruz/RJ (Presidente)

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira, Fundação Oswaldo Cruz/RJ (Suplente)

**Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto, Fundação Oswaldo Cruz/RJ
(Revisor e suplente)**

Rio de Janeiro, 5 de abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, David e Ana, por estarem sempre ao meu lado me incentivando, investindo no meu futuro e acreditando em mim. A todos da minha família que sempre me apoiaram e tiveram paciência com a minha ausência temporária, “little brother” Júlio, primas Alice e Ana Luisa, vó Edith (em memória), tíos e tias...

Ao Rafael, noivo e grande amigo, pelo companheirismo, pelo apoio, pela compreensão, pelo amor e por estar sempre presente, me fazendo a cada dia mais feliz.

A minha orientadora, Juliana de Meis, que me acompanha desde a iniciação científica pela constante contribuição para o meu crescimento acadêmico, pelas discussões científicas, críticas e ensinamentos.

Ao querido grupo de Chagas pelo grande apoio durante esse período, Mariana, Bárbara, Dina, Alessandro, Rejane, Déa. Ao Désio, não apenas pela contribuição em experimentos, mas principalmente, pelo constante apoio e incentivo. A Danielle Santos e Luiz Berbert, que me ajudaram muito ao longo do desenvolvimento desse trabalho, dando apoio moral e experimental, inclusive e principalmente, nos momentos de tensão.

A todos os integrantes do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (LPT) pelas discussões científicas, que muito contribuíram para meu amadurecimento profissional, e pelos momentos de descontração. Ao Vinicius Cotta de Almeida pela contribuição científica nesse trabalho. Ao Savino pelo apoio e críticas construtivas. A Elaine pela ajuda e apoio. Apesar de não citar nominalmente, obrigada a todos do LPT.

Ao Igor Lima pela enriquecedora contribuição com bioestatística.

À Carla Eponina de Carvalho Pinto pela presença e apoio desde a graduação. Sua participação e colaboração foram importantes nas análises histológicas.

Aos queridos colaboradores e amigos argentinos, Ana Rosa Pérez, Silvina Villar, Oscar Bottasso e Eduardo Roggero pelas discussões e análises do fígado; e Florêncio Gonçalez e família pela hospitalidade e companhia durante minha estadia em Rosário. Gracias!

Ao meu orientador no período do doutorado sanduíche, Jens Stein, por ter me recebido tão bem, pela grande contribuição com a minha formação e pela oportunidade de estabelecer o modelo de infecção oral por *Listeria monocytogenes* em seu laboratório. Danke schön!

Aos integrantes do Stein lab, Xenia, Federica, Jun, Flavian, Yosuke, Ana e Sujana pelo auxílio e pelos momentos de descontração.

A todos os integrantes do Theodor Kocher Institute pela contribuição na minha estadia, em especial, à diretora Britta Engelhardt, Charaf Benarafa, Urban Deutsch e Ursula Zingg.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) pelo suporte financeiro. Ao Programa AMSUD-Pasteur pelo intercâmbio de um mês em Rosário (Argentina) no início do doutorado. À FAPERJ também pela oportunidade da bolsa de doutorado sanduíche (Suíça).

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT	xix
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Imunobiologia da mucosa	20
1.1.1 Mucosa intestinal	21
1.1.2 Mucosa oral	23
1.2 Doença de Chagas.....	27
1.2.1 Epidemiologia e distribuição geográfica	27
1.2.2 Transmissão	28
1.2.3 Ciclo biológico, órgãos alvo e entrada do parasito nas células do hospedeiro vertebrado	30
1.2.4 Manifestações clínicas.....	35
1.2.5 Resposta imune.....	38
1.2.6 Modelo experimental de infecção oral	42
1.3 Inoculação oral <i>versus</i> intragástrica: vias similares de infecção?	44
1.4 Listeriose	48
1.4.1 Epidemiologia, distribuição geográfica e transmissão	48
1.4.2 Órgãos alvo e entrada da bactéria nas células do hospedeiro	50
1.4.3 Manifestações clínicas.....	51
1.4.4 Resposta imune.....	52

1.4.5	Modelo experimental de infecção oral	54
2	JUSTIFICATIVA.....	56
3	OBJETIVOS.....	57
3.1	Objetivo geral	57
3.2	Objetivos específicos	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1	Animais e infecção	58
4.2	Parasitemia e sobrevivência	59
4.3	Análise histológica.....	60
4.4	Expressão gênica de citocinas no coração	61
4.5	Análise do coração e fígado por imunofluorescência	62
4.6	Quantificação de ALT e AST séricos.....	63
4.7	Tratamento <i>in vivo</i> com proteína quimérica contra TNF- α	63
4.8	Determinação da carga bacteriana tecidual	64
4.9	Purificação de linfócitos T e transferência adotiva	64
4.10	Marcação de células com CFSE e CMTMR.....	64
4.11	Tratamento <i>in vivo</i> com MEL-14 e FTY720.....	65
4.12	Citometria de fluxo	65
4.13	Microscopia intravital de dois fótons (“Intravital Two Photon microscopy”, 2PM) 66	
4.14	Análise estatística	66
5	RESULTADOS	68
5.1	A neutralização do pH gástrico não interferiu na parasitemia após infecção intragástrica ou oral pelo <i>T. cruzi</i>	68

5.2 Camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> oralmente apresentaram mais lesões hepáticas que os pela via intragástrica	69
5.3 Presença de fibras de colágeno, morte celular e composição do infiltrado inflamatório nos grupos de infecção intragástrica e oral no coração e fígado.....	72
5.4 Camundongos infectados na cavidade oral apresentaram maiores níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias e IL-10 no tecido cardíaco que os pela via intragástrica	76
5.5 Os macrófagos são a principal fonte de TNF- α tecidual	78
5.6 A elevada produção de TNF- α está envolvida na mortalidade de camundongos infetados pela via oral.....	80
5.7 Disseminação inicial de <i>L. monocytogenes</i>	82
5.8 Análise da resposta T CD8 $^{+}$ específica em tecidos linfoides após infecção oral por <i>L. monocytogenes</i>	82
5.9 Perfil de células CD8 $^{+}$ específicas após bloqueio da entrada e saída de linfócitos dos órgãos linfoides secundários	91
5.10 Estabelecimento da cirurgia dos linfonodos mandibulares para visualização por microscopia de dois fôtons (2PM)	94
6 DISCUSSÃO.....	97
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	106
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
9 ANEXOS.....	123
9.1 Anexo I	123
9.2 Anexo II	124
9.3 Anexo III	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Organização do sistema immune de mucosa.	20
Figura 1.2 Sítios indutores e efetores na mucosa oral <i>versus</i> mucosa intestinal.	25
Figura 1.3. Distribuição mundial dos casos de infecção pelo <i>T. cruzi</i> baseado em estimativas oficiais (2006-2010).	28
Figura 1.4. Vias de contaminação oral da doença de Chagas.	29
Figura 1.5. Distribuição geográfica e vias de transmissão da doença de Chagas no Brasil.	30
Figura 1.6. Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> e vias de transmissão.	32
Figura 1.7. Modelo das interações das formas tripomastigotas metacíclicas com os componentes do hospedeiro após inoculação pela via oral.	35
Figura 1.8 A infecção pelo <i>T. cruzi</i> pela cavidade oral apresenta maior gravidade na fase aguda.....	45
Figura 1.9. Produção de citocinas em camundongos infectados pelas vias intragástrica e oral.....	46
Figura 1.10. O coração de camundongos infectados pela via intragástrica apresenta mais infiltrado do que os pela via oral.	47
Figura 1.11. Anos de vida perdidos ajustados à incapacidade (DALY, “Disability-adjusted life-years) por 100.000 pessoas com listeriose (incluindo natimortos) por subregião da Organização Mundial de Saúde.....	49
Figura 1.12. Infecção por <i>L. monocytogenes</i>	50
Figura 5.1. O pH gástrico não interfere na infecção oral ou intragástrica pelo <i>T. cruzi</i>	69
Figura 5.2. Histopatologia do fígado durante a fase aguda da infecção pelo <i>T. cruzi</i> após inoculação por gavagem ou na cavidade oral.	71
Figura 5.3. Deposição de colágeno no coração e fígado de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i>	73

Figura 5.4. Perfil de apoptose no coração e fígado de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	75
Figura 5.5. Composição celular do infiltrado inflamatório no coração e no fígado de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	76
Figura 5.6. Perfil de citocinas em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> pelas vias intragátrica e oral.....	77
Figura 5.7. Células F4/80 ⁺ representam a maioria TNF ⁺ no fígado e coração em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	80
Figura 5.8. A terapia anti-TNF melhora a sobrevida de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> pela via oral (IO).	81
Figura 5.9. Distribuição tecidual de <i>L. monocytogenes</i>	82
Figura 5.10. A infecção oral por <i>L. monocytogenes</i> afeta diferentemente órgãos linfoideos secundários.....	83
Figura 5.11. Expansão de OT-I em diferentes órgãos linfoideos secundários após infecção oral por <i>L. monocytogenes</i>	84
Figura 5.12. Análise de proliferação em diferentes órgãos linfoideos secundários após infecção oral por <i>L. monocytogenes</i>	85
Figura 5.13. Fenótipos de ativação recente em órgãos linfoideos secundários após infecção oral por <i>L. monocytogenes</i>	87
Figura 5.14. Perfis de células efetoras e precursores de memória em diferentes orgãos linfoideos após infecção oral por <i>L. monocytogenes</i>	89
Figura 5.15. Perfis de células efetoras e precursores de memória em diferentes orgãos linfoideos após infecção oral por <i>L. monocytogenes</i>	90
Figura 5.16. Expansão de linfócitos OT-I em diferentes órgãos linfoideos secundários após infecção oral por <i>L. monocytogenes</i> seguida de tratamento com MEL-14 e FTY720.	92

Figura 5.17. Perfis de células efetoras e precursores de memória em diferentes órgãos linfoides secundários após infecção oral por <i>L. monocytogenes</i> seguida por tratamento com MEL-14 e FTY720.	93
Figura 5.18. Exposição dos linfonodos mandibulares e mandibulares acessórios para visualização por 2PM.	95
Figura 5.19. Velocidade celular em condições homeostáticas e durante a infecção por <i>L. monocytogenes</i>	96
Figura 7.1 Infecção oral pelo <i>T. cruzi</i> e <i>L. monocytogenes</i>	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Infectividade tecidual do <i>T. cruzi</i> em mamíferos.....	33
Tabela 5.1. Avaliação da eficácia do tratamento com antiácido na neutralização do pH.....	68
Tabela 5.2. Alterações histopatológicas no fígado de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	72

ABREVIATURAS E SIGLAS

2PM – Microscopia de dois fótons, do inglês "Two Photon Microscopy"

ACK – Tampão de lise cloreto de amônio, do inglês "Ammonium-Chloride lysing buffer"

ActA – Proteína indutora de polimerização de actina, do inglês "Actin assembly-inducing protein"

ADCC – Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo, do inglês "Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity"

AICD – Morte celular induzida por ativação, do inglês "Activation-induced cell death"

ALT – Alanina transaminase

APC – Aloficiocianina, do inglês "Allophycocyanin"

AST – Aspartato transaminase

BENEFIT – Avaliação do Benznidazol para Interrupção da Tripanosomíase, do inglês "Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis"

BHI – Meio de cultura bacteriana com infusão de cérebro e coração, do inglês "Brain heart infusion"

BSA – Albumina de soro bovino, do inglês "Bovine Serum Albumine"

BV – Violeta brilhante, do inglês "Brilliant violet"

CCC – Cardiomiotopatia chagásica crônica

CCL – Quimiocina ligante do motivo C-C, do inglês "Chemokine (C-C motif) ligand"

CCR – Receptor de quimiocina C-C, do inglês "Chemokine (C-C motif) receptor"

CD – Grupo de diferenciação, do inglês "Cluster of Differentiation"

cDNA – DNA complementar ao RNAm

CFSE – Carboxifluoresceína succinimidil éster, do inglês "Carboxyfluorescein succinimidyl ester"

CFU – Unidade formadora de colônia, do inglês "Colony forming unit"

c-kit – CD117, receptor de citocina expresso na superfície de células tronco hematopoéticas, entre outras

CMTMR – (5-(e-6)-(((4clorometil)bezoil)amino)tetrametilrodamina), do inglês " (5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine)"

CTL – Linfócito T citotóxico, do inglês "Cytotoxic T lymphocyte"

CXCL – Quimiocina ligante do motivo C-X-C, do inglês "Chemokine (C-X-C motif) ligand"

CXCR – Receptor de quimiocina C-X-C, do inglês "Chemokine (C-X-C motif) receptor"

Cy – Cianina, do inglês "Cyanin"

DALY – Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade, do inglês "Disability-adjusted life-years"

DAPI – Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole, do inglês "4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride"

DC – Célula dendrítica, do inglês "Dendritic cell"

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês "Desoxiribonucleic acid"

dpi – Dias pós-infecção

DsRed – Proteína fluorescente vermelha originada de *Discosoma* sp., do inglês "Discosoma sp. red fluorescent protein"

DTU – Unidade de tipagem discreta, do inglês "Discrete typing unit"

ECG – Eletrocardiograma

ECM – Matriz extracelular, do inglês "Extracellular matrix"

ECO – Ecocardiograma

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês "Ethylenediaminetetraacetic acid"

FACS – do inglês "Fluorescence activated cell sorter"

FAE – Epitélio associado ao folículo, do inglês “Follicle-associated epithelium”

FDC – Célula dendrítica folicular, do inglês “Follicular dendritic cells”

FITC – Isotiocianato de fluoresceína, do inglês “Fluorescein-5-isothiocyanate”

g – Grama

GALT – Tecido linfoide associado ao intestino, do inglês “Gut-associated lymphoid tissue”

G-CSF – Fator estimulador de colônia produzido por granulócitos, do inglês “Granulocyte colony-stimulating factor”

GFP – Proteína verde fluorescente, do inglês "Green fluorescent protein"

GM-CSF – Fator estimulador de colônia produzido por granulócitos e macrófagos, do inglês “Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor”

gp – Glicoproteína

HE – Hematoxilina e eosina

HEV – Vênula de endotélio alto, do inglês "High endothelial venule"

HGF – Fator de crescimento de hepatócito, do inglês "Hepatocyte growth factor"

IFN- γ – Interferon-gama

Ig – Imunoglobulina

IG – Infecção intragástrica

IL – Interleucina

Inl – Internalina

IO – Infecção oral

IP – Infecção intraperitoneal

IV – Infecção intravenosa

KLRG1 – do inglês "Killer-cell lectin like receptor G1"

LC – Célula de Langerhans, do inglês "Langerhans cell"

LLO – Listeriolisina

LPS – Lipopolissacarídeo

MadCAM – Molécula de adesão celular de endereçamento para mucosa, do inglês "Mucosal addressin cell adhesion molecule"

MALT – Tecido linfoide associado à mucosa, do inglês "Mucosa-associated lymphoid tissue"

mandLN – Linfonodo mandibular

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófago, do inglês "Macrophage Colony-Stimulating Factor"

Met – Receptor de HGF

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade, do inglês "Major histocompatibility complex"

mLN – Linfonodo mesentérico

MPEC – Célula efetora precursora de memória, do inglês "Memory precursor effector cell"

NALT – Tecido linfoide associado à mucosa nasal, do inglês "Nasal-associated lymphoid tissue"

NK – Célula matadora natural, do inglês "Natural killer cell"

OCT – Temperatura ótima de corte, do inglês "Optimum cutting temperature"

OT-I – Célula T CD8⁺ ovalbumina-específica restrita a MHC de classe I

OVA – Ovalbumina

PBS – Salina tamponada com fosfato, do inglês "Phosphate Buffered Saline"

PC-PLC – Fosfolipase C fosfatidilcolina-específica, do inglês "Phosphatidylcholine-specific phospholipase C"

PE – Fitocoeritrina, do inglês "Phycoerythrin"

PFA – Paraformaldeído

PI-PLC – Fosfolipase C fosfatidilinositol-específica, do inglês "Phosphatidylinositol-specific phospholipase C"

PP – Placa de Peyer

Prox1 – do inglês "Prospero homeobox protein 1"

RANTES – Também conhecida como CCL5. Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais, do inglês "Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted"

RELM-β – Proteína semelhante à resistina, do inglês "Resistin-like-β"

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês "Ribonucleic acid"

RNAm – RNA mensageiro

RPMI – Meio de cultura, "Roswell Park Memorial Institute"

RT-PCR – Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês "Reverse transcription - Polymerase chain reaction"

S1P1 – Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato, do inglês "Sphingosine-1-phosphate receptor 1"

SFB – Soro fetal bovino

scLN – Linfonodos de drenagem subcutânea

sIgA – Imunoglobulina A de superfície, do inglês "surface immunoglobulin A"

SLEC – Célula efetora de vida curta, do inglês "Short-lived effector cell"

SMG – Glândula salivar submandibular, do inglês "Submandibular salivary gland"

Tbet – Fator de transcrição específico de células Th1

TCR – Receptor de célula T, do inglês "T-cell receptor"

TCT – Tripomastigotas derivados de cultura de tecido, do inglês "Tissue culture-derived tripomastigotes"

T_{FH} – Célula T folicular auxiliar, do inglês "Follicular helper T cell"

TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta, do inglês “Transforming growth factor-beta”

T_H – Célula T auxiliar, do inglês “Helper T cell”

TLR – Receptor tipo Toll, do inglês “Toll-like receptor”

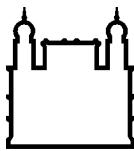
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa, do inglês “Tumor necrosis factor-alfa”

T_{REG} – Célula T reguladora, do inglês “Regulatory T cell”

T_{RM} – Célula T residente de memória, do inglês "Resident memory T cell"

TUNEL – do inglês "Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling"

μL – Microlitro



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

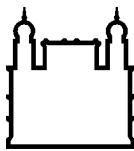
Análise da resposta imune nos modelos murinos de infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* e *Listeria monocytogenes*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Juliana Barreto de Albuquerque

Frequentemente, os estudos de infecção oral consideram a inoculação de patógenos pelas vias intragástrica (IG) e na cavidade oral (IO) como similares, no entanto a inoculação IO assemelha-se mais com a transmissão na natureza. Atualmente no Brasil, a transmissão oral da doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, consiste em 70-80% dos casos, representando um problema de saúde pública. Dados prévios demonstraram que a infecção IO apresenta um perfil distinto da IG, promovendo maior infectividade, parasitemia e mortalidade. Paralelamente, a listeriose, causada pela *Listeria monocytogenes*, é transmitida oralmente e está entre as doenças por ingestão de alimentos que mais causam mortes. Vale ressaltar que ainda há uma carência de estudos relacionados à fisiopatologia e a resposta imune após infecção pela via oral em modelos experimentais. Neste trabalho, foram abordados dois modelos de infecção oral: pelo *T. cruzi* e por *L. monocytogenes*. Camundongos infectados e tratados com hidróxido de magnésio apresentaram resultados similares aos não tratados, sugerindo que as diferenças observadas previamente entre IG e IO não estavam associadas a um efeito deletério do pH gástrico. A análise histopatológica do fígado demonstrou que IO apresentou infiltrado inflamatório mais extenso e maiores níveis atividade sérica das enzimas hepáticas ALT e AST que IG. Tanto no fígado como no coração foram observadas morte celular pela marcação de TUNEL e presença de colágeno pela coloração de Picro Sirius. A Análise de RT-PCR do tecido cardíaco confirmou a maior expressão gênica de TNF- α , IFN- γ , assim como IL-10 no tecido do grupo IO comparado ao IG. Imunomarcações revelaram que os macrófagos são a principal fonte tecidual de TNF- α , sendo a mortalidade do grupo IO associada aos elevados níveis séricos de TNF- α , uma vez que o seu bloqueio aumentou a sobrevivência dos animais infectados oralmente pelo *T. cruzi*. Em relação à infecção com *L. monocytogenes*, em até 20h após a infecção oral, os dados sugerem uma detecção preferencial de CFU da bactéria expressando OVA nos linfonodos mandibulares (mandLNs). Além disso, as análises por citometria de fluxo foram sugestivas de que os estágios iniciais da ativação de células OVA-específicas ocorrem nesse tecido. Também foi estabelecida a cirurgia para exposição dos mandLNs e visualização intravital da migração de células específicas por microscopia de dois fôtons. Nossos dados demonstraram que a passagem do patógeno pela a cavidade oral influencia a parasitemia, mortalidade, comprometimento de órgãos alvo e perfil de citocinas, e os elevados níveis de TNF- α observados após a infecção oral estão associados à alta mortalidade. Além disso, os dados sugerem que há um direcionamento inicial do patógeno para os mandLNs, onde ocorre preferencialmente a ativação da resposta de células T CD8 antígeno-específicas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Immune response analysis in murine models for *Trypanosoma cruzi* and *Listeria monocytogenes* oral infection

ABSTRACT

PhD THESIS

Frequently, oral infection studies consider pathogen inoculation through intragastric (IG) and into the oral cavity (IO) as similar, although, the entrance in the mouth is more similar to the natural transmission. Currently, oral transmission of Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, consists 70-80% of cases in Brazil and represents a public health problem. Previous data demonstrated that IO presents a distinct profile from IG, promoting higher infectivity, parasitemia and mortality. In parallel, listeriosis, caused by *Listeria monocytogenes*, is primarily transmitted via oral route and is among the deadliest foodborne diseases. Nevertheless, significant studies on the pathophysiology and immune response using these different models of oral infection are largely lacking. This work addresses two oral infection models: by *T. cruzi* and by *L. monocytogenes*. Mice infected by *T. cruzi* and treated with magnesium hydroxide presented similar results compared to untreated, suggesting that the differences previously observed between IO and IG were not associated to a deleterious effect of gastric pH. Liver histopathological analysis demonstrated more extensive inflammatory infiltrates and higher serum activity of hepatic enzymes ALT and AST in IO than IG. Both liver and heart presented cell death by TUNEL staining and collagen deposition by Picro Sirius. RT-PCR from heart tissue confirmed higher TNF- α , IFN- γ and IL-10 gene expression in IO compared to IG. Immunostainings revealed macrophages as the major tissue source of TNF- α . Furthermore, IO mortality was associated to elevated TNF- α serum levels, since its blockage enhanced mice survival of *T. cruzi* infected mice. Concerning *L. monocytogenes* infection, in 20 h after oral infection, data suggest a preferential detection of bacteria CFU in mandibular lymph nodes (mandLN). Besides, flow cytometry analysis suggested that the initial stages of specific-cells activation were more relevant in these mandLN. Moreover, the surgery of these lymph nodes for twophoton intravital imaging of antigen-specific immune cells migration was established. Our data have demonstrated that pathogen entrance through the oral cavity affects parasitemia, mortality, target organs commitment and cytokines profile, still high TNF- α serum levels were associated with high mortality. The results also suggest that there is a initial pathogen tropism to mandLN, where preferentially occurs activation of antigen-specific CD8 T cells.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imunobiologia da mucosa

O sistema imune de mucosa é dividido em sítios indutores e efetores. Os indutores da mucosa são os linfodos drenantes e as estruturas organizadas do tecido linfoide associado à mucosa (MALT, “mucosa-associated lymphoid tissue”), sendo o tecido linfoide associado ao intestino (GALT, “gut-associated lymphoid tissue”) o maior e melhor caracterizado. Os sítios efetores são a lâmina própria e o epitélio intestinal com os linfócitos intraepiteliais da mucosa (1) (Figura 1.1).

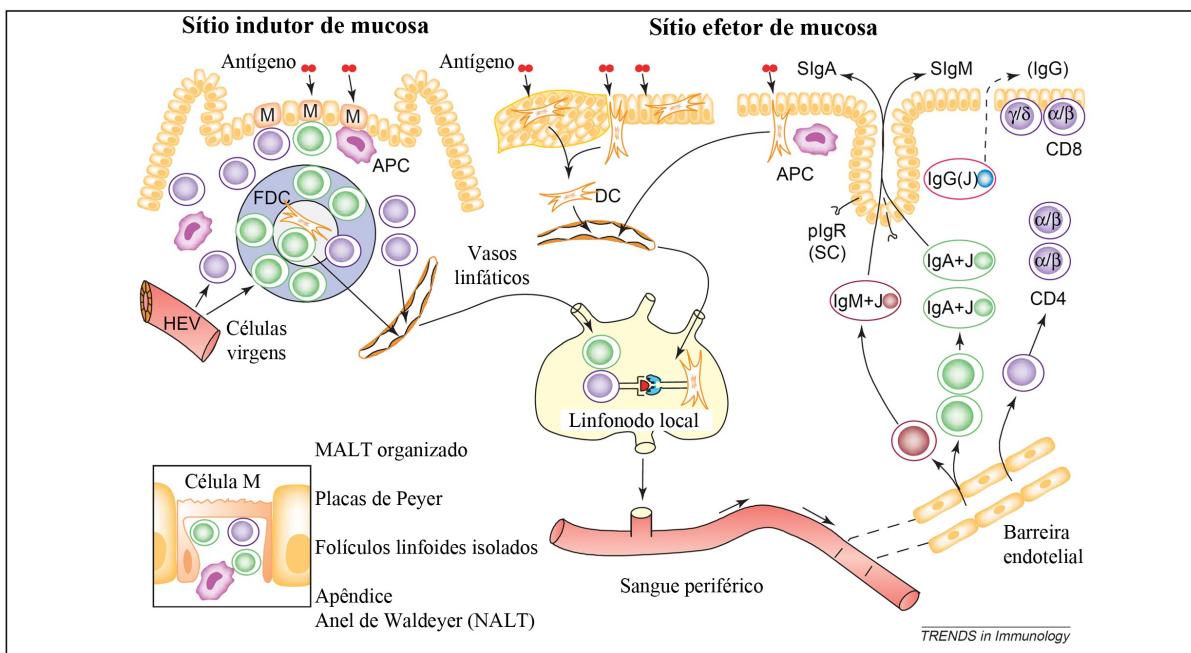


Figura 1.1 Organização do sistema immune de mucosa.

Sítios indutores de mucosa correspondem aos tecidos linfoideos regionais associados à mucosa (“Mucosa-associated lymphoid tissue”, MALT) e os linfonodos drenantes. O MALT é composto por folículos de células B e células M associadas ao epitélio que são capazes de transportar ativamente抗原os provenientes do meio externo. Esses抗原os podem ser capturados por células apresentadoras de抗igenos (APC), como células dendríticas (DC), macrófagos, linfócitos B e células dendríticas foliculares (FDC) localizados na submucosa. Esses抗igenos também podem ser capturados diretamente de sítios efetores por células dendríticas intra- ou subepiteliais, que migram para linfonodos drenantes regionais, onde APC ativadas são capazes de estimular linfócitos T para uma resposta imune efetora (exemplificado pela mucosa nasal no centro). Linfócitos T e B virgens entram no MALT e linfonodos através das vênulas de endotélio alto (“High endothelial venules”, HEVs). Após ativados, linfócitos T e B de memória e efetores migram para o sangue periférico e subsequentemente para os sítios efetores de mucosa (exemplificado pela mucosa intestinal à direita). Esse processo é direcionado por moléculas de adesão vascular e quimiocinas, e as células endoteliais exercem função de controle dessa barreira. A lâmina própria intestinal contém linfócitos B

e plasmócitos que expressam IgM, IgA e IgG. Além disso, também há geração de IgA e IgM secretadas (sIgA e sIgM) via transporte epitelial mediado por receptor de Ig polimérico também conhecido como componente secretor membranar (SC), assim como através de passagem paracelular de pequenas quantidades (linha pontilhada). A distribuição de linfócitos intraepiteliais (principalmente T CD8 $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$) também é representada, assim como os detalhes da região de células M (canto inferior esquerdo). Adaptado de (1).

1.1.1 Mucosa intestinal

Frequentemente, trabalhos relacionados à tolerância oral ou infecções oralmente transmitidas abordam a resposta imune na mucosa intestinal. A superfície mucosa intestinal apresenta uma barreira que consiste nas células epiteliais, produtos das células caliciformes (glicoproteínas, mucinas formadoras de gel, peptídeos da família trefoil e RELM- β) e peptídeos antimicrobianos (defensinas e catelicidinas) (1). Os sítios indutores dessa mucosa gastrointestinal são o GALT (placas de Peyer, folículos linfoides isolados e apêndice) e os linfonodos mesentéricos (mLN). Estes fazem parte do sistema imune intestinal, no entanto não são considerados GALT, uma vez que não captam antígeno diretamente da mucosa (1-3).

As placas de Peyer (PP), por definição original, consistem em agregados de pelo menos 5 folículos linfoides de células B podendo variar até mais de 200 em humanos (4, 5), com áreas interfoliculares organizadas, onde localizam-se as células T, e um acúmulo de células linfoides e não-linfoides intercaladas na região do domo que se projeta para o lúmen intestinal. Além disso, não apresentam vasos linfáticos aferentes (5, 6).

Em humanos, as PP estão presentes antes do nascimento e podem ser encontradas não só no íleo, mas também em menor número no jejunum (4, 7). Também nos demais mamíferos, as PPs no íleo terminal são diferentes em estrutura e função daquelas localizadas no jejunum e são equivalentes à Bursa de Fabricius das aves, local em que ocorre a diferenciação e formação do repertório de linfócitos B (8). Estas desaparecem com a idade e podem ser consideradas órgãos linfoides primários, enquanto que em humanos persistem por toda a vida no jejunum (6).

A captura de antígeno e transporte para a estrutura linfoide é realizada no epitélio associado ao folículo (FAE, “follicle-associated epithelium”) pelas células M

(9, 10). Vale ressaltar que essa função é regulada por receptores do tipo Toll (TLR, “Toll-like receptor”). A ativação de TLR-2 e ligantes de TLR-4, como o LPS, aumentam a função das células M (11). Além disso, DCs presentes na superfície da mucosa são capazes de captar antígenos do lúmen intestinal (12, 13). Vasos linfáticos eferentes levam linfócitos, DCs e macrófagos para os linfonodos mesentéricos (6). Em camundongos, as DCs em contato com bactérias da microbiota nas PPs normalmente não migram para os mLNs, restringindo a resposta de anticorpos ao sistema imune de mucosa. Ao contrário, em humanos, baixos níveis de anticorpos sistêmicos contra essas bactérias são observados. As células T quando ativadas nos mLNs rapidamente apresentam propriedades que as direcionam para o intestino (1).

Em camundongos, também existem estruturas chamadas criptoplacas, que originalmente são aglomerados de precursores linfoides negativos para marcador de linhagens hematopéticas, c-kit⁺ (70%); DCs, células estromais expressando a molécula de adesão VCAM-1 e alguns linfócitos T e B. Podem originar folículos linfoides isolados (terciários), onde há produção primária e secundária de sIgA (6).

Nas criptas intestinais, dentre outros tipos celulares, localizam-se as células de Paneth que produzem uma diversidade de peptídeos antimicrobianos (lisozima, PLA2, α-defensinas entéricas, peptídeos relacionados à criptidina e angiogenina 4). Essas células também participam da imunidade inata, uma que produzem esses peptídeos em resposta à exposição a produtos bacterianos e sua interação com receptores TLR, como TLR 1-3 e 5-9 (14, 15).

A migração de células linfoides ativadas para a lâmina própria intestinal depende de altos níveis de expressão de α4β7 (na ausência de CD62L) que permite a interação das células circulantes com MAdCAM-1 expresso na região das células epiteliais da lâmina própria. O fenótipo α4β7^{high} é predominantemente induzido em células T e B antígeno-específicas em sangue periférico, após imunização entérica (oral) em humanos (16). Estudos em modelos murinos sugerem que o tropismo para o intestino delgado direcionado por α4β7 e CCR9 combinado com baixa expressão de CD62L é induzido em células T por DCs nas PPs e mLNs (17). No intestino grosso, esta integrina é acompanhada pela quimiocina CCL28/MEC o que contribui para atração de linfoblastos sIgA⁺ CCR10^{high}. Juntamente com CD44, essa integrina contribui para retenção de células efetoras na lâmina própria. A migração de células

T e B para este sítio efetor e retenção no local parece ser mediada pela quimiocina CCL25/TECK, que é produzida pelo epitélio da cripta e interage com CCR9 em humanos e camundongos (18).

A tolerância oral é extremamente importante, uma vez que a mucosa do trato gastrointestinal representa um local de contato constante com抗ígenos, seja da alimentação, ou da microbiota (19). O GALT apresenta papel fisiológico frente a esses抗ígenos, de forma que essa exposição diária não resulte em resposta imune indesejada, e na proteção do organismo contra patógenos. O sistema imune intestinal, com seus sítios indutores e efetores participam desse microambiente tolerogênico. Vários mecanismos de tolerância oral são conhecidos, e um dos determinantes é a dose do抗ígeno. Baixas doses induzem células T_{REG}, enquanto altas doses induzem anergia ou depleção (20). O intestino é uma fonte rica de TGF-β, que atua como fator de troca de classe para IgA, principal classe encontrada no intestino. As células epiteliais intestinais produzem tanto TGF-β como IL-10, que induzem células T_{REG} (21, 22). Especificamente, a indução de T_{REG} no intestino envolve as DCs, que apresentam propriedades que também resultam na indução destas células via TGF-β e ácido retinoico (23). Além disso, macrófagos são estimulados a produzir TGF-β após captura de células epiteliais ou T apoptóticas devido à exposição a altas doses de抗ígenos. A drenagem venosa intestinal para o sistema porta parece ser crucial na indução da tolerância oral, uma vez que seu bloqueio prejudica a indução de tolerância a ovalbumina (24). Vale ressaltar que o fígado também participa da indução da tolerância oral, para onde os抗ígenos (altas doses) são rapidamente direcionados e processados por células dendríticas plasmocitoides que induzem anergia/depleção e T_{REG} (20, 24, 25). As células endoteliais sinusoidais e as células de Kupffer no fígado também podem atuar como células apresentadoras de抗ígeno (APC) e induzir tolerância (26).

1.1.2 Mucosa oral

Diferente do intestino que é essencialmente um epitélio colunar simples, a mucosa oral é principalmente formada de epitélio estratificado escamoso. Dessa forma, achados relacionados ao intestino não necessariamente podem ser aplicados à boca. Além disso, a cavidade oral apresenta uma diversidade de tipos de epitélio: queratinizado no dorso da língua e palato; não queratinizado na mucosa bucal

(superfície restante da cavidade oral, como a região da bochecha); finas camadas ricas em células de Langerhans na região sublingual (27).

A mucosa atua como barreira física e abriga diferentes tipos celulares da imunidade inata, como macrófagos, DCs, células NK e leucócitos polimorfonucleares, associados à produção de citocinas, quimiocinas, peptídeos antibacterianos e componentes do sistema complemento, além de linfócitos B e T efetores, e plasmócitos diferenciados (28, 29).

A saliva desempenha papel mecânico de proteção da mucosa e dentes frente a microorganismos e é composta por diferentes agentes antimicrobianos, como lactoferrina, lisozima, peroxidases, mucinas, proteínas do complemento, leucócitos e imunoglobulinas (28, 30). A saliva é secretada pelas glândulas salivares principais (parótida, submandibular e sublingual) e por glândulas salivares secundárias (30). A maior parte dos anticorpos presentes na saliva são do tipo sIgA (90-98%) e IgG (1-10%), e raras IgM, IgD e IgE. A sIgA é principalmente proveniente das glândulas salivares e de células da mucosa. Em menor proporção, IgA e IgG monoméricas são oriundas do sangue e alcançam a cavidade oral através fluido crevicular presente no sulco gengival ou são produzidas por plasmócitos locais (31, 32).

A organização estrutural do sistema imune na mucosa da cavidade oral e tecidos associados é pouco abordada na literatura. A estrutura clássica do MALT como sítio indutor está ausente na mucosa oral, entretanto acredita-se que DCs capturem os抗ígenos no epitélio e migrem para a lámina basal, onde podem apresentar o抗ígeno a linfócitos T presentes nos focos linfoides, induzindo uma resposta efetora, ou migrar para órgãos linfoides regionais (Figura 1.2) (27, 33).

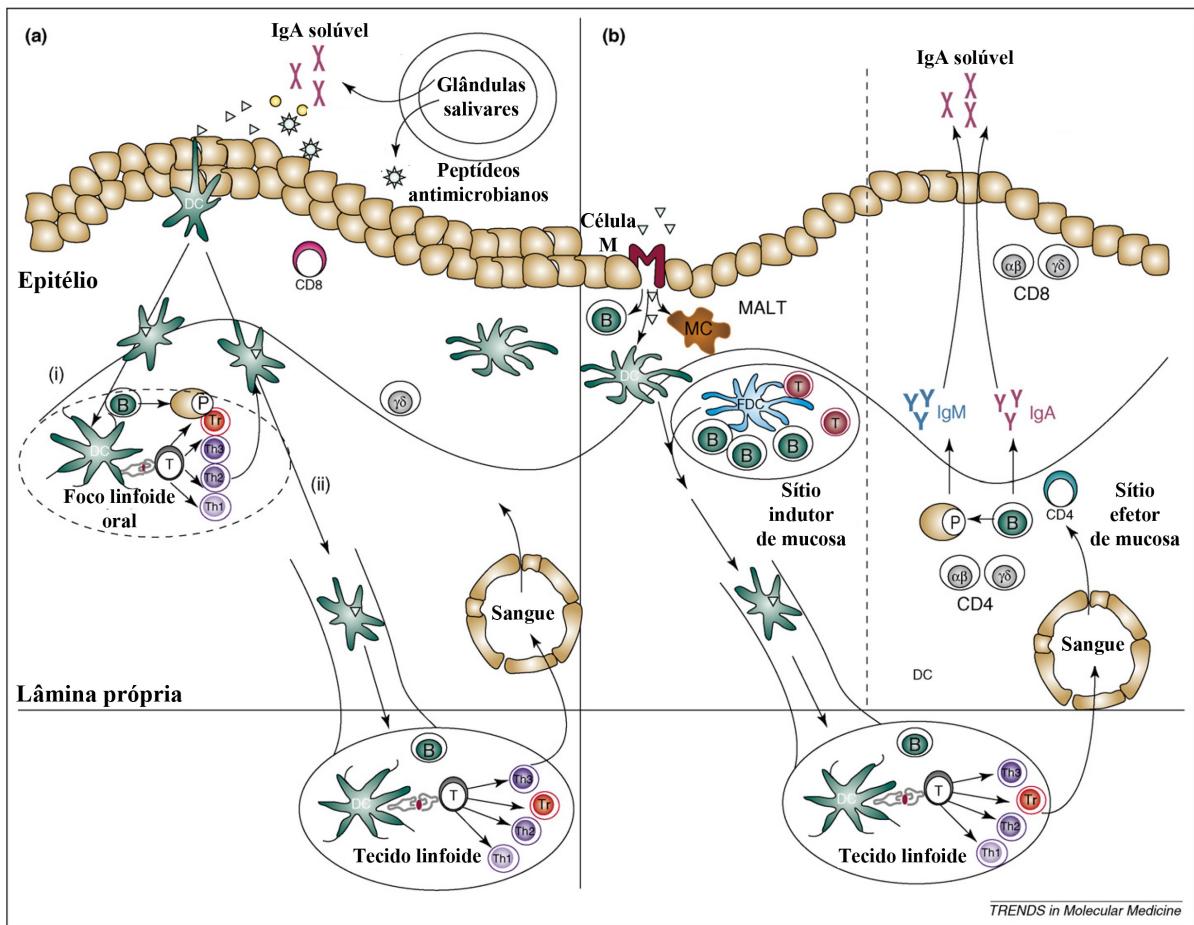


Figura 1.2 Sítios indutores e efetores na mucosa oral versus mucosa intestinal.

A) Células dendríticas (DC) do epitélio capturam抗ígenos (triângulos azul claros), amadurecem parcialmente e migram para a lâmina basal, onde apresentam抗ígenos para linfócitos T dentro dos focos linfoides orais, induzindo uma resposta efetora (i) ou migram para órgãos linfoides regionais como tonsilas, onde ativam linfócitos T, induzindo resposta imune efetora (ii). **B)** Na mucosa intestinal, os sítios indutores para linfócitos T e B consistem nos tecidos linfoides associados à mucosa (MALT) que apresentam folículos de linfócitos B e células M associadas ao epitélio, que transportam o抗ígeno e permitem a captação destes por células apresentadoras de抗ígenos, como DCs, macrófagos, linfócitos B e células dendríticas foliculares. Assim como na mucosa oral, as DCs migram para tecidos linfoides regionais e ativam linfócitos T virgens. Linfócitos de memória migram através do sangue para os sítios efetores. B, linfócito B; DC, célula dendrítica; FDC, célula dendrítica folicular; IgA, imunoglobulina A; MC, macrófago; P, plasmócito; T, linfócito T; Th1, linfócito T auxiliar do tipo 1; Tr, linfócito T regulador. Adaptado de (27).

A mucosa oral murina apresenta diferentes fenótipos de DC: na mucosa bucal, são encontradas células de Langerhans (LC), DC intersticiais (iDC) CD103⁺ expressando ou não langerina, células CD11c⁻CD11b⁺ (provavelmente macrófagos); na mucosa sublingual, LCs em menor proporção, iDC, DC plasmocitoide (pDC) e

células CD11c⁻CD11b⁺ (macrófagos F4/80⁺); na mucosa gengival, LCs, iDC, iDC CD103⁺ e células CD11c⁻CD11b⁺. As regiões da mucosa da cavidade oral apresentam diferenças de permeabilidade, e em geral são naturalmente não absorтивas. Portanto os抗ígenos precisam ativar ou penetrar o epitélio para induzir resposta imune. Uma exceção é a região sublingual, onde抗ígenos podem ser facilmente absorvidos e alcançar DCs, que posteriormente migram para os linfonodos drenantes da cavidade oral (27).

Há uma população T CD4⁺ gengival produtora de IL-17 que aumenta com a idade e não é dependente da colonização por bactérias da microbiota, uma vez que não é alterada em camundongos “germ-free”. No entanto, foi demonstrado que essas T_H17 gengivais dependem de IL-6, cuja produção pode ser induzida por danos mecânicos, o que ocorre fisiologicamente devido à mastigação e abrasão (34).

Dados de experimentos com injeção de peptídeo sintético correspondente a hemaglutinina do vírus influenza na mucosa da bochecha em camundongos sugerem que possivelmente DCs podem capturar抗ígenos no epitélio bucal e migrar para os linfônodos drenantes da cavidade oral. Nesse estudo, após 1 e 24h de imunização, Eriksson e colaboradores isolaram suspensões celulares obtidas após digestão do epitélio bucal da bochecha e dos linfonodos cervico-mandibulares. Esses tecidos foram utilizados como fonte de células apresentadoras de抗ígeno que foram colocadas em co-cultura com linfócitos T transgênicos específicos para o peptídeo. Essas células foram capazes de induzir ativação de células T específicas *in vitro* avaliada pela incorporação de timidina H³. Após 72h de co-cultura, as células provenientes da digestão do epitélio bucal após 1h de imunização foram capazes de ativar linfócitos T virgens, enquanto células oriundas dos linfonodos apenas após 24h de imunização (35). Além disso, o epitélio bucal é considerado sítio indutor da resposta imune, equivalente à epiderme, para geração de sensibilidade de contato independente de T CD4, mas mediada por CTL (36).

Uma vez que o sistema imune das mucosas intestinal e oral apresentam características distintas, é importante considerar a passagem do patógeno pela cavidade oral após infecções adquiridas por ingestão de alimentos/bebidas contaminados, como por exemplo, as doenças causadas pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e pela bactéria *Listeria monocytogenes*.

1.2 Doença de Chagas

1.2.1 Epidemiologia e distribuição geográfica

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, cujo agente etiológico é o parasito intracelular *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina, sendo considerada uma endemia em diversos países dessa região (37). Mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de infecção e em 2008, a doença levou ao óbito mais de 10.000 pacientes (37).

A infecção pelo *T. cruzi* é considerada um problema de saúde pública em vários países, sendo uma doença tropical negligenciada com deficiências de tratamento, ausência de vacinas apropriadas e disseminação mundial, sendo endêmica em 21 países latino-americanos, como Brasil, Argentina, Belize, Venezuela, Bolívia, Chile, Colômbia, México, Paraguai, Peru, Uruguai, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, Nicarágua, Panamá e Suriname (38, 39). Atualmente, a infecção pelo *T. cruzi* ocorre também fora das zonas endêmicas, como América do Norte (Estados Unidos e Canadá), região do Pacífico oriental (Japão e Austrália) e Europa (principalmente, Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido e Suíça, e em uma menor proporção Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia e Suécia), devido ao crescente fluxo migratório das zonas endêmicas para essas regiões (Figura 1.3) (40, 41).

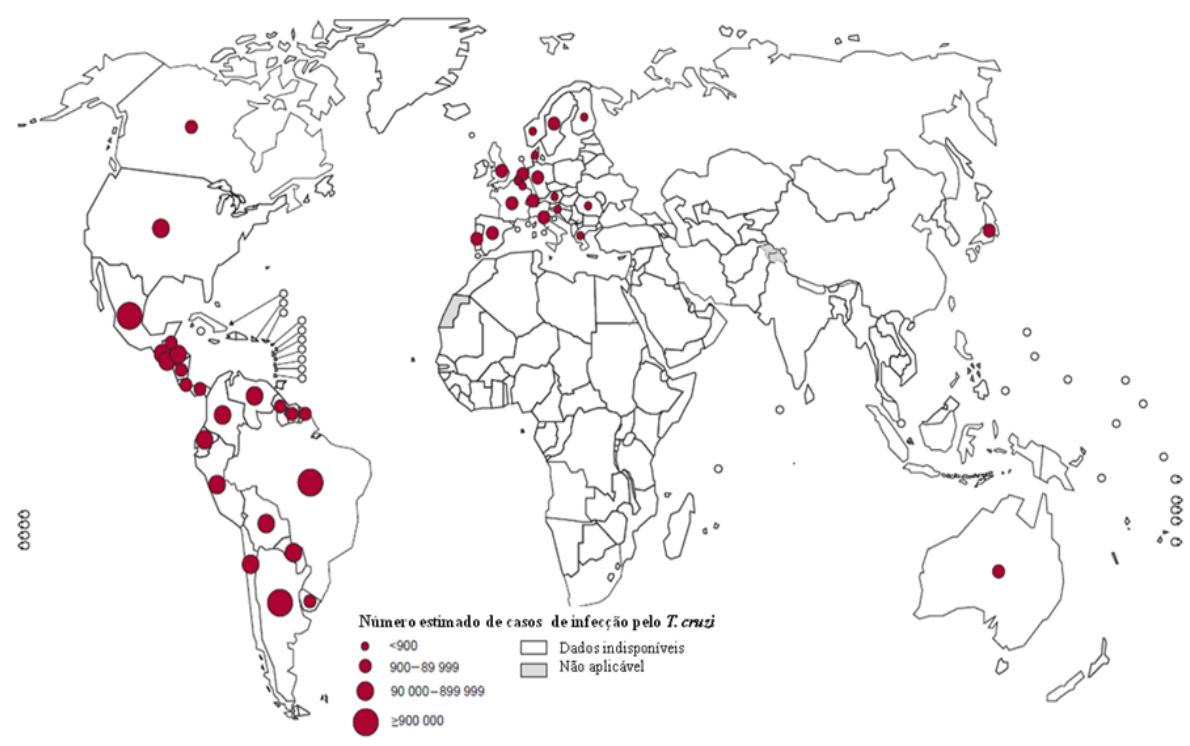


Figura 1.3. Distribuição mundial dos casos de infecção pelo *T. cruzi* baseado em estimativas oficiais (2006-2010).

A endemicidade persiste na região das Américas onde há a presença da transmissão vetorial, seja ela clássica após a hematofagia ou pela ingestão do vetor e/ou suas fezes. No entanto, até mesmo nos países em que não há esse tipo de transmissão, há casos da doença, por transmissão vertical ou transfusão sanguínea, principalmente devido aos imigrantes vindos das regiões endêmicas. Adaptado de (42).

1.2.2 Transmissão

Nos países onde é endêmica, a transmissão ocorre principalmente pelo vetor (insetos triatomíneos), seja durante a hematofagia ou por transmissão oral através da ingestão de alimentos/bebidas contaminados e carne de animais reservatório do parasita (43-45), podendo também ocorrer por transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos. Apesar de apresentar menor relevância epidemiológica, há também a transmissão accidental em laboratórios e a infecção congênita (46, 47).

Em alguns países da América do Sul, como Brasil, Colômbia e Venezuela, Equador, Bolívia, Guiana Francesa e Argentina, há registros de surtos por transmissão oral nas zonas rurais e periurbanas, apresentando fontes de contaminação de origens diversas. No Brasil, são principalmente através da ingestão

de alimentos/bebidas contaminados (polpa de açaí, bacaba, babaçu e cana-de-açúcar entre outros), mas nos demais países, foram relatados casos por ingestão de suco de goiaba ou frutas em geral e carne de animais de caça. Estes casos envolvem um grupo de pessoas que compartilharam a mesma refeição (43, 44, 47-50). A contaminação dos alimentos pode ocorrer, seja por deposição das fezes contaminadas pelos triatomíneos ou reservatórios naturais do parasito, seja por Trituração do vetor durante o preparo. Além disso, o consumo de carne crua de animais reservatórios do *T. cruzi* ou na amamentação por mães agudamente infectadas também são possíveis mecanismos de transmissão pela via oral (Figura 1.4). Os pacientes que consomem esses alimentos podem desenvolver miocardite aguda com manifestações clínicas mais graves em jovens, apresentando altas taxas de óbito (8-35%) em comparação com a via vetorial clássica (<5-10%). Além disso, os indivíduos infectados que sobrevivem, geralmente evoluem para cardiomiopatia crônica (49, 51, 52).

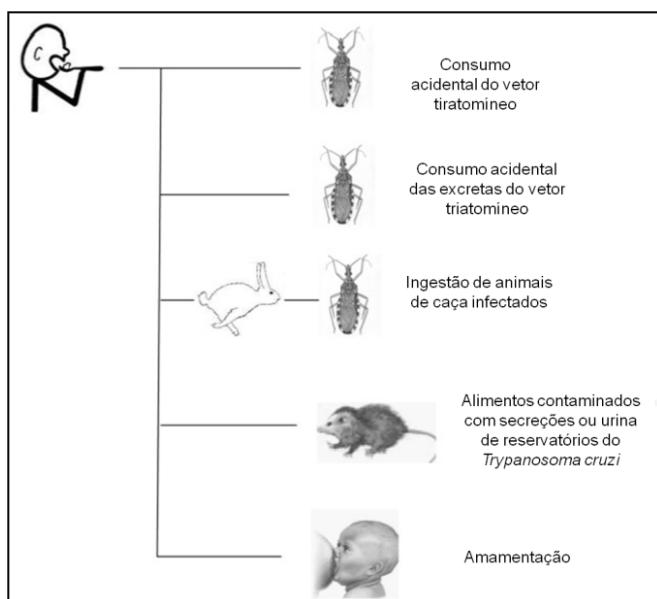


Figura 1.4. Vias de contaminação oral da doença de Chagas.

A transmissão pela via oral pode ocorrer pela ingestão do triatomíneo ou suas excretas, de animais de caça infectados, animais reservatórios do parasito ou na amamentação. (49).

No nosso país, o primeiro caso de infecção oral relatado ocorreu em 1965, em Teutônia, no Rio Grande do Sul (53) e desde então outros foram registrados, como nos episódios de surto epidêmico de quadro agudo da doença de Chagas em vários estados como Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Pará, Paraíba, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (48, 51, 54-59). Entre 1968 e 2000, mais de 50% dos casos agudos

da doença na Amazônia brasileira foram atribuídos a surtos de infecção transmitida pela via oral (51). Entre os anos de 2000 e 2010, esta via representou 71% dos casos (48), demonstrando, portanto, que esta é uma via frequente no nosso país (Figura 1.5).

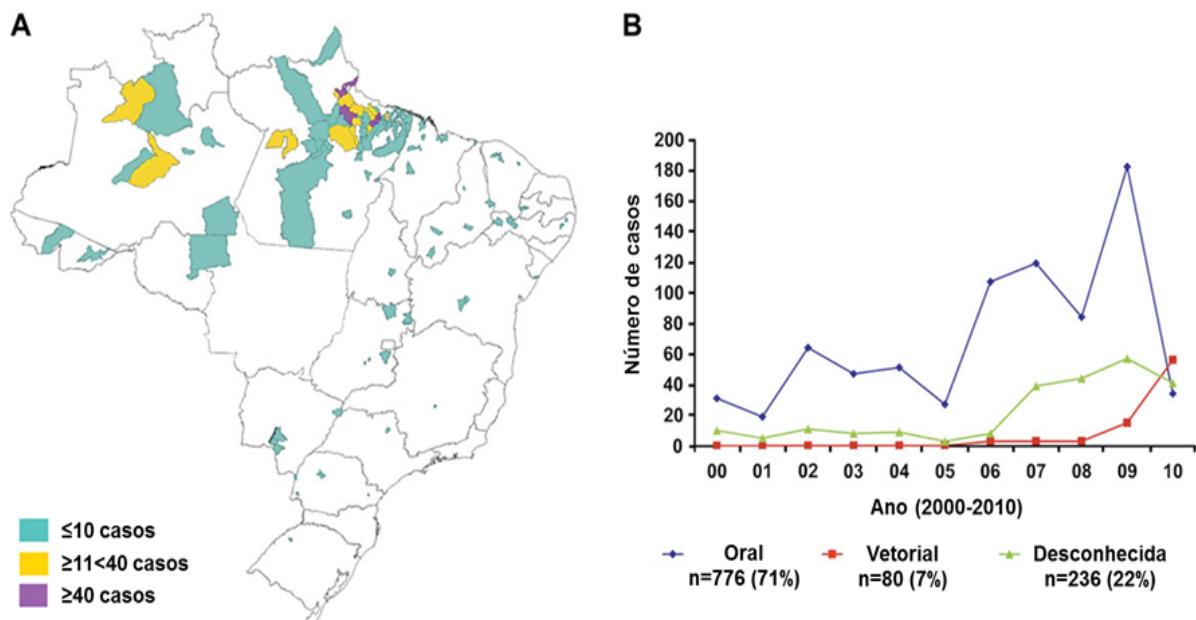


Figura 1.5. Distribuição geográfica e vias de transmissão da doença de Chagas no Brasil.

A, Estimativa do número de casos de doença de Chagas aguda no Brasil, por município (2000-2010), mostrando que há um predomínio na região norte do país. **B**, Número de casos de doença de Chagas aguda no Brasil de acordo com a via de transmissão, demonstrando que a infecção pela via oral prevaleceu em relação às demais nesse período. Adaptado de (48).

1.2.3 Ciclo biológico, órgãos alvo e entrada do parasito nas células do hospedeiro vertebrado

No decorrer do seu ciclo biológico, o parasito apresenta diferentes estágios evolutivos no vetor e nos hospedeiros mamíferos. No triatomíneo, o parasito replica-se sob a forma epimastigota no intestino médio e diferencia-se, no intestino posterior, em tripomastigota metacíclico flagelado, forma infectante para o vertebrado, encontrada nas fezes do barbeiro (60).

Classicamente, durante ou logo após a hematofagia, determinadas espécies de triatomíneos depositam suas fezes no local da picada, e as formas tripomastigotas metacíclicas infectivas inoculadas na ferida geralmente infectam macrófagos, fibroblastos e outros tecidos mesenquimais no local, seguido por

disseminação pela corrente sanguínea e estabelecimento da infecção em outros tecidos (61, 62). As formas tripomastigotas induzem sua captura por fagócitos profissionais envolvendo vias dependentes de TLR-2 e TLR-9 (15, 63). Durante a infecção, após promover proteólise da matriz extracelular (ECM, “extracellular matrix”) e ligação na superfície da célula hospedeira, o parasito dispara uma cascata bidirecional de sinalização de cálcio (64). Diversas moléculas de superfície estão envolvidas nos mecanismos de infecção, como moléculas de adesão, destruição de matriz extracelular, evasão do sistema imune e iniciação de eventos de sinalização bidirecional no parasito e na célula hospedeira (62, 64). A galectina-3, por exemplo, é capaz de ligar tanto à laminina da ECM quanto ao parasito facilitando a infecção inicial (65). Essas moléculas estão divididas em algumas famílias: proteases de superfície gp63, superfamília trans-sialidase/gp85, mucinas e proteínas de superfície associadas à mucina (62). A ligação das glicoproteínas gp82, gp30 e gp35/50 promovem aumento intracelular de Ca^{2+} e favorecem a internalização do parasito, enquanto a gp90 é um regulador negativo (66-69).

Na infecção inicial, diversos tipos celulares são potenciais alvos de infecção pelas formas tripomastigotas sanguíneas, incluindo macrófagos, fibroblastos, células musculares esqueléticas, células epiteliais e neuronais (52, 70). No interior dessas células, o *T. cruzi* escapa dos vacúolos parasitóforos, diferencia-se para a forma amastigota (que apresenta flagelo curto internalizado) e replica-se no citoplasma. Posteriormente, as formas tripomastigotas rompem a célula hospedeira e podem alcançar a corrente sanguínea. O tripomastigota sanguíneo representa a forma infectante para o inseto vetor e outras células do hospedeiro (71). Independente da via de transmissão, o parasito alcança a corrente sanguínea e o sistema linfático, estabelecendo-se em músculos, tecido cardíaco, sistema digestivo e células fagocíticas (Figura 1.6; Tabela 1.1) (72).

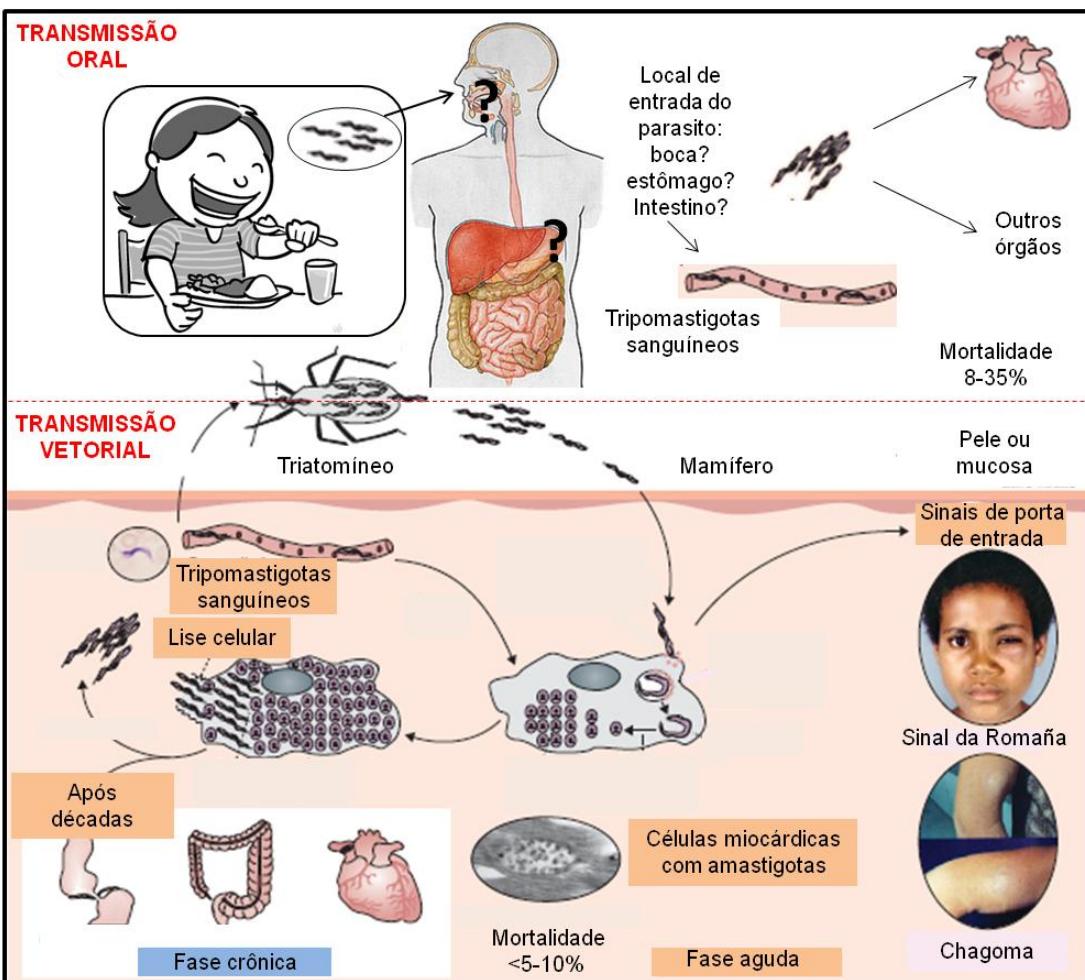


Figura 1.6. Ciclo biológico do *T. cruzi* e vias de transmissão.

Na transmissão pela via oral, após a ingestão de alimentos contaminados com as formas tripomastigotas metacíclicas presentes no triatomíneo, o parasito entra em contato com diversas portas de entrada em potencial ao longo do tubo digestivo, desde a boca até o trato gastrointestinal inferior. Os parasitos alcançam a corrente sanguínea, estabelecendo uma infecção sistêmica. Na transmissão pela via vetorial clássica, a penetração pela pele ou mucosa da conjuntiva promove edema, inchaço, congestão vascular e infiltrado inflamatório locais (chagoma). As formas tripomastigotas nas células do hospedeiro escapam do vacúolo parasitóforo e são liberadas no citoplasma onde se diferenciam em amastigotas e se multiplicam. Posteriormente, transformam-se em tripomastigotas novamente e promovem a lise das células infectadas, invadem os tecidos adjacentes e se disseminam via vasos linfáticos ou sanguíneos para outros tecidos, principalmente células musculares (cardíaca, lisa e esquelética) e do sistema nervoso, onde novamente passam por ciclos de multiplicação intracelular. Adaptado de (52).

Tabela 1.1 Infectividade tecidual do *T. cruzi* em mamíferos.

Tecido alvo	Humanos		Animais	
	Agudo	Crônico	Agudo (4-50 dpi)	Crônico (60-730 dpi)
Tecido adiposo	ND	(73)	(74-77)	(74, 76)
Adrenal	ND	ND	(77, 78)	ND
Sangue	(79)	(79, 80)	(77, 81-86)	(81, 82)
Osso	ND	ND	(87)	ND
Medula óssea	(88)	ND	(87)	ND
Cartilagem	ND	ND	(87, 89)	ND
Sistema nervoso central	(90)	(90)	(74, 77, 91, 92)	(74, 91)
Trato gastrointestinal	(90)	ND	(74, 77, 91);	(74, 91)
Coração	(90)	(90, 93, 94)	(74, 76, 77, 81, 91)	(74, 76, 81)
Fígado	ND	ND	(74, 77, 84)	ND
Pulmão	(90)	ND	(74)	(74)
Linfonodos	ND	ND	(74, 84, 95)	(74)
Músculo	ND	ND	(74, 77)	(74, 77)
Pâncreas	ND	ND	(74)	(74)
Células peritoneais	ND	ND	(86)	ND
Pele	(90)	(90)	ND	ND
Baço	ND	ND	(74, 76, 77, 84, 95)	(74, 76)
Esôfago/ estômago	ND	(96)	(74, 84, 85, 97)	(74)
Timo	ND	ND	(89)	ND
Rim	(90)		(74, 77, 81)	(74, 81);
Cavidade nasal	ND	ND	(95)	ND
Bexiga	ND	ND	(77)	(77)

ND, não determinado. Adaptado de (34).

Em modelos experimentais de infecção oral, foi demonstrado que a entrada

do parasito no mamífero pode ocorrer através da mucosa gástrica. As formas tripomastigotas, uma vez ingeridas, são capazes de invadir as células do epitélio gástrico e esse processo envolve a interação de uma glicoproteína de membrana estágio-específica (gp82) da forma tripomastigota metacíclica com a mucina presente na superfície das células epiteliais da mucosa gástrica (84, 97). Experimentos de infecção oral em camundongos utilizando diferentes cepas de *T. cruzi* demonstraram que a gp82 tem um papel importante nesse modelo (84, 98, 99). A afinidade pela mucina gástrica sugere que o estômago seja uma porta de entrada na infecção oral. Mimetizando as condições *in vivo*, quando se adiciona mucina gástrica às células *in vitro*, a infectividade de parasitos deficientes de gp82 é reduzida, enquanto a cepa que expressa gp82, não é alterada (67). Os mecanismos de invasão celular mediada por gp82 foram parcialmente descritos *in vitro* em cultura de células epiteliais humanas. Essa molécula liga-se a seu receptor na célula e desencadeia no parasito e na célula hospedeira uma cascata de sinalização intracelular culminando na mobilização de Ca²⁺ que é essencial para internalização do protozoário. Essa sinalização ocorre em células susceptíveis a esse patógeno, como células HeLa e Vero, mas não nas resistentes (98, 100, 101). Outra molécula que promove mobilização de Ca²⁺ e está envolvida no processo de invasão durante a infecção por esta via é a gp30. Esta possui menor afinidade pela mucina gástrica que a gp82, portanto cepas que não possuem gp82, mesmo expressando gp30, são menos infectivas (67). É importante ressaltar que a gp82, fundamental nessa via de infecção, é resistente ao suco gástrico. Parasitos submetidos às condições do meio gástrico *in vivo*, quando recuperados do estômago de camundongos 1h após infecção oral, ou *in vitro*, quando tratados com pepsina em pH ácido, permanecem com gp82 intacta e funcional, e a infectividade é mantida (85, 102). Há outra glicoproteína estágio-específica de formas metacíclicas, a gp90, que também se liga aos receptores nas células hospedeiras, mas não induz aumento de Ca²⁺ intracelular, promovendo um efeito negativo na invasão. Portanto, cepas que expressam baixos níveis de gp90, possuem maior infectividade (103). Desta forma, a ação do suco gástrico pode facilitar a entrada do parasito nas células da mucosa gástrica (Figura 1.7) (98).

Após a invasão do epitélio, as formas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas que se replicam e se diferenciam em tripomastigotas. Estes alcançam a corrente sanguínea e são capazes de disseminar para vários órgãos e tecidos,

estabelecendo uma infecção sistêmica (98).

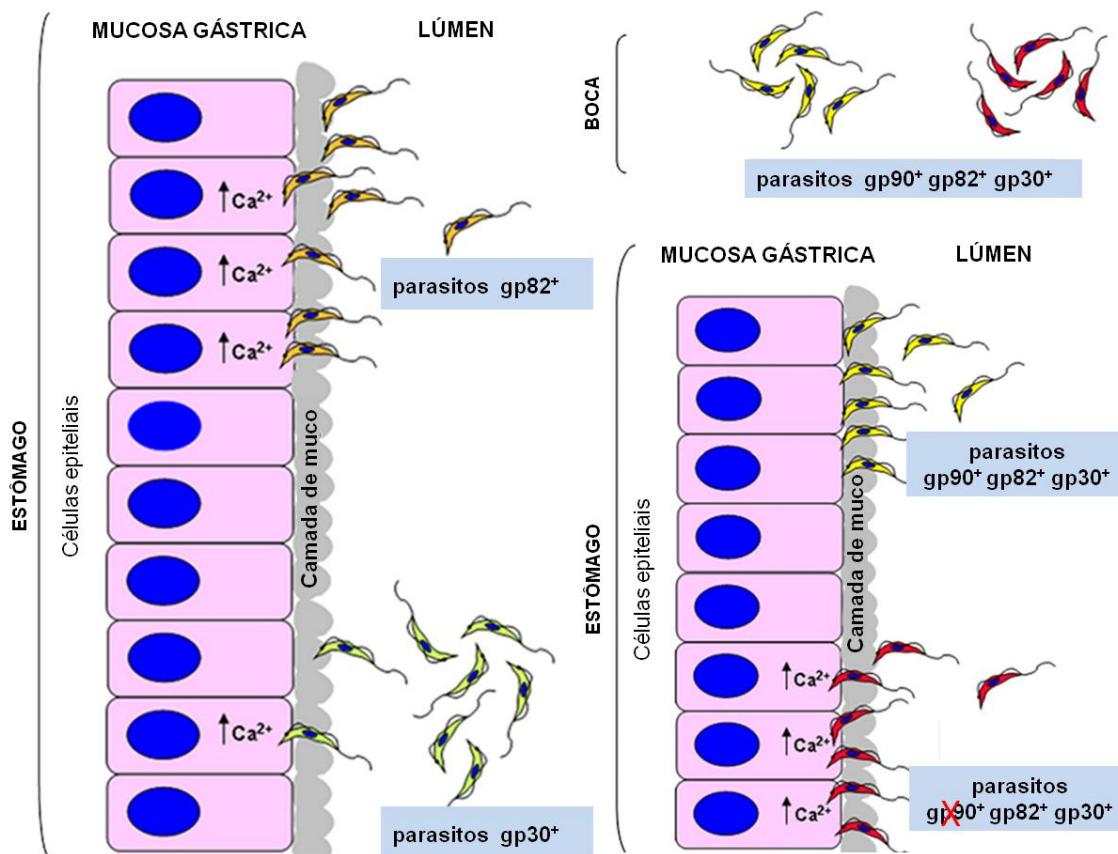


Figura 1.7. Modelo das interações das formas tripomastigotas metacíclicas com os componentes do hospedeiro após inoculação pela via oral.

Uma vez no estômago, os parasitos expressando as moléculas gp82 e gp30 (resistentes à pepsina em pH ácido) são capazes de invadir as células epiteliais da mucosa gástrica, sendo a primeira mais eficiente no mecanismo de internalização. A gp90 inibe a invasão do parasito nas células da mucosa, portanto cepas expressando esta molécula resistente à pepsina em pH ácido não são invasivas, enquanto que as expressam a gp90 suscetível são mais infectivas. Adaptado de (98).

1.2.4 Manifestações clínicas

O período de incubação pode variar dependendo da via de infecção, sendo de 4-15 dias na transmissão vetorial clássica, 3-22 dias na transmissão oral e 30-112 dias na transmissão por transfusão sanguínea (48).

A doença de Chagas possui duas fases clínicas: aguda e crônica. Na fase aguda da doença encontra-se elevado número de parasitos na circulação sanguínea

e tecidos, enquanto na fase crônica, vários estudos mostraram que baixo grau de parasitismo, inclusive no tecido cardíaco associado à miocardite (104).

Na fase aguda, os pacientes podem apresentar febre prolongada, dores musculares e nas articulações, sonolência, diarreia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, edema subcutâneo, distúrbios respiratórios, cianose e coma (52, 105). Quando a infecção ocorre através do repasto sanguíneo do inseto vetor, pode-se observar edema e linfadenopatia local após 7-14 dias, além de uma reação inflamatória local, conhecida como chagoma de inoculação ou Sinal de Romaña (61). Essa fase caracteriza-se pela intensa multiplicação do parasito nos tecidos e pela presença de tripomastigotas sanguíneos. Desta forma, durante a fase aguda são comumente observados, nas células musculares e da glia, ninhos de amastigotas (106). Um sintoma importante dessa fase é a miocardite causada pelo parasitismo das fibras do miocárdio que levam a uma intensa resposta inflamatória. Este processo inflamatório promove destruição tanto do tecido infectado como do não infectado (46, 107).

Com relação ao fígado, na infecção aguda, as enzimas hepáticas encontram-se elevadas, decaendo com a redução da parasitemia. Os danos causados pela infecção neste órgão já foram demonstrados tanto em humanos, como experimentalmente (108, 109). Macrófagos, células de Kupffer e hepatócitos são potenciais alvos do parasito. Além disso, a presença de células fagocíticas no fígado atribui, a este, papel importante na remoção dos parasitos do sangue. Por outro lado, o *T. cruzi* pode induzir apoptose e inflamação mediada por TNF- α no fígado de camundongos infectados (109, 110).

Ocasionalmente, pacientes infectados vão a óbito nessa fase da doença devido às complicações da miocardite e meningoencefalite, mas a maioria dos indivíduos infectados (aproximadamente 90%) apresenta recuperação espontânea em 3-4 meses (52, 105). O desenvolvimento da fase aguda pode variar de acordo com a cepa de *T. cruzi* e a resistência do hospedeiro (111). Posteriormente, a doença torna-se assintomática e latente por até 20 anos após infecção e pode evoluir para fase crônica ou não, forma indeterminada (112).

Cerca de um terço dos indivíduos infectados pela via vetorial clássica evoluem para fase crônica sintomática e passam a apresentar morbidades como cardiomiopatia, megacôlon, megaesôfago ou alterações no sistema nervoso. Em

geral, esses pacientes possuem uma expectativa de vida reduzida em 9 anos (113). Na fase crônica, dois terços dos indivíduos não apresentam manifestações clínicas detectáveis da doença de Chagas. Estes pacientes apresentam a forma indeterminada, que é caracterizada por positividade de anticorpos contra *T. cruzi* no soro, eletrocardiograma (ECG) normal e raio-X de tórax, esôfago e cólon normais (52). Entre os pacientes sintomáticos, 94,5% apresentam manifestações cardíacas e os 4,5% restantes apresentam a síndrome dos mega (megaesôfago e megacôlon). A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é um dos sintomas mais importantes da doença e a principal causa de morte nos pacientes. Essa cardite pode gerar cardiomegalia, alterações de ECG e ecocardiograma (ECO), e falência do órgão (52, 104). Reativação da doença pode ocorrer em indivíduos crônicos que se tornam imunologicamente comprometidos, por coinfecção com HIV ou uso de imunossupressivos (114).

Na infecção por transmissão oral, os sinais clínicos são similares àquela pela via vatorial clássica, mas com algumas peculiaridades: síndrome febril indiferenciada sem a presença do chagoma, mialgia, vômito, dor abdominal e diarreia. Além disso, a taxa de mortalidade é mais alta quando compara a transmissão vatorial clássica (52). Os indivíduos que sobrevivem à fase aguda, geralmente desenvolvem cardiomiopatia crônica (51).

O tratamento da doença, independente da via de transmissão, é realizado pela administração do benznidazol ou nifurtimox. Ambos são quase 100% eficientes na cura parasitológica, se administrados em momentos iniciais da fase aguda, e esta eficiência diminui com o tempo de infecção. É indicado para reativações da infecção, crianças com infecção congênita, pacientes no início da fase crônica e também, para adultos infectados sem sintomas. Os potenciais benefícios são prevenção, quando administrado na fase aguda, ou retardo das manifestações clínicas, quando a administração é mais tardia. Não podem ser utilizados em grávidas ou pacientes com falência renal/hepática (37). Um estudo envolvendo portadores de doença de Chagas aguda demonstrou que 16 de 17 indivíduos apresentaram redução de parasitemia após 6 meses de tratamento com benznidazol e progressiva diminuição dos níveis de IgG contra *T.cruzi* em até 7 anos. A localização geográfica, estilo de vida e associação com consumo de açaí, no caso da região amazônica sugerem relação com a transmissão oral, e a ausência chagoma de inoculação e triatomíneos intradomiciliares corrobora com a hipótese. No entanto, outro estudo com uma

coorte preminantemente de indivíduos também infectados pela via oral demonstrou 23,6% de cura sorológica (115, 116). Recentemente, foi demonstrado que o benznidazol promove redução da detecção de parasitos sanguíneos por PCR em pacientes com CCC, no entanto, o dano cardíaco clínico não apresenta melhora significativa ao longo de 5 anos de estudo prospectivo (117)

1.2.5 Resposta imune

1.2.5.1 Humanos

A presença de células inflamatórias no miocárdio é um dos fatores da patogênese da CCC. Alguns estudos demonstraram que tanto linfócitos periféricos como células mononucleares do infiltrado cardíaco de pacientes com CC apresentam perfil T_H1, produzindo significativamente mais IFN- γ , TNF- α e IL-6, e menos IL-4 e IL-10, que células provenientes do sangue de pacientes assintomáticos (70, 118-120). Além disso, células mononucleares de sangue periférico de pacientes crônicos com a forma indeterminada produzem maiores níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-10 (70, 120-124). No miocárdio de pacientes crônicos, há aumento da expressão de moléculas de adesão, moléculas HLA de classe I e II, quimiocinas, como CCL2, CXCL10 e CXCL9 e de seus receptores CCR2 e CXCR3 e de citocinas, como IFN- γ , TNF- α , IL-15, IL-6 e IL-4 (125, 126). O perfil da expressão gênica no tecido cardíaco de pacientes com CCC mostrou que 15% dos genes conhecidamente aumentados nestes pacientes são induzidos por IFN- γ (127). Estudos recentes sugerem que pacientes na fase indeterminada apresentam maior frequência de células T CD4 $^{+}$ CD25 $^{\text{high}}$ em sangue periférico em comparação aos cardíacos e não infectados (112, 128). Além disso, pacientes com as formas menos agressivas da doença (sem ou com cardiomiopatia leve) produzem mais IL-10 e IL-17, enquanto que os com cardiomiopatia avançada possuem reduzida função de T_{REG} e menores níveis de IL-17 (129).

Em pacientes portadores da doença crônica, foi demonstrado que, 90% das IgG produzidas são IgG1 e IgG2 (130). Além disso, autoanticorpos contra miosina cardíaca, tubulina, actina, receptores β -adrenérgicos e muscarínicos, mioglobulina, tireoglobulina, mielina, entre outros, foram detectados em indivíduos infectados. No entanto, geração desses anticorpos autorreativos e o papel na patologia cardíaca

ainda não estão estabelecidos (70). (70, 148, 151-155). A produção de diferentes isótipos de imunoglobulinas é controlada por citocinas distintas. Citocinas T_H1 (IL-12, IFN-γ e TNF-α) são responsáveis pela produção de IgG1 e IgG3, enquanto citocinas T_H2 (IL-4 e IL-10) estimulam a produção de IgG2a (156, 157). Já a citocina IL-5 é importante na troca de classe para IgA (158).

Nos dados descritos na literatura, não está clara a via de transmissão pela qual o paciente foi infectado. No que diz respeito ao estudo de parâmetros da resposta imune e dos mecanismos envolvidos na cardite em pacientes sabidamente infectados especificamente por via oral não há trabalhos na literatura.

1.2.5.2 Modelo experimental

Devido à dificuldade de realizar estudos mais aprofundados em pacientes, os modelos animais são de fundamental importância para melhor compreensão do papel da resposta imune à infecção.

Diversos estudos em modelos murinos da infecção aguda pelo *T. cruzi* demonstraram intensa ativação policlonal de células T CD4⁺ e CD8⁺ e B, que são expandidas em órgãos linfoides secundários persistindo até a fase crônica da doença (131-133). Esta ativação é seguida de imunossupressão mediada pela redução da produção de IL-2 e devido à morte celular induzida por ativação (“activation-induced cell death”, AICD) por apoptose via Fas/FasL ou excesso na produção de óxido nítrico (134, 135). Essa resposta é também caracterizada por um forte perfil T_H1, com produção de citocinas pró-inflamatórias IFN-γ, TNF-α e IL-12, que são importantes no controle do parasitismo (136-138), através da ativação de macrófagos e subsequente síntese de óxido nítrico, o qual tem importante função tripanocida (70, 139). No entanto, o aumento na produção de óxido nítrico estimula a produção de Fas e FasL em linfócitos levando-os à apoptose e contribuindo para as lesões teciduais progressivas características da doença, como a miocardite (138). Estudos mostraram que camundongos deficientes de IFN-γ e TNF-R1 são mais suscetíveis a infecção que os selvagens, portanto a produção destas citocinas pode estar associada à proteção contra o parasita (140, 141). Entretanto, TNF-α também pode ter efeito prejudicial, quando em excesso. Camundongos deficientes de IL-10 apresentam alta concentração sistêmica dessa citocina, entre outras, e também maior taxa de mortalidade quando comparados aos selvagens. Uma vez

que TNF- α é sabidamente um mediador de choque tóxico e caquexia, sugere-se que este seja um mediador da mortalidade devido ao choque tóxico (142).

Por outro lado, a produção de IL-4, IL-10 e TGF- β , citocinas TH2, antiinflamatórias, está relacionada à replicação do parasito através de inibição da atividade tripanocida do macrófago (143, 144). Além disso, após a apoptose, células mortas são rapidamente removidas por células fagocíticas profissionais, seguido pelos efeitos imunossupressores das células apoptóticas, inibindo a produção de IL-12 e induzindo secreção de TGF- β pelos macrófagos (135). Dados na literatura relatam o papel do TGF- β na infecção por *T. cruzi*. A inibição do receptor dessa citocina dificulta a invasão do cardiomiócito e a diferenciação e liberação de tripomastigotas, reduzindo então o número de parasitos por células infectadas (145). Esses dados sugerem que o TGF- β possa ser um potencial alvo terapêutico para tratamento da enfermidade (141, 145).

Deste modo, as citocinas pró-inflamatórias são essenciais para o controle da disseminação do parasito ao passo que as antiinflamatórias são necessárias para promover uma regulação dos efeitos destrutivos da inflamação exacerbada, a qual promove danos teciduais. Assim, o balanço entre essas citocinas é essencial para manter a homeostasia tecidual (141).

Além das citocinas TH1 e TH2, tem se demonstrado também o papel das células TH17 durante a infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos infectados e tratados com anticorpos monoclonais contra IL17 apresentam aumento da miocardite, mortalidade prematura e diminuição da carga parasitária no coração, sugerindo que IL-17 controla a resistência do hospedeiro. Em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, essa citocina parece agir na diferenciação de TH1 via redução da produção de IL-12 e da expressão de Tbet, e consequentemente, promove diminuição da produção de TNF- α e INF- γ dentre outras moléculas (146).

Com relação ao papel das células B, estas parecem ser relevantes no controle da parasitemia, uma vez que a sua depleção leva a uma elevada susceptibilidade à infecção, e a transferência de imunoglobulinas purificadas de camundongos infectados protege o receptor contra infecção letal (113, 147). Esta ativação causa uma hipergamaglobulinemia poliisotípica significativa, sendo caracterizada por um aumento considerável de imunoglobulinas e uma resposta inespecífica ao parasito (98% dos anticorpos produzidos não são específicos).

Durante a resposta, é comum detectar altas concentrações de IgG2a e IgG2b entre os anticorpos específicos a *T. cruzi*, e IgG2a entre os inespecíficos. Esta ativação policlonal das células B foi bem demonstrada no modelo murino, promovendo aumento do número de células B secretoras de anticorpos no baço e linfonodos periféricos. No entanto, este fenômeno ainda não está totalmente estabelecido em humanos (148-150). A participação dos anticorpos no controle da infecção envolve os processos de opsonização, citotoxicidade mediada por anticorpos (ADCC, “Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity”), ativação da via clássica do complemento e inibição de invasão da célula hospedeira

Apesar dos anticorpos apresentarem papel protetor, durante a infecção, a ativação policlonal pode incluir expansão de clones autorreativos que são importantes na fisiopatologia da doença e podem estar envolvidos no desenvolvimento de autoimunidade (150, 159). Os autoanticorpos podem mediar destruição tecidual por ativação da via clássica do complemento e por opsonização do tecido cardíaco, levando à ativação de macrófagos (70). A produção destes anticorpos tem sido relacionada às células B-1 CD5⁺, já que há um aumento destas no baço durante a infecção por *T. cruzi* (160).

Em órgãos linfoideos secundários, a infecção pela via intraperitoneal induz uma resposta regional diferenciada com hipertrofia de linfonodos subcutâneos (scLNs) e baço, acompanhada de expansão das populações de linfócitos T e B, e atrofia dos linfoidos mesentéricos (mLNs) e placas de Peyer, com redução no número de linfócitos T e B. Linfócitos T provenientes de scLN e baço apresentam perfil misto de citocinas TH1/TH2 com produção de IL-4, IL-10 e IFN-γ, enquanto que nos mLN, há uma diminuição de IL-4 e IL-10 e aumento de IFN-γ (37, 58, 161-163).

Não está bem definido ainda se o dano tecidual cardíaco observado na doença é causado diretamente pelo parasito ou indiretamente através da resposta imune por ele desencadeada (164). A autorreatividade é observada em alguns pacientes e em modelos animais, e pode ser gerada pela ativação policlonal observada na infecção (165), mimetismo de moléculas próprias por抗ígenos do parasito (125) ou epítópos divididos pelo hospedeiro e o patógeno (166). No entanto, essa questão da patogenia ainda é controversa.

Estudos com cardiomiócitos murinos neonatais demonstraram que estes quando expostos a IFN-γ apresentam aumento da expressão do fator natriurético

atrial, um marcador de hipertrofia de cardiomiócitos e de insuficiência cardíaca (127), sugerindo que o IFN- γ pode modular diretamente a expressão do gene em células do miocárdio. Corroborando com dados em pacientes, essas observações sugerem que as citocinas inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , e as quimiocinas na inflamação crônica do miocárdio desempenham um papel significativo na lesão cardíaca observada na CCC. Além disso, a administração de receptor solúvel de TNF- α para bloqueio da citocina em hamsters infectados promove uma grave disfunção cardíaca nestes animais quando comparados com os não tratados, embora não haja aumento da parasitemia. Portanto, sugere-se que um possível papel protetor do TNF- α residual na sinalização na cardiomiopatia chagásica. Este achado paradoxal indica que o equilíbrio imunológico nessa patologia é muito delicado (167).

1.2.6 Modelo experimental de infecção oral

A infecção pela via oral em humanos e camundongos vem sendo documentada desde 1968, assim como sua relevância biológica em estudos de vacinas. Diversos grupos vêm utilizando modelos experimentais da infecção pela via oral/intragástrica (48, 53, 84, 97, 102, 168-170).

Os protocolos experimentais descritos demonstram diferentes formas de inoculação (mucosa oral, intragástrica e intrafaríngeana), mecanismos de invasão às células da mucosa gástrica, descrição de algumas alterações patológicas e imunológicas provenientes da infecção e possível desenvolvimento de uma resposta protetora em desafio secundário com o parasito (67, 84, 168-170). No entanto, ainda há uma carência de estudos mais aprofundados referentes à resposta imune e à cardite nesse modelo.

Hoft e colaboradores (1996) demonstraram que após o desafio de camundongos com a cepa Tulahuén do *T. cruzi* por inoculação oral, 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, este infiltrado torna-se mais intenso, com predomínio de células mononucleares e envolvimento da submucosa e camada muscular adjacente, e observa-se replicação do parasito na mucosa. 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). No fígado, também foi observada presença de parasitos, Não foi detectada a presença do *T. cruzi*, após sua inoculação oral, na orofaringe, esôfago e placas de Peyer, mas sim no estômago (84). Além disso, já foram descritas as interações moleculares com células epiteliais do estômago, sugerindo que a entrada do parasito no animal ocorre através da mucosa gástrica (84, 97, 171). Entretanto, ainda não foram descritas possíveis interações deste patógeno com componentes da mucosa da cavidade oral e sua participação como porta de entrada na infecção.

Após desafio pela mucosa oral, o *T. cruzi* é capaz de estimular resposta de células B, incluindo produção de IgA e IgG parasito-específicas principalmente por essas células presentes na mucosa gástrica. Acredita-se que estas células estariam sendo recrutadas de sítios indutores da imunidade da mucosa gastrointestinal, as placas de Peyer, para a mucosa gástrica, principalmente devido à grande carga parasitária neste local. Entre os linfócitos da mucosa gástrica (linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria), há a presença de células produtoras de IFN- γ , e não produtoras de IL-4 (84).

Outros grupos utilizaram protocolos de infecção intragástrica ou intrafaringeana, e demonstraram os mecanismos moleculares da interação parasito-mucosa descritos anteriormente (97, 102) e também a influência do biodema na transmissão oral. Uma genotipagem multilocus de cepas de *T. cruzi* demonstrou seis unidades de tipagem discreta (DTUs, “discrete typing unit I”) classificadas em duas subdivisões principais, DTU I e II (172). Cepas de *T. cruzi* I (Tc I/DTU I), que são altamente prevalentes entre reservatórios naturais, quando comparadas com outras cepas, possuem maior infectividade após inoculação gástrica. Estes dados contribuíram para sugerir uma associação entre as mesmas e os episódios registrados de doença de Chagas aguda atribuídos à transmissão oral (51, 56, 169).

Tanto na fase aguda como na crônica, há detecção de inflamação no estômago e coração após infecção IG, seguida por alterações na produção de citocinas e dinâmica celular. Um aumento de IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10, CCL4 e IL-3 é observado no estômago durante a fase aguda, enquanto IL-12, TNF- α , CCL3, CXCL1, RANTES, CXCL9, CXCL10, G-CSF, M-CSF, IL-2 e IL-7 na fase crônica. No coração encontram-se elevados IL-10 e CXCL1; e IL-12, IL-10, CXCL9, e CXCL10 na fase crônica. Entretanto, o perfil pode variar de acordo com a cepa (173). A infecção IG,

assim como a IP, também aumenta os níveis séricos de neutrófilos, linfócitos e monócitos, e diminui eosinófilos. A esplenomegalia observada é acompanhada de aumento de linfócitos CD8⁺ e duplo positivas CD8⁺CD4⁺, enquanto o timo apresenta um discreto aumento em contraste à atrofia na infecção IP (174). Elevados níveis de IL-12, IL-10 e GM-CSF são expressos no baço durante a fase aguda, e IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-9, CCL3, CXCL9, CXCL10, GM-CSF, IL-2 e IL-7 na crônica (173). Os mLN_s diminuem após infecção IG com redução de linfócitos CD4⁺ (174). Além disso, a via de infecção parece não alterar a habilidade do parasito de induzir uma forte resposta de células T CD8⁺ (170). Assim como descrito em modelos de infecção intraperitoneal, a infecção intragástrica também promove aumento de células T CD4⁺ e CD8⁺ no baço (175).

1.3 Inoculação oral versus intragástrica: vias similares de infecção?

Apesar de serem consideradas vias similares na literatura, IG e IO não apresentam o mesmo padrão de resposta do hospedeiro. Observamos anteriormente que a infecção IO promove maior parasitemia, mortalidade e percentual de camundongos com parasitemia patente (Figura 1.8), além de níveis séricos de TNF- α , IFN- γ e IL-10 mais elevados que IG (Figura 1.9). No entanto, este grupo apresentou maior extensão de infiltrado inflamatório cardíaco (Figura 1.10). Além disso, a infectividade, parasitemia e mortalidade após a infecção IO foi mais próxima ao IP (Figura 1.8).

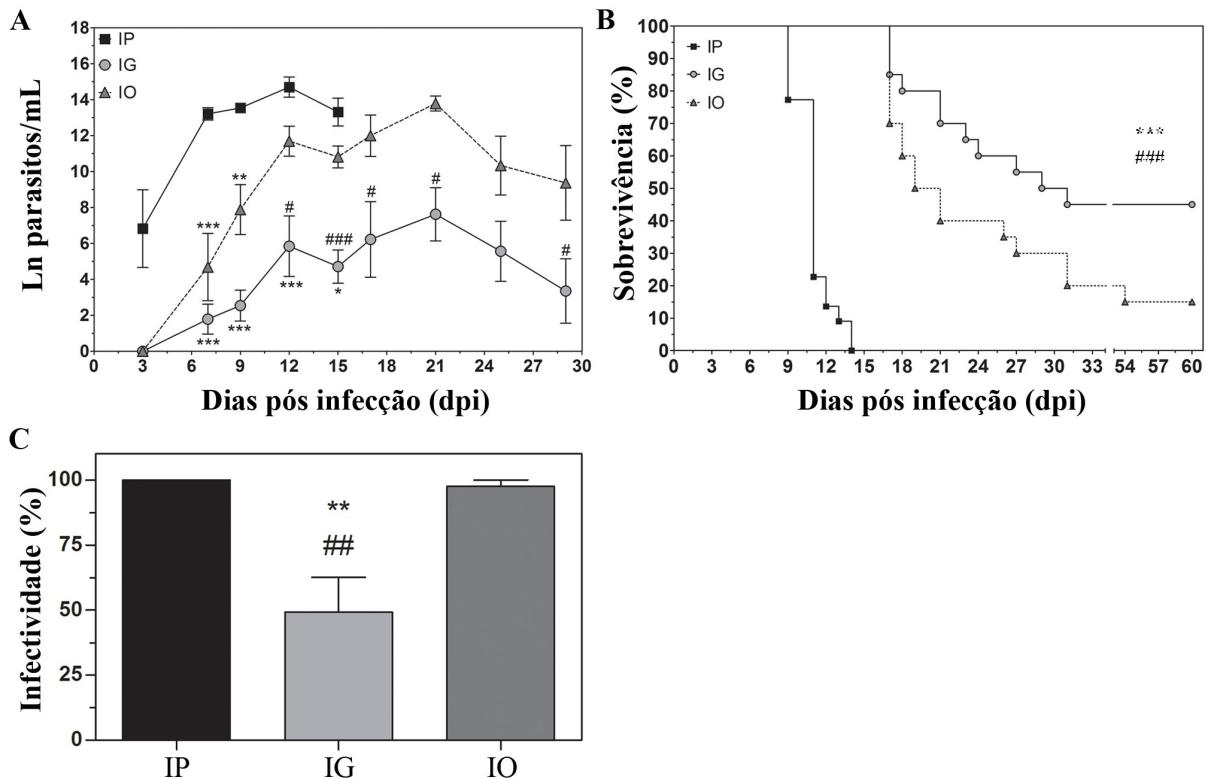


Figura 1.8 A infecção pelo *T. cruzi* pela cavidade oral apresenta maior gravidade na fase aguda.

A/B) Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) derivados de cultura através de inoculação por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). **A)** A parasitemia foi monitorada durante a fase aguda e expressa em ln de parasitos por mililitro (valores de média e erro padrão da média) para as análises. Os parasitos foram contados em microscópio óptico de campo claro e parasitemia calculada pelo método de Brener. As comparações entre os grupos foram realizadas em diferentes dias pós-infecção (dpi) através dos testes Kruskal-Wallis (teste Q de Dunn) até 15 dpi, e Mann-Whitney em diante. n: IP, 3 dpi=3, 7 dpi=17, 9 dpi=10, 12 dpi=5, 15 dpi=3; IG, 3 dpi=7; 7 dpi=22; 9 dpi=29; 12 dpi=17; 15 dpi=45; 17 dpi=10; 21 dpi=24; 25 dpi=16; 29 dpi=11; IO, 3 dpi=4; 7 dpi=9; 9 dpi=14; 12 dpi=22; 15 dpi=40; 17 dpi=12; 21 dpi=14; 25 dpi=8; 29 dpi=6. Os números amostrais mais baixos representam estágios iniciais, quando a parasitemia ainda era indetectável e estágios finais, quando as taxas de mortalidade eram maiores. O número total foi obtido de experimentos diferentes. * representa as diferenças em comparação a IP e #, diferenças entre IG e IO. **B)** A mortalidade foi acompanhada e a sobrevivência analisada pelos testes Mantel-Cox (*) e Gehan-Breslow-Wilcoxon (#). n= 20 camundongos (equivalente a 100%). **C)** A infectividade foi obtida a partir da razão do percentual de camundongo apresentando parasitemia e o total de camundongos que receberam o inóculo de parasitos. O teste Kruskal-Wallis (teste Q de Dunn) foi realizado e os símbolos representam a comparação em relação à IP ou IO, * e #, respectivamente. n=4 experimentos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o “software GraphPad Prism 5”. * p=0,05; ** p=0,01; *** p=0,001 (176).

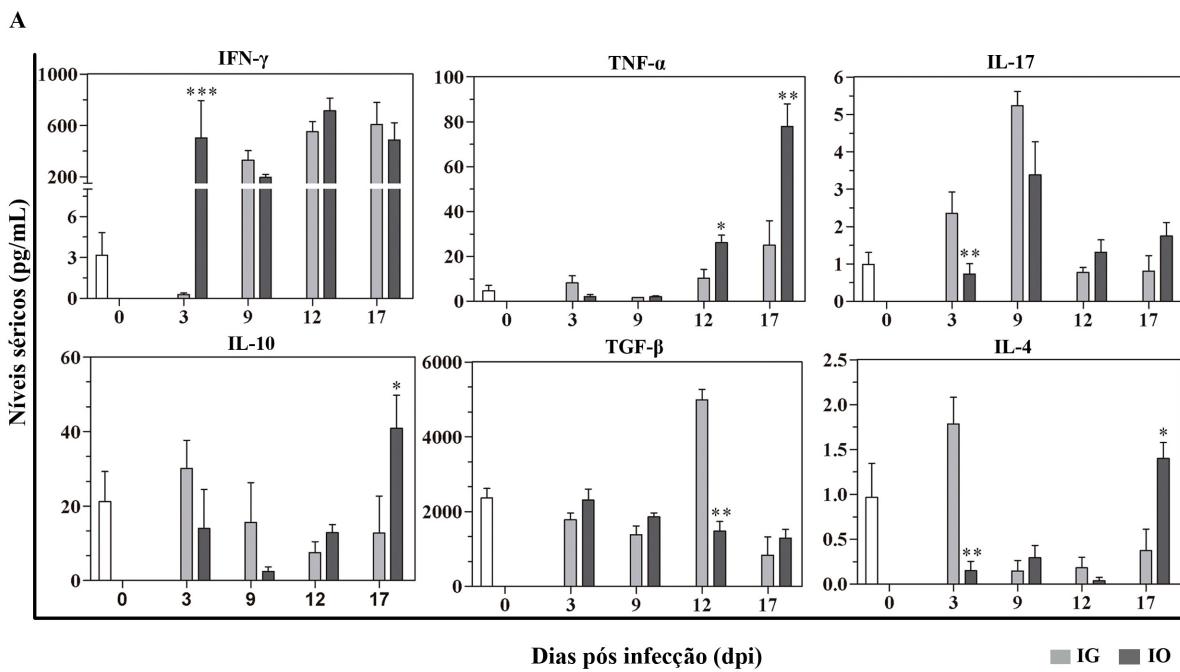


Figura 1.9. Produção de citocinas em camundongos infectados pelas vias intragástrica e oral.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). Durante a infecção aguda, o soro foi isolado e os níveis de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10 e TGF- β) foram quantificados em camundongos infectados e controles não infectados por análise multiplex. Os resultados estão expressos como valores de média±erro padrão da média por cada grupo/dpi. n: IFN- γ , não infectado (0)=12; 3 dpi IG=11, IO=5; 9 dpi IG=8, IO=5; 12 dpi IG=9, IO=4; 17 dpi IG=4, IO=6. TNF- α , não infectado (0)=11; 3 dpi IG=10, IO=10; 9, 12 dpi, IG=3, IO=3; 17 dpi, IG=6, IO=11. IL-17, não infectado (0)=12; 3 dpi, IG=10, IO=10; 9 dpi, IG=3, IO=3; 12 dpi, IG=5, IO=5; 17 dpi, IG=6, IO=14. TGF- β , não infectado (0)=6; 3 dpi, IG=4, IO=4; 9 dpi, IG=5, IO=5; 12 dpi, IG=5, IO=4; 17 dpi, IG=2, IO=5. IL-10 e IL-4, não infectado (0)=6; 3, 9, 12 dpi, IG=6, IO=6; 17 dpi, IG=3, IO=8. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste Mann-Whitney (unilateral superior), “GraphPad Prism 5”. *, p=0,05; **, p=0,01; ***, p=0,001. *IG versus IO. O teste Kruskal-Wallis (teste Q de Dunn) foi utilizado para análise da cinética. IFN- γ apresentou aumento em ambos os grupos, e TNF- α e IL-10 estavam aumentados no grupo IO em relação ao controle não infectado. IL-17 apresentou aumento seguido de redução (pico em 9 dpi) significativos no grupo IG. TGF- β estava elevado apenas no grupo IG após 12 dpi (176).

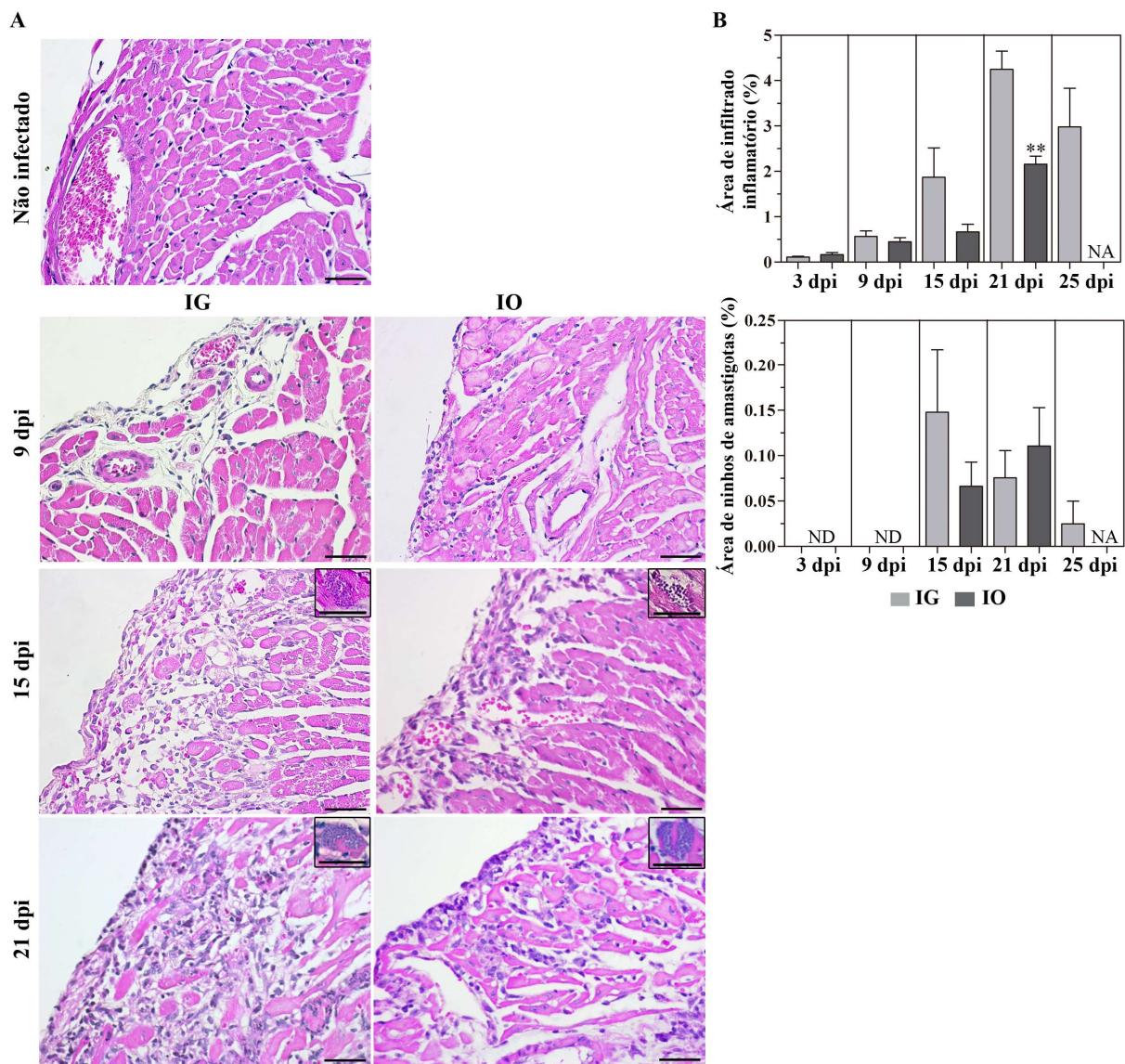


Figura 1.10. O coração de camundongos infectados pela via intragástrica apresenta mais infiltrado do que os pela via oral.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) através de inoculação por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). Os corações foram retirados em diferentes dias pós-infecção (dpi), fixados e incluídos em parafina. Secções histológicas longitudinais foram coradas por hematoxilina-eosina. Para a quantificação do infiltrado inflamatório e dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, foi analisada a área relativa de infiltrado ou ninhos de amastigotas em 50 campos (400x). n=4-5 camundongos/dpi/grupo. *IG versus IO. Os valores representam média ± erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas no “GraphPad Prism 5” para comparação entre IG e IO usando o teste Mann-Whitney (unilateral superior). * p=0,05; **p=0,01; ***p=0,001. ND, não determinado; NA, não analisado. As barras representam 20 µm. Insertos mostram ninhos de amastigotas (176).

Há poucos trabalhos na literatura demonstrando a organização e função do sistema imune na mucosa oral, que representa muito mais que uma simples porta de entrada para o trato gastrointestinal (27). Recentemente, o palato mole foi identificado como um importante sítio de adaptação e multiplicação do vírus influenza (177). Dados na literatura descrevem a entrada do *T. cruzi* pela mucosa gástrica (84, 102). No entanto, dados recém publicados do nosso grupo demonstraram um tropismo preferencial dos parasitos para a região da cabeça em momentos iniciais após infecção oral. Dessa forma, é ressaltada a importância do microambiente da cavidade da oral como ponto de partida para infecções e indução da resposta imune. Além disso, após a infecção na cavidade oral é possível detectar DNA satélite de *T. cruzi* em diversos órgãos, como principalmente a cavidade nasal, mas também esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, linfoides mandibulares, hipófise, cérebro, coração, baço, e fígado (178).

Esta diferença entre as inoculações oral e intragástrica vem sendo discutida também em modelos de tolerância oral e de outras infecções por patógenos oralmente adquiridos, como por exemplo, a bactéria *Listeria monocytogenes*. No contexto de administração de antígenos para indução de tolerância oral, foi demonstrado que 1h após inoculação única de OVA (ovalbumina) via oral ou intragástrica, apesar de maior percentual de células ativadas no linfonodos cervicais, mesentéricos e periféricos, o NALT (“nasal-associated lymphoid tissue”) representou o local inicial de proliferação de células específicas para OVA. Vale ressaltar que o NALT de camundongos expostos à OVA via oral apresentaram maior percentual de células em proliferação comparados a via intragástrica (179). O contexto relacionado à infecção oral por *L. monocytogenes* será abordado na próxima seção.

1.4 Listeriose

1.4.1 Epidemiologia, distribuição geográfica e transmissão

A listeriose é causada pela bactéria gram-positiva intracelular facultativa *L. monocytogenes* e estima-se 23.150 indivíduos no mundo foram afetados em 2010, contribuindo para 5.463 mortes nesse ano. Além disso, a maior taxa de anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALY, “Disability-adjusted life-years”) foi observada na região da América Latina (Figura 1.11) (180). A listeriose humana tem

taxa de incidência relativamente baixa, mas taxa de mortalidade é elevada, podendo alcançar 30% (181).

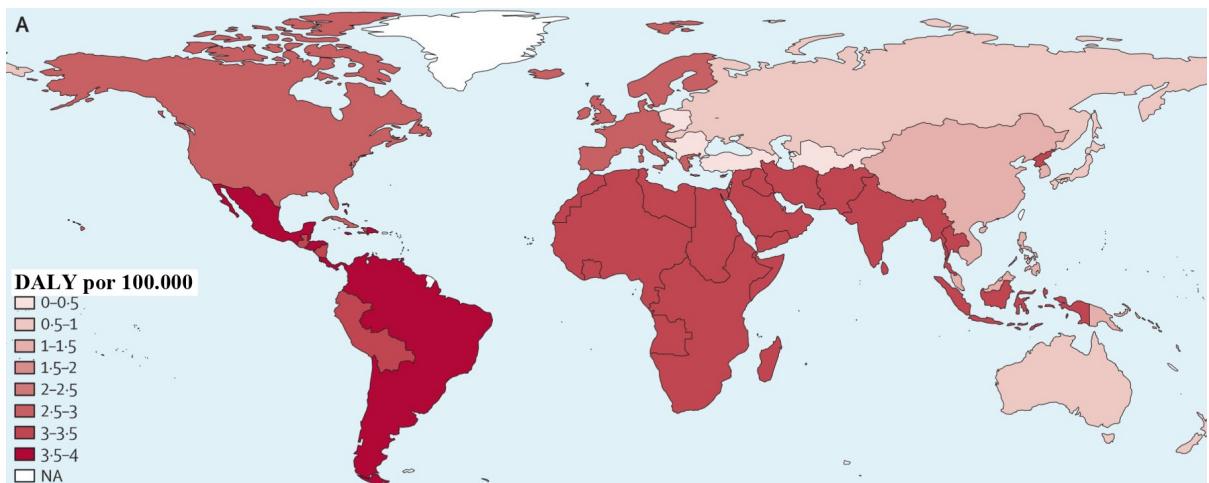


Figura 1.11. Anos de vida perdidos ajustados à incapacidade (DALY, “Disability-adjusted life-years) por 100.000 pessoas com listeriose (incluindo natimortos) por subregião da Organização Mundial de Saúde.

Tempo de vida perdido devido à doença representado por subregião da OMS. Adaptado de (180).

A listeriose clínica afeta principalmente os seguintes grupos de risco: gestantes, idosos, indivíduos imunocomprometidos, fetos e neonatos (transmissão vertical ou no momento do nascimento pelo contato com o canal vaginal) (180, 182). Atualmente, pode ser considerada uma doença que afeta principalmente idosos imunocomprometidos (183).

L. monocytogenes também representa uma preocupação para a indústria de alimentos devido a sua habilidade de se reproduzir em uma variedade de condições e ambientes (174). Diferente de outras bactérias de origem alimentar, *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver em condições adversas, cresce em ampla faixa de temperatura (1-45°C), e sobrevive ampla faixa de pH (4,5-9,6) e altas concentrações de cloreto de sódio (10-15% NaCl). Além disso, multiplica-se em diferentes tipos de produtos alimentares: leite não pasteurizado, queijos moles, laticínios em geral, vegetais e produtos de origem animal processados ou não (184). Portanto a transmissão pode ocorrer pela ingestão desses alimentos contaminados.

1.4.2 Órgãos alvo e entrada da bactéria nas células do hospedeiro

Após a ingestão, *L. monocytogenes* é capaz de invadir células não fagocíticas do hospedeiro por mecanismos que envolvem a interação das internalinas (Inl) de superfície. A InlA liga-se à E-caderina humana, enquanto a InlB interage *in vitro* com o receptor tirosina quinase Met, tanto murino quanto humano, em diversos tipos celulares de mamíferos, como por exemplo, hepatócitos e células endoteliais (185, 186). Esta interação promove fosforilação dos receptores e recrutamento de clatrina, seguido de rearranjo do citoesqueleto e endocitose (187, 188). Uma vez no interior da célula, a bactéria é capaz de romper o vacúolo endocítico pela ação de moléculas efetoras secretadas, a toxina formadora de poro listeriolisina O (LLO) e fosfolipase C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC), e posteriormente, replica-se no citosol (189, 190). Além disso, expressa a proteína de superfície ActA que promove a polimerização de actina da célula hospedeira, formando uma cauda de actina que lhe confere motilidade intracelular e disseminação intercelular (191). Após esse processo intercelular, *L. monocytogenes* é capaz de romper o vacúolo de membrana dupla, principalmente pela ação da LLO e fosfolipase C fosfatidilcolina-específica (PC-PLC) (27). A bactéria coloniza inicialmente o trato digestivo e é capaz de atravessar as barreiras intestinal, fetoplacentária e hematoencefálica (65, 192). Alguns órgãos alvo primários, como o fígado e o baço parecem ser reservatórios da bactéria em casos de resistência ao controle pelo sistema imune (Figura 1.12) (27).

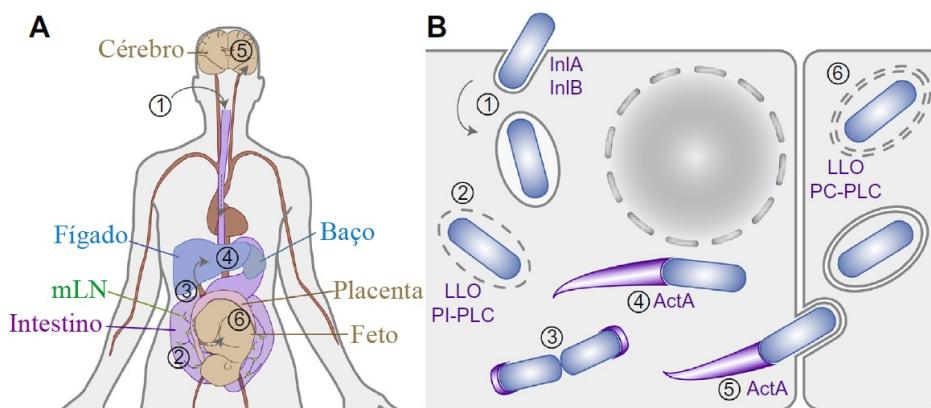


Figura 1.12. Infecção por *L. monocytogenes*.

A) Processo *in vivo*. Após a ingestão de alimentos contaminados (1), *L. monocytogenes* coloniza o trato digestivo. A bactéria pode atravessar a barreira intestinal (2) e, após alcançar os linfonodos mesentéricos (3), atinge a circulação sistêmica (4). Em alguns casos, a bactéria atravessa as barreiras hematoencefálica (5) e placentária (6). B) Ciclo intracelular. *L. monocytogenes* entra nas células pela interação das InlA e B com seus receptores (1) e escapa do vacúolo endocítico pela ação de fatores secretados, como a toxina formadora de poro listeriolisina O (LLO) e fosfolipase C

fosfatidilinositol-específica (PI-PLC) (2). No citosol, a bactéria é capaz de se replicar e utilizar moléculas da célula hospedeira (3). A proteína de superfície bacteriana ActA promove a polimerização de actina da célula hospedeira, desencadeando motilidade intracelular (4) e disseminação para outras células (5). A ruptura do vacúolo de membrana dupla é principalmente mediada pela ação da LLO e fosfolipase C fosfatidilcolina-específica (PC-PLC) (6). Adaptado de (27).

A E-caderina humana e murina possuem 90% de identidade, portanto a InlA liga-se fracamente à molécula de origem murina (193). A fim de otimizar modelos murinos de infecção oral, duas estratégias foram desenvolvidas. Duas linhagens de camundongos "humanizados" geneticamente modificados, uma expressa E-caderina humana, a outra possui uma substituição de um aminoácido permitindo que a internalina murina ligue-se à InlA (63, 65). A outra estratégia refere-se a uma cepa de *L. monocytogenes* geneticamente modificada expressando InlA que reconhece E-caderina de camundongo com alta afinidade, conhecida como "murinizada" (*L. monocytogenes* -InlA^m) (194).

Além disso, estudos epidemiológicos mostram que cepas cuja InlA é truncada e secretada estão frequentemente associadas a carreadores assintomáticos ou produtos alimentares, enquanto a InlA completa está presente nas cepas de amostras clínicas, sugerindo que a integridade dessa molécula está correlacionada com a virulência bacteriana (195, 196).

1.4.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas podem variar de acordo a pessoa afetada e a região do organismo (197). Gestantes apresentam tipicamente apenas febre e outros sintomas semelhantes à gripe, como fadiga e dor muscular. No entanto, a infecção pode desencadear parto prematuro, abortos espontâneos e natimortos (180, 197). A transmissão intrauterina pode resultar em infecção neonatal disseminada, que em alguns casos, está associada a lesões cutâneas difusas (198). Entretanto, a listeriose cutânea fora do período neonatal é em geral autolimitante e representada por raros casos de infecção primária de origem ocupacional, principalmente envolvendo veterinários e fazendeiros que são expostos ao solo, vegetação ou produtos da concepção. Estima-se que o líquido amniótico bovino contenha altas concentrações de bactérias (10^8 CFU/mL) (198, 199). Em pacientes

com deficiência da resposta imune celular, a listeriose pode promover uma sintomatologia mais grave e invasiva, como sepse, meningite ou encefalite, e raramente lesões cutâneas após disseminação sanguínea. Pacientes com listeriose invasiva podem apresentar cefaleia, torcicolo, confusão mental, perda de equilíbrio e convulsões, além de febre e dores musculares. Menos frequente, após disseminação pelo sangue, focos infecciosos podem ser detectados nas articulações, fígado, baço, pericárdio e outras regiões do corpo (198). Em pessoas saudáveis, em geral causa gastroenterite febril leve e autolimitante, mas é raramente diagnosticada (180, 197, 198).

Após curto período de incubação, *L. monocytogenes* pode se disseminar sistemicamente e atravessar a barreira hematoencefálica ou a placenta. Sintomas gastrointestinais surgem em 24h após a ingestão e bacteremia pode ser observada dentro de 2 dias (35), enquanto em média 9 dias são necessários nos casos de sintomas do sistema nervoso central, períodos mais longos (17-67 dias) nos casos associados à gestação (179).

A listeriose é geralmente diagnosticada por cultura bacteriana a partir de tecidos ou fluidos corporais, como sangue, líquido cefalorraquidiano ou placenta. O tratamento é realizado com antibióticos e pode variar de acordo com a população alvo a qual pertence o indivíduo e os sintomas apresentados (197).

1.4.4 Resposta imune

1.4.4.1 Humanos

Há poucos dados na literatura referentes à participação do sistema imune na listeriose humana. Amostras de soro humano de casos de listeriose bacteriologicamente testados apresentam predominantemente IgM específica, no entanto, reações cruzadas com *Staphylococcus* podem ser observadas tanto em IgM quanto em IgG (200). Em recém nascidos infectados durante o período perinatal, não se observa resposta específica de anticorpos ou mediada por células relevantes, sugerindo que o sistema imune ainda é muito imaturo para responder à bactéria e, portanto, aumenta a susceptibilidade à infecção (201). LLO, um importante fator de virulência de *L. monocytogenes*, é reconhecido por células T com TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$, uma vez que células mononucleares de sangue periférico

cultivadas *in vitro* com a bactéria viva e posteriormente estimuladas por IL-2, respondem a LLO purificada (202). Além disso, linfócitos T γδ parecem estar envolvidos na resposta imune contra patógenos humanos intracelulares, uma vez que, um estudo com crianças demonstrou que o número dessas células encontra-se aumentada no sangue periférico (173).

1.4.4.2 Modelo experimental

O modelo murino de *L. monocytogenes* começou a ser usado como importante ferramenta de estudo da imunidade inata e adaptativa no início dos anos 1960, contribuindo para inúmeros conceitos fundamentais do sistema imune (187).

O primeiro modelo murino desenvolvido utilizava a inoculação intravenosa (IV) e foi por muito tempo o mais prevalente para estudos em resposta imune durante a infecção por *L. monocytogenes* (203). Neste modelo, após 10 min de inoculação, as bactérias são capturadas por células de origem mieloide no fígado (90%) e baço (5-10%) (187, 204). Após 6h, a carga bacteriana diminui, indicando rápida destruição. As bactérias que sobrevivem multiplicam-se no interior de macrófagos permissivos e crescem exponencialmente no fígado e baço nas 48h seguinte, atingindo o pico com 2-3 de infecção. Em camundongos imunocompetentes, a eliminação ocorre após 7-10 dias de infecção e está correlacionada ao desenvolvimento da resposta de linfócitos T citotóxicos e efetores T_H1. Além disso, uma resposta imune celular protetora de longo prazo também é importante para a eliminação (187, 205).

Neutrófilos, macrófagos, células "natural killer" (NK) e DC desempenham papel crucial no controle inicial da bactéria. Neutrófilos fagocitam e possuem atividades antimicrobianas com produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, além de secretarem mediadores inflamatórios (187). Macrófagos residentes, em particular as células de Kupffer no fígado, infectados, secretam TNF-α e IL-12 e desencadeiam a ativação de células NK, que por sua vez são a principal fonte de IFN-γ nos primeiros dias de infecção (206). Ao contrário dos macrófagos, as DCs são capazes de ativar células CD8⁺ virgens, essenciais para formação de células de memória (207, 208). Após infecção IV, mastócitos degranulam rapidamente, secretando mediadores inflamatórios como TNF-α que recruta neutrófilos para o sítio de infecção (209). Vale ressaltar que diferentes

produtos da *L. monocytogenes* podem ser reconhecidos por receptores do tipo Toll (TLRs), como flagelina, peptideglinas, ácidos lipoteicos ou DNA (187, 210).

A resposta adaptativa de células T contra essa bactéria é predominantemente medida por CTL e células T_H1 (211, 212). No entanto, também já foi relatado o envolvimento de outros tipos celulares, como células T_H17, células T foliculares auxiliares (T_{FH}, “Follicular helper T cells”) e células T reguladoras (T_{REG}), apesar das respectivas funções não estarem bem esclarecidas (187). Células T_H17 e γδ secretam IL-17 e portanto possuem papel importante no recrutamento de neutrófilos (187, 213). Com relação à resposta de células B, alguns trabalhos sugerem sua contribuição para a resposta de células T através de mecanismos independentes da produção de imunoglobulinas e apresentação de antígeno (214, 215). Anticorpos contra LLO, conhecidamente uma das proteínas da *L. monocytogenes* mais imunogênicas, apesar de não atuarem na opsonização, podem neutralizar LLO dentro de macrófagos (216, 217).

1.4.5 Modelo experimental de infecção oral

Diferente do modelo de *T. cruzi*, há mais dados na literatura abordando o modelo experimental de infecção oral por *L. monocytogenes*. No entanto, similarmente, os trabalhos acerca de ambos os modelos são mais direcionados para a entrada do patógeno pelo trato gastrointestinal inferior, ou seja, não consideram a cavidade oral.

Como introduzido anteriormente, há diferentes formas de abordar a infecção oral em animais de laboratório (218). Um dos primeiros modelos de infecção oral utilizou administração de água contendo *L. monocytogenes ad libitum* por 24h, entretanto a imprecisão do inóculo é uma limitação importante desta metodologia (219). A inoculação intragástrica (IG) por gavagem, apesar de permitir controle da quantidade de bactérias, pode variar entre diferentes manipuladores, causando pequenas injúrias e não mimetiza de fato a infecção natural. Outra solução, é administrar a bactéria diretamente na cavidade oral (218).

Após infecção IG, *L. monocytogenes* selvagem ou murinizada é detectada no estômago, nos intestinos delgado e grosso mLNs, baço e fígado entre 24-72h (18, 220). Vale ressaltar que além da maior susceptibilidade de camundongos BALB/c

em relação a C57BL/6, fêmeas são mais susceptíveis que os machos na infecção por ingestão de pão contaminado (220). Após infecção oral, 10% da carga bacteriana nos mLN_s encontra-se intracelular e aproximadamente 90% extracelular (221).

Em camundogos infectados via IG, células T CD4⁺ LLO-específicas são detectadas, não apenas em tecidos linfoides, mas também no fígado e intestinos. Vale ressaltar que elevados níveis de expressão intracelular de IFN-γ e TNF-α podem ser detectadas no baço, fígado, mLN_s, PP e lâmina própria. Além disso, o acúmulo de T CD4⁺ Lm-específicas depende principalmente do sítio de replicação bacteriana, baço e fígado para IV, e fígado e mucosa intestinal para IG (222). No que diz respeito às células T CD8⁺ LLO-específicas, estas são detectadas preferencialmente nos intestinos delgado e grosso, e em menor proporção nos mLN_s, PPs e no compartimento intraepitelial (223).

Mais recentemente, trabalhos abordando a infecção oral por ingestão de pão contendo *L. monocytogenes* vem sendo publicados (218, 220). Nesse modelo, foi demonstrada uma rápida formação de células efetoras precursoras de memória (MPECs, “Memory precursor effector cells”), T CD8⁺ CD127⁺KLRG1⁻. Vale ressaltar que essas células inicialmente infiltrantes aumentavam preferencialmente a expressão de CD103 e CD69, indicando um perfil de células residentes de memória (T_{RM}). Em contraste, células T CD8⁺ KLRG1⁺CD127⁻, entram em apoptose no epitélio intestinal, consistente com o fenótipo de células efetoras de vida curta (SLECs, “Short-lived effector cells”) (201). Além disso, a infecção oral é capaz de induzir rápida expansão de células T γδ de memória desencadeando o desenvolvimento de células T multifuncionais produtoras tanto de IFN-γ como de IL-17 no epitélio intestinal (224).

Vale ressaltar que pouco se sabe acerca do sistema imune da mucosa oral e linfonodos drenantes, que representa muito mais que apenas a simples porta de entrada para o trato gastrointestinal (27).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos sobre infecção oral na literatura abordam a inoculação de patógenos pelas IG e/ou IO, no entanto a entrada pela boca é a que mais se assemelha com a transmissão na natureza. Atualmente, a transmissão oral do *T. cruzi* consiste em 70-80% dos casos relatados no Brasil e representa um problema de saúde pública. Dados prévios do grupo demonstraram as infecções IG e IO apresentam desenvolvimento da infecção e perfil de citocinas distintos. Além disso, a infecção por *L. monocytogenes* é amplamente estudada em modelos experimentais pela via intravenosa que também não se assemelha à transmissão natural pela ingestão de alimentos. Nos modelos de infecção oral, foi bem descrita a entrada da bactéria pelo intestino e não considerada a cavidade oral como potencial porta de entrada. Há poucos dados na literatura abordando essa via de transmissão em diferentes modelos de infecção. Portanto, utilizamos a infecção por inoculação IG e IO pelo *T. cruzi* para melhor compreender as diferenças na resposta imune sistêmica e na cinética de infecção após essas duas vias de inoculação. Considerando a importância da passagem do patógeno pela cavidade oral, também investigamos o papel dos linfonodos mandibulares drenantes após infecção oral por *L. monocytogenes*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a infecção oral pelo *T. cruzi* e *L. monocytogenes*, avaliando o desenvolvimento da patologia, disseminação inicial dos patógenos e a resposta imune do hospedeiro.

3.2 Objetivos específicos

- I. Analisar o efeito do pH gástrico na parasitemia após infecção pelo *T. cruzi*;
- II. Avaliar o dano hepático após infecção oral pelo *T. cruzi*;
- III. Estudar a composição no infiltrado inflamatório, morte celular e presença de fibras de colágeno no coração e fígado, órgãos alvo na infecção pelo *T. cruzi*;
- IV. Analisar o perfil de citocinas no coração após infecção oral pelo *T. cruzi*;
- V. Analisar as fontes teciduais de TNF- α após infecção oral pelo *T. cruzi*;
- VI. Estudar a relação do TNF- α com a morte dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* pela via oral;
- VII. Determinar a disseminação inicial de *L. monocytogenes* para diferentes órgãos linfoides secundários, como linfonodos mandibulares e mesentéricos, e baço após a infecção oral;
- VIII. Avaliar a resposta antígeno-específica de linfócitos T CD8 $^{+}$ em órgãos linfoides secundários após infecção oral por *L. monocytogenes*;
- IX. Estabelecer a cirurgia para exposição dos linfonodos mandibulares e visualização intravital da migração de células T CD8 $^{+}$ antígeno-específicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e infecção

T. cruzi

Para os diferentes grupos de infecção e seus respectivos controles, foram utilizados camundongos 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 foi realizado sob licença pela Comissão de Ética de Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA) (LW-23/12).

Em todos os protocolos experimentais, foi utilizada a cepa Tulahuén do *T. cruzi*. Para obtenção das formas tripomastigotas, foram estabelecidas culturas de células Vero, com partida de 2×10^4 células/mL. Após 24 h, estas culturas foram infectadas com 20 parasitos/célula (8 h). Após 5 dias em co-cultivo com células Vero, os parasitos liberados foram recolhidos, lavados por centrifugação e contados em câmara de Neubauer.

Os animais foram infectados pelas vias IG ou pela via IO com 5×10^4 formas tripomastigotas de cultura - volume final 100 µL: suspensão de parasitos em RPMI (Sigma-Aldrich, EUA) com 10% de SFB (Cutilab, Brasil). Nos protocolos de infecção, os animais foram mantidos sem água e comida por cerca 4 h antes do inóculo do parasito e cerca de 15 min depois do inóculo. A infecção intragástrica foi realizada por gavagem, com uma agulha especial confeccionada em aço inox (ponta de esfera – para evitar lesões na mucosa oral/esofágica dos camundongos). Na infecção oral foram utilizados micropipetadores com ponteiras de plástico e os parasitos foram inoculados na cavidade oral.

Para neutralização do pH ácido do estômago, os camundongos foram tratados com administração de 19,4 mg/Kg de hidróxido de magnésio (Philips, Brasil) concomitantemente com a inoculação dos tripomastigotas.

L. monocytogenes

Camundongos com células T CD8 GFP⁺ e DsRed⁺ OT-I TCR transgênicos, que reconhecem o peptídeo OVA₂₅₇₋₂₆₄ no contexto H2-Kb, camundongos cuja vasculatura linfática expressa GFP (Prox1-GFP) foram criados

no Departamento de Pesquisa Clínica, University of Bern. C57BL/6 e BALB/c (Janvier) foram mantidos no Theodor Kocher Institute, University of Bern.

Alíquotas estoque congeladas de *L. monocytogenes*-OVA (183) em meio BHI (infusão de cérebro e coração, do inglês “Brain Heart Infusion”) (BD, EUA) e 17% de glicerol contendo 200 µg/mL de estreptomicina foram descongeladas em banho maria à 37°C e expandidas em BHI até à 37°C, com agitação (250 rpm) por 3-3,5h até alcançar a fase log. A densidade bacteriana foi determinada pela absorção a 600 nm (BHI como branco) e deveria estar preferencialmente entre 0,3-0,6 para a fase desejada. Uma OD₆₀₀ de 0,1 é equivalente a 1x10⁸ CFU/mL. As bactérias foram centrifugadas e ressuspensas em PBS estéril com inóculo apropriado. A suspensão bacteriana diluída foi semeada em placas de ágar BHI para verificação do real número de unidades formadoras de colônia (CFU).

Fêmeas C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram mantidas sem água e comida por 4h antes e pelo menos 15-30 min após a infecção. Os camundongos foram infectados via oral com 1,2-7,7x10⁹ CFU como descrito (174) ou intravenosa (IV) no plexo retro-orbital com 5x10³ CFU, ambos em volume final de 50 µL. Fêmeas BALB/c (10-12 semanas de idade) foram oralmente infectadas com 2,3x10⁸ CFU. Os inóculos foram confirmados por plaqueamento em placas de ágar BHI. A inoculação IV foi realizada como controle positivo da infecção.

Os experimentos foram realizados sob aprovação do Comitê Cantonal de Experimentação Animal (Bern) (BE72/15 para coleta de órgãos, BE94/14 para microscopia intravital e BE75/14 para infecção por *L. monocytogenes*).

4.2 Parasitemia e sobrevivência

A parasitemia foi avaliada utilizando 5 µL de sangue isolados da porção distal da cauda de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, sendo em seguida, quantificadas as formas tripomastigotas presentes em 50 campos entre lâmina e lamínula (18x18mm) utilizando o microscópio óptico de campo claro (aumento 400x).

O número de parasitos/mL de sangue foi calculado através do método de Brener (225).

$$Fator (f) = \left(\frac{A_{lamínula}}{A_{campo}} \right) \cdot 200$$

Sendo $A_{lamínula}$ = área da lamínula e A_{campo} = área do campo

$$Parasitos/mL = \left(\frac{n}{50} \right) \cdot f$$

Sendo n o número de parasitos contados em 50 campos em aumento de 400x.

A sobrevivência dos camundongos infectados foi determinada através da observação diária dos animais durante o período de infecção.

4.3 Análise histológica

Durante a necropsia, órgãos alvo na infecção pelo *T. cruzi*, como coração e fígado, foram retirados, clivados longitudinalmente (coração) ou em pequenos fragmentos (fígado) e colocados no cassete plástico apropriado para inclusão em parafina. Em seguida, os mesmos foram submersos em uma solução fixadora (formalina 5%) por 12-24h.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas para inclusão em parafina. O procedimento foi realizado utilizando o processador de tecidos (Lupe PT-5, Brasil). Durante o processamento no aparelho, as amostras passaram por álcool 70%, 80%, 95%, 100%, 30 min em cada concentração. Em seguida, a clarificação foi realizada com duas soluções de xilol (I e II), por 30 min em cada passo para a completa retirada do álcool e da gordura do material. A impregnação com parafina (Sigma-Aldrich, EUA) foi realizada em duas incubações a 58- 60°C por 1 h e a inclusão em parafina foi realizada utilizando suportes metálicos previamente aquecidos.

Os fragmentos parafinados foram cortados em micrótomo Spencer 820 (American Optical, EUA) na espessura de 5 µm e fixados a lâminas histológicas. Antes da coloração, os cortes foram desparafinizados (xilol I, 5 min; xilol II, 5 min e xilol III, 10 min) e hidratados (álcool 100%, álcool 100%, álcool 95%, álcool 70% e água destilada, 3 min em cada etapa). Após a coloração por hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, EUA) durante 1 min, as lâminas foram deixadas em água corrente por 20-30 min. Posteriormente, foi realizado um banho em álcool 70% por 2 min e a coloração por eosina (Sigma-Aldrich, EUA) foi realizada em 15 s e em seguida, os

cortes foram desidratados (álcool 95%, álcool 100%, álcool 100% e álcool 100% por 3 min em cada etapa). A clarificação foi realizada por 3 passagens em xanol (xanol I, 3 min; xanol II, 5 min e xanol III, 5 min). A montagem das lâminas foi realizada com lamínula e meio de montagem, Entellan (Merck, Alemanha).

No tecido hepático, o percentual de área com infiltrado inflamatório foi calculado através da análise de 25 campos por camundongo (duas secções diferentes de cada animal). A análise qualitativa foi realizada utilizando os seguintes critérios:

- , ausência de infiltrado (sem alterações);
- + , áreas de lesões leves (pequenos infiltrados inflamatórios focais principalmente ao redor dos vasos, parênquima não afetado);
- ++ , áreas de infiltrado moderado (infiltrados de tamanho intermediário, ao redor dos vasos, pouco difuso, formação de aglomerado de células inflamatórias no parênquima e formação de trombos em alguns vasos);
- +++ , áreas de infiltrado intenso (áreas aglomerados de células inflamatórias, difusos pelo parênquima e maior número de vasos com formação de trombos);
- ++++ , muito intenso (extensas áreas de aglomerados de infiltrados inflamatórios e infiltrados difusos ocupando o parênquima).

Para avaliação da presença de fibras de colágeno, foi utilizada a coloração de Picro Sirius. Secções em parafina de 5 µm foram desparafinizadas em xanol e hidratadas e soluções alcoólicas de concentrações crescentes. A solução de Picro Sirius (vermelho de Sirius 0,1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico pH=2) foi adicionada às secções por 1 hora. Após lavagem de 2 min em ácido clorídrico 0,01 N, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris por aproximadamente 6 min. Em seguidas as secções foram desidratadas em álcool, clareadas em xanol e a montagem das lâminas foi realizada em Entellan (Merck, Alemanha).

4.4 Expressão gênica de citocinas no coração

Para a RT-PCR quantitativa em tempo real, o RNA total de metade do coração

(secção longitudinal; peso médio: 87,9 mg) de camundongos infectados pelo *T. cruzi* foi extraído utilizando protocolo associado ao TRIzol (Invitrogen, EUA) o kit RNeasy Mini (Qiagen, Alemanha) a partir da fase aquosa de fenol-clorofórmio de acordo com as instruções do fabricante (226). As reações de transcriptase reversa foram realizadas com 3,5 µg de RNA e o kit Super Script II (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A RT-PCR em tempo real foi realizada no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA) utilizando Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA), e os iniciadores para as citocinas, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-10 e IL-17, obtidos da IDT (Integrated DNA Technologies, EUA) (Anexo I). Os genes HPRT (Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase) e β -actina foram utilizados como controles constitutivos endógenos (Anexo I). As reações realizadas em duplicatas a partir de 2 µL de cDNA (1:10) por reação, em volume final de 20 µL. Após a amplificação, foram realizadas curvas de dissociação, revelando apenas um pico para cada fragmento de amplificação. As quantificações relativas dos níveis dos genes alvo foram realizadas utilizando o método $\Delta\Delta Ct$ (227). Os dados foram normalizados em relação aos genes constitutivos, e foram determinadas as razões comparando as amostras controles não infectadas utilizando o “software” Expression Suite (Life Technologies, EUA). As análises estatísticas foram realizadas a partir dos valores de ΔCt .

4.5 Análise do coração e fígado por imunofluorescência

Coração e fígado obtidos de animais infectados pelo *T. cruzi* e controles não infectados foram incluídos em “tissue tek” (OCT, Sakura, EUA). As amostras de coração foram seccionadas longitudinalmente em duas partes, e o fígado, em diversos fragmentos. Para avaliar as células produtoras de TNF- α , foram realizadas marcações duplas de imunofluorescência. Criocortes de 3 µm foram fixados em acetona por 5 min a 4°C. Após duas lavagens em PBS gelado, foi aplicada a solução de bloqueio contendo soro de cabra 10% e BSA (albumina de soro bovino, do inglês “Bovine Serum Albumine”) (Sigma-Aldrich, EUA) 1% por 1 h à temperatura ambiente. As amostras foram incubadas “overnight” à 4°C com os anticorpos primários (de rato contra CD4, CD8, F4/80 e Ly6G, e de coelho contra TNF- α), lavadas 3 vezes e os anticorpos secundários (de cabra contra Ig de rato acoplados à Alexa-488; e anticorpo de cabra contra Ig de coelho acoplado à Alexa 546) foram adicionados por

45 min à temperatura ambiente. As características dos anticorpos utilizados estão listadas no Anexo II. Após 3 lavagens em PBS, as lâminas foram montadas utilizando o meio de montagem "ProLong Gold Antifade" com o corante fluorescente para núcleos, DAPI (Molecular Probes, EUA).

Para avaliação de apoptose, foi utilizado o "ApopTag *In Situ* Detection kit" (Merk Millipore, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A montagem da lâmina foi realizada utilizando o meio de montagem ProLong Gold Antifade com DAPI (Molecular Probes, EUA).

Todas as imagens foram visualizadas utilizando o microscópio Axio Imager A.2 (Zeiss, Alemanha) e digitalizadas através da câmera AxioCam HRm r3.0 e do "software" AxioVision 4.8.

As populações celulares (CD4⁺, CD8⁺, F4/80⁺ e Ly6G⁺) presentes no infiltrado inflamatório foram contadas em 10 e 14 campos para o coração e fígado respectivamente, e as células TNF⁺ quantificadas. Duas secções do coração e duas de fragmentos de diferentes lobos do fígado de cada camundongo foram analisadas. O percentual de CD4, CD8, macrófagos e neutrófilos foi calculado em relação a soma de todas as populações dos diferentes cortes.

4.6 Quantificação de ALT e AST séricos

As amostras de sangue foram coletadas de camundongos infectados pelo *T. cruzi* e, após coagulação, o soro foi isolado. A atividade sérica de ALT (alanina transaminase) e AST (aspartato transaminase) foi quantificada utilizando o equipamento Reflotron (Roche, Alemanha) de acordo com as orientações do fabricante.

4.7 Tratamento *in vivo* com proteína quimérica contra TNF- α

Camundongos BALB/c oralmente infectados pelo *T. cruzi* foram tratados por via intraperitoneal com 0,83 mg/Kg da proteína quimérica contra TNF- α , etanercepte (Enbrel, Wyeth Pharmaceuticals, EUA). Para determinação do dia, realizamos um teste iniciando o tratamento com 0, 7 e 14 dpi com doses subsequentes semanais. A

partir deste teste, definimos o início do tratamento com 14 dpi. A parasitemia e a mortalidade foram analisadas ao longo da infecção.

4.8 Determinação da carga bacteriana tecidual

Os linfonodos mandibulares (2 mandibulares e 2 mandibulares acessórios) e mesentéricos (4), e o baço foram removidos assepticamente de camundongos infectados por *L. monocytogenes* e colocados em tubos MagNALyser com PBS estéril e mantidos em gelo durante todos os procedimentos até o plaqueamento. Os órgãos foram homogeneizados em tubos MagNALyser Green Beads (Roche, França) à 5000 rpm por 1 min. As diluições seriadas dos homogenados foram plaqueadas em placas de ágar BHI, e as colônias contadas após 24h de incubação à 37°C.

4.9 Purificação de linfócitos T e transferência adotiva

Os linfonodos e o baço foram homogeneizados e após dissociação dos tecidos, as amostras foram lavadas e ressuspensas em meio composto por PBS e 5 mM EDTA. Os linfócitos de camundongos OT-I-GFP⁺ ou DsRed⁺ foram utilizadas para purificação de linfócitos T CD8⁺ e de C57BL/6 para linfócitos T com os kits de isolamento de células: "EasySep Mouse CD8⁺ T cell" ou "Mouse T cell isolation kit" seguinte orientações do fabricante (Stem Cell Technologies, Canadá). As células foram negativamente selecionadas em um suporte magnético e a pureza foi na faixa de 71-98%.

Para experimentos de microscopia de dois fôtons, foram injetados linfócitos purificados GFP⁺ ou marcados com CMTMR (2-5x10⁶/camundongo) e para citometria de fluxo, T CD8⁺ DsRed⁺ (marcadas com CFSE) ou GFP⁺ (1x10⁶/camundongo) foram injetados IV em camundongos C57BL/6 pareados por sexo.

4.10 Marcação de células com CFSE e CMTMR

Para marcação com o corante de rastreamento de células CMTMR (Molecular Probes, EUA) ou de ciclo celular, CFSE (Molecular Probes, EUA), 2x10⁷

células foram incubadas à 37°C no escuro em tubos de fundo arredondado contendo 1mL de meio RPMI (Gibco, EUA) completo com SFB (HyClone, EUA) com 5µM de CMTMR por 20min ou 5µM de CFSE por 15min, respectivamente. Foi adicionado mais 1mL de meio e seguida as células foram centrifugadas. Após resuspensão em meio RPMI completo com SFB foram deixadas mais 15-30 min à 37°C lavagem, 15-30 min. Após lavagem, foram ressupensas em volume final de 50µL por camundongo em meio RPMI completo com SFB para injeção IV.

4.11 Tratamento *in vivo* com MEL-14 e FTY720

Os camundongos foram tratados com 150 µg/camundongo do anticorpo monoclonal contra CD62L, clone MEL-14 (Nanotools, Alemanha) e com fingolimoide agonista de alta afinidade do receptor 1 de esfingosina 1 fosfato (S1P1), 1 µg/kg de FTY720 (Calbiochem, Alemanha) por administração intraperitoneal após 1 dia de infecção por *L. monocytogenes* e novamente com FTY720 no dia 3.

4.12 Citometria de fluxo

Onde indicado, células CD8⁺ OT-I-DsRed⁺ (marcadas com CFSE) or OT-I-GFP⁺ isoladas foram transferidas 1 dia antes da infecção por *L. monocytogenes*. Os mesmo órgãos utilizados na análise do CFU foram coletados após 1, 2, 5 e 12 dias de infecção. A lise de hemácias no baço foi realizada utilizando tampão de lise de cloreto de amônio (ACK). Após contagem de células utilizando lâminas Fast-Read 102 slides® (Biosigma, Itália), 1-3x10⁶ células foram plaqueadas por poço. Após bloqueio de receptores Fc (2.4G2 Fc block CD16/32), as amostras foram lavadas e as marcações com as combinações de anticorpos conjugados a fluorocromos foram realizadas em tampão (PBS com 10% de SFB) por 30 min no gelo e no escuro: contra CD8 conjugado a APC-Fire750 ou APC-Cy7 (53-6.7), contra CD25 APC (PC61), contra CD44 BV605 (IM7), contra CD62L BV421 (MEL-14), contra CD69 BV711 (H1.2F3), contra CD127 APC (A7R34), contra KLGR1 PE-Cy7 (2F1/KLGR1) e contra CD44 (IM7) biotinilado (BD Bioscience, EUA), e estreptavidina BV711 (BioLegend, EUA). Quando anticorpos biotinilados foram utilizados, após lavagem, outra incubação foi realizada com estreptavidina conjugada a fluorocromo seguida de lavagem. As células foram fixadas em PFA 2% por 15 min e lavadas novamente.

A aquisição foi realizada no FACS LSR II (BD, EUA) e as análises no programa FlowJo (Tree Star, EUA).

4.13 Microscopia intravital de dois fótons (“Intravital Two Photon microscopy”, 2PM)

Para os experimentos em homeostasia, as células foram injetadas 1 dia antes da aquisição de imagens e para visualização de OT-I, 1 dia após a infecção por *L. monocytogenes*. Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (10mg/kg) e quetamina (50mg/kg). Após remoção dos pelos da região do pescoço, foi feita uma incisão na área latero-medial esquerda, expondo os linfonodos mandibulares e mandibulares acessórios cuidadosamente sem tocá-los diretamente. A região foi mantida úmida com salina. A aquisição de imagens por 2PM foi realizada utilizando o sistema TrimScope equipado com microscópio de fluorescência Olympus BX50WI, objetivas de 20x ou 25x (NA0.95) (LaVision Biotec, Alemanha) e um laser Ti:Sapphire NIR (MaiTai, Spectraphysics) com emissão em 780 ou 840 nm. Para as análises em 4 dimensões da migração celular, 16 planos z (espaçados em 4 μ m) com campo de visão de 250x250 μ m² foram obtidos. A aquisição de secções x-y foi realizada a cada 20 s por 20-30 min. As vênulas de endotélio alto (HEVs) foram identificadas por MECA-79 conjugado a Alexa-Fluor 633 ou 488 (10-15 μ g/camundongo) injetada IV antes da visualização. As sequências de planos de imagens foram transformadas em vídeos utilizando o programa Velocity, que também foi usado para rastreamento semi-automatizado da motilidade celular em 3 dimensões.

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 5, utilizando-se os testes Mann-Whitney e teste H de Kruskal-Wallis. O teste Q de Dunn foi empregado após rejeição da hipótese nula pelo Kruskal-Wallis. A curva de sobrevivência foi construída usando o método de Kaplan-Meier. A significância das curvas foi avaliada através dos testes Mantel-Cox (considera a relação das razões de risco dos dois grupos igual ao longo da cinética) e Gehan-Breslow-Wilcoxon

(atribui maior peso às perdas em momentos iniciais). Valores foram considerados significativos quando $p < \alpha = 0,05$.

Na análise da infecção pelo *T. cruzi* foram testadas duas hipóteses estatísticas (considerando hipótese nula, H_0 e alternativa, H_i):

- Comparação entre IG e IO $\rightarrow H_0$, $IG=IO$; H_i , $IG \neq IO$
- Comparação de IG ou IO em relação ao controle (ausência de infecção, representado como Ni ou 0 dpi) $\rightarrow H_0$, $IG/IO=Ni$ (0dpi); H_i , $IG/IO \neq Ni$ (0dpi)

5 RESULTADOS

5.1 A neutralização do pH gástrico não interferiu na parasitemia após infecção intragástrica ou oral pelo *T. cruzi*

A fim de avaliar se as diferenças na parasitemia, mortalidade e infectividade - percentual de animais apresentando parasitemia (Figura 1.8) poderiam estar associadas ao pH reduzido do estômago, afetando a viabilidade dos parasitos, foi realizado um tratamento com antiácido. No nosso modelo, os camundongos mantidos em jejum por 4 h apresentavam pH=3 no estômago e 5 na cavidade oral. O tratamento com antiácido, 19,4 mg/Kg de hidróxido de magnésio neutralizou imediatamente o pH do estômago ($\text{pH}3 \rightarrow \text{pH}=7$), após 15 e 30 min mantém em $\text{pH}=5$ e em 50 min retorna a um $\text{pH}=3$ (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Avaliação da eficácia do tratamento com antiácido na neutralização do pH

	Boca	Estômago	Estômago após antiácido	Estômago após antiácido + meio	Estômago após antiácido (15')	Estômago após antiácido (30')	Estômago após antiácido (50')
pH	5	3	7	7	5	5	3

Camundongos BALB/c foram submetidos a tratamento com antiácido. O pH foi mensurado antes e após administração de Mg(OH)_2 (imediatamente, 15, 30 ou 50 min). Para mensurar o pH da boca, a tira de pH foi colocada em contato com a lingual e para o estômago, o conteúdo gástrico foi coletado e depositado sobre a tira.

As diferenças de parasitemia observadas entre IG e IO não podem ser atribuídas ao pH ácido uma vez que a administração de Mg(OH)_2 no momento do inóculo ($\text{pH}=7$) em ambos os grupos não interfere na quantidade de parasitos circulantes (Figura 5.1). O tratamento com antiácido 5 min antes da infecção apresentou resultados similares.

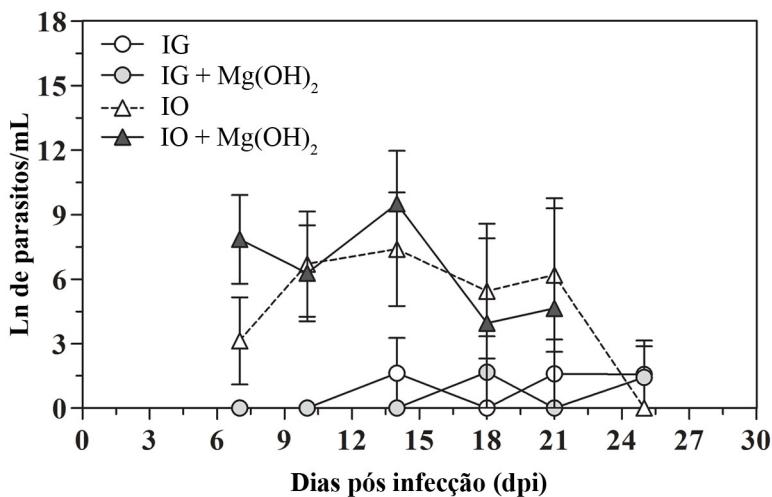


Figura 5.1. O pH gástrico não interfere na infecção oral ou intragástrica pelo *T. cruzi*.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) derivados de cultura através de inoculação por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). A inoculação IG e IO de *T. cruzi* foi realizada juntamente com antiácido (Suspensão de hidróxido de magnésio, 19,4 mg/Kg) ou apenas meio. A parasitemia foi monitorada durante a fase aguda e expressa em ln de parasitos por mililitro (valores de média e erro padrão da média) para as análises. Os parasitos foram contados em microscópio óptico de campo claro e parasitemia calculada pelo método de Brener. n: IG=7 e IO=7. Representativo de 2 experimentos.

5.2 Camundongos infectados pelo *T. cruzi* oralmente apresentaram mais lesões hepáticas que os pela via intragástrica

Drogas/antígenos administrados por via oral são comumente absorvidos no trato gastrointestinal e transportados para os sistemas linfático ou porta hepático (228). Além disso, o fígado, outro órgão alvo para o parasito, desempenha um papel importante na eliminação de parasitos circulantes na corrente sanguínea (229). Uma vez que o fígado também pode estar envolvido no desenvolvimento da fase aguda em hospedeiros infectados oralmente, foi realizada uma avaliação comparativa de secções do fígado de camundongos de ambos os grupos de infecção. A histopatologia após 3, 9, 15-17 e 25 dpi demonstrou que a infecção via IO promove hepatite mais grave que IG. Durante estágios iniciais da infecção (3-9 dpi), os infiltrados apresentaram intensidade leve e estavam localizados ao redor dos vasos de pequeno e médio calibre, mas na medida em que a infecção progrediu (15-17 dpi), o infiltrado inflamatório expandiu, afetando também o parênquima (Figura 5.2; Tabela 5.2). Ninhos de amastigotas foram raramente detectados, e, portanto, não foi

possível quantificá-los. Foram evidenciados alguns vasos de médio calibre com estase sanguínea e formação sugestiva de massas trombóticas principalmente no grupo IO (Tabela 5.2). No que diz respeito ao dano hepático, os níveis mais elevados de ALT e AST no grupo IO que no grupo IG indicaram que o fígado daqueles estava mais comprometido (17 dpi) (Figura 5.2).

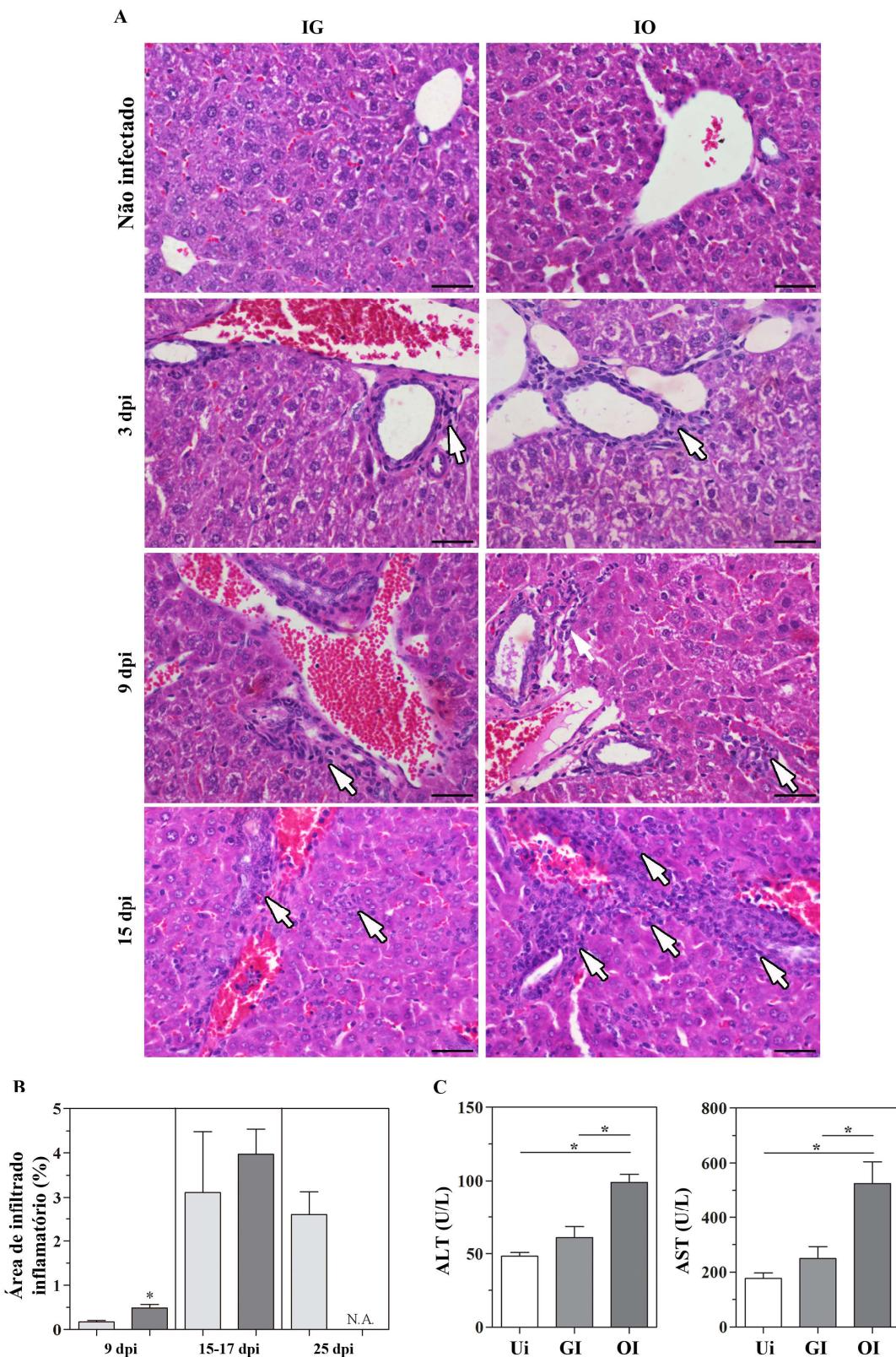


Figura 5.2. Histopatologia do fígado durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* após inoculação por gavagem ou na cavidade oral.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). **A)** Secções histopatológicas coradas por hematoxilina-eosina demonstrando as lesões no fígado e a quantificação do infiltrado. **B)**

Quantificação da área de infiltrado inflamatório. Barras cinza claro representam IG e cinza escuro IO. **C)** Atividade sérica de ALT e AST (17 dpi). **A/B**) n: IG, 9 dpi = 4, 15–17 dpi = 4, 25 dpi = 5; IO, 9 dpi = 4, 15–17 dpi = 9. Os dados foram obtidos de 4 experimentos. **C**) n: Ni=3, IG=3, IO=7. Os dados foram obtidos de 2 experimentos. **B/C**) Os valores representam média ± erro padrão da média. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney (unilateral superior), “GraphPad Prism 5”. Comparação entre os grupos IG e IO, e cada um com não infectado. *, p=0,05; **, p=0,01; ***, p=0,001. As barras representam 20 µm. As setas indicam infiltrados inflamatórios. Ni, não infectado.

Tabela 5.2. Alterações histopatológicas no fígado de camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

dpi	Inflamação perivasicular		Aglomerado de células inflamatórias		Tendência de massas trombóticas		Produção de colageno	
	IG	IO	IG	IO	IG	IO	IG	IO
3	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	-	+	-	-	-	-
15	++	++++	++	++++	++	+++	+	++
25	++	N.A.	++	N.A.	++	N.A.	++	N.A.

Camundongos BALB/c foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) derivadas de cultura através de inoculação por garavem (IG) ou na cavidade oral (IO). Os fígados foram processados para inclusão em parafina e as secções histológicas coradas por hematoxilina-eosina e Picro Sirius. A tabela representa o grau de inflamação no tecido hepático: -, sem infiltrados; +, áreas de lesões leves; ++, áreas de infiltrados moderado; +++, áreas de infiltrado grave, ++++ muito grave. O espessamento da parede dos vasos observado na coloração de hematoxilina-eosina foi corroborado pelo Picro Sirius. n=3-6 camundongos/dpi/grupo. Abreviações: dpi, dias pós-infecção. N.A., não analisado.

5.3 Presença de fibras de colágeno, morte celular e composição do infiltrado inflamatório nos grupos de infecção intragástrica e oral no coração e fígado

A coloração de Picro Sirius revelou uma leve deposição de colágeno no coração em ambos os grupos quando comparados com camundongos não

infetados e no fígado, um progressivo depósito de colágeno nas paredes dos vasos sanguíneos, principalmente no grupo IO (Figura 5.3; Tabela 5.2).

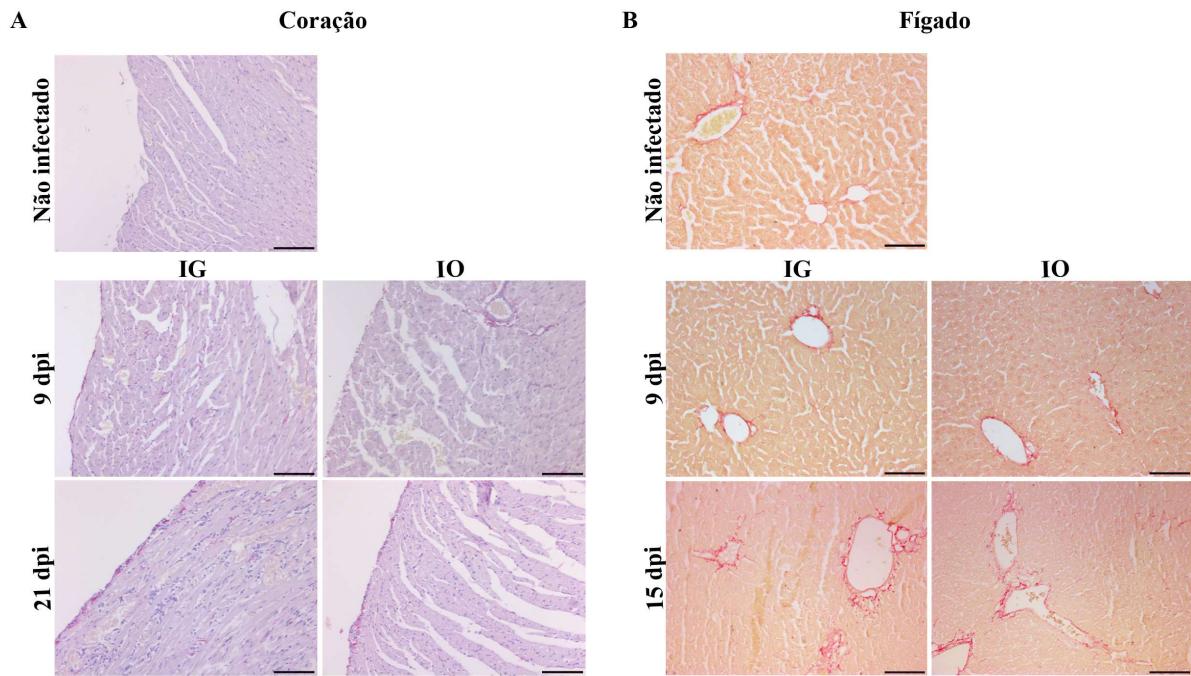
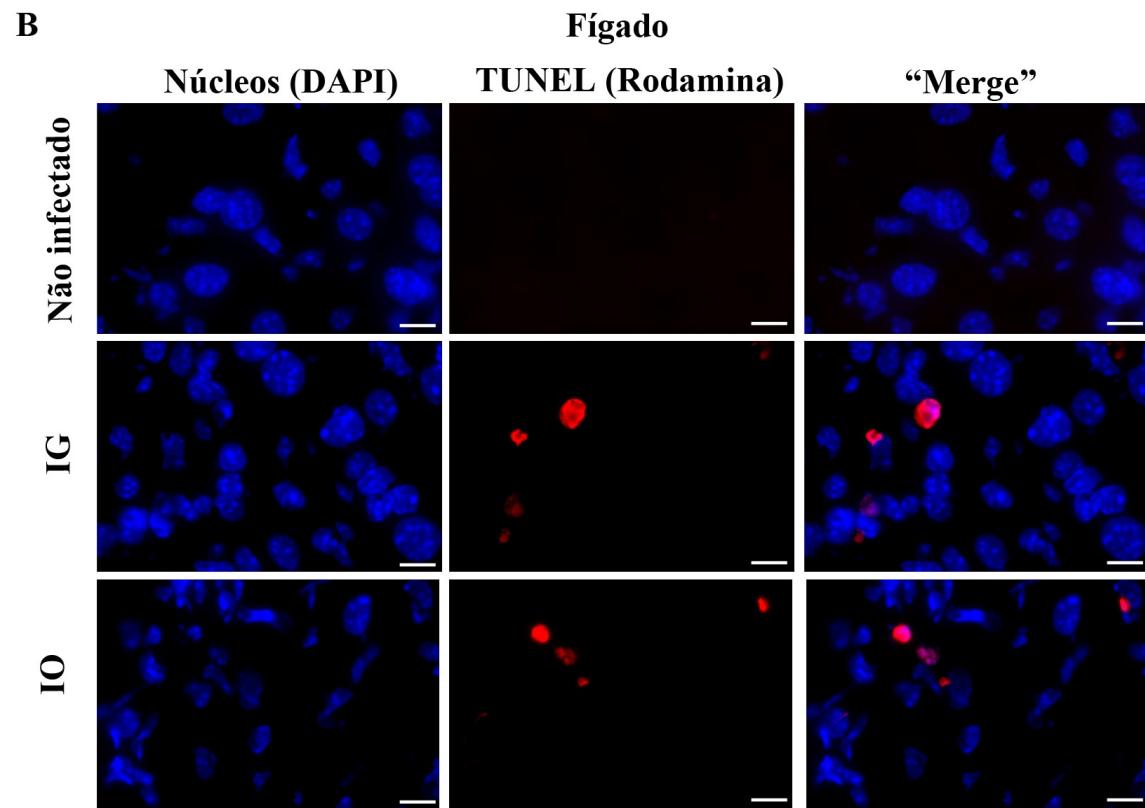
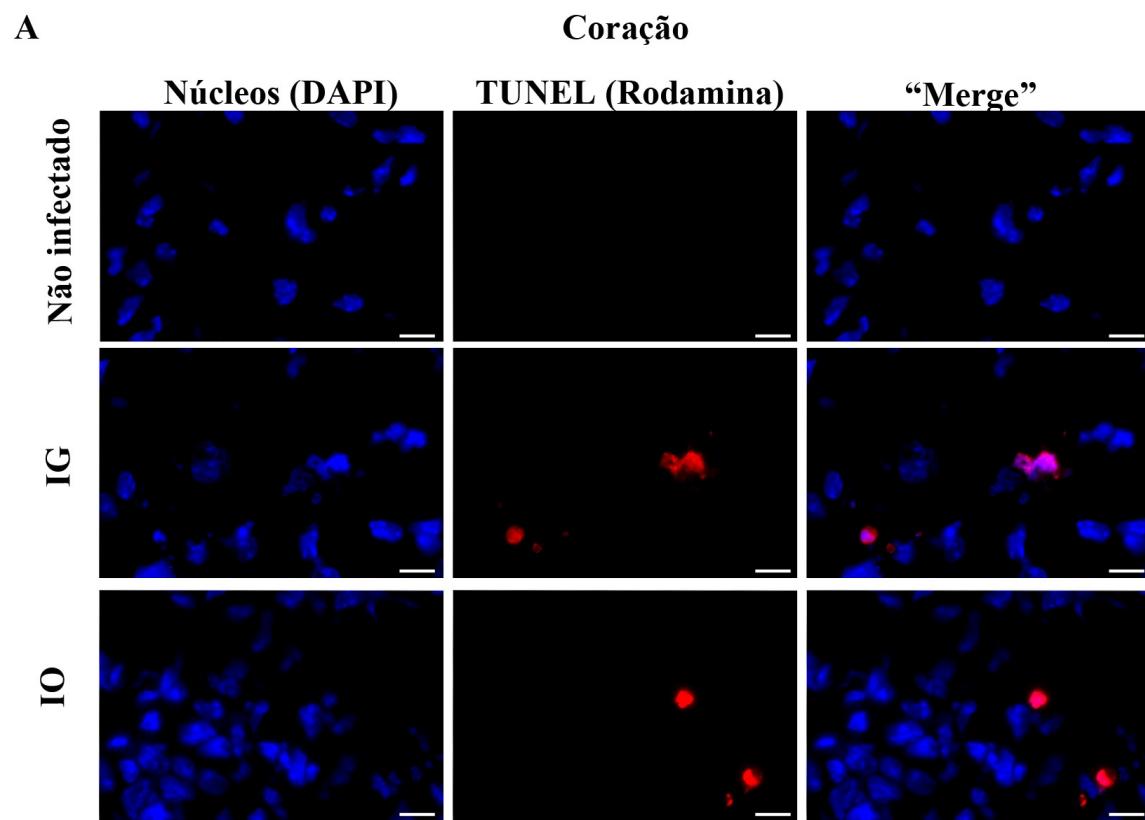


Figura 5.3. Deposição de colágeno no coração e fígado de animais infectados pelo *T. cruzi*.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) derivadas de cultura através de gavagem (IG) ou inoculação oral (IO). Secções parafinadas foram marcadas com Picro Sirius para revelar a produção de colágeno. **A**, coração, contracorado com hematoxilina e **B**, fígado. n=3-5 camundongos/grupo/dpi. As barras representam 50 μm .

Células apoptóticas (TUNEL^+) foram observadas tanto no infiltrado como do parênquima no fígado e coração (Figura 5.4).



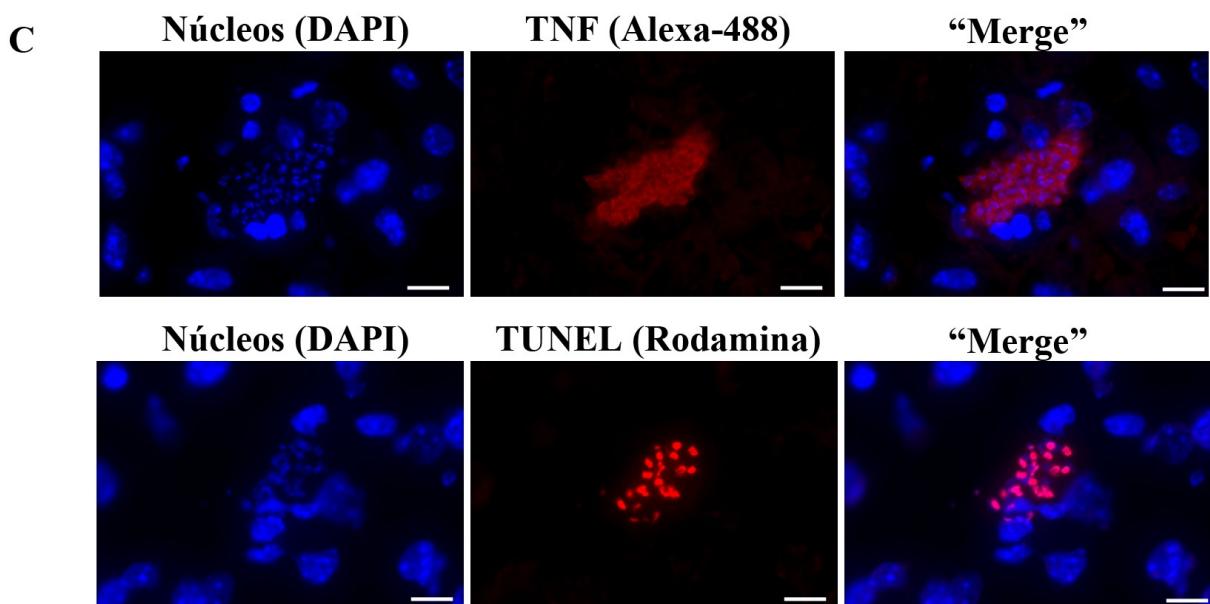


Figura 5.4. Perfil de apoptose no coração e fígado de camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) derivadas de cultura através de inoculação por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). A técnica de TUNEL foi realizada em **A**, criocorte de coração e **B**, de fígado para detecção de apoptose. **C**, a marcação de TNF (vermelha) associada a estruturas que foram também observadas na marcação de TUNEL (vermelha) no fígado de camundongos infectados. n=3 camundongos/grupo (duas secções diferentes de cada de um experimento). As barras representam 100 µm.

As análises de imunofluorescência demonstraram que ambos os grupos apresentaram perfis de células no infiltrado inflamatório cardíaco semelhantes (células CD4 e CD8, macrófagos e neutrófilos), enquanto no fígado, a análise de dois lobos diferentes mostrou que a composição do infiltrado era principalmente de macrófagos F4/80⁺. No entanto, células CD4⁺ e CD8⁺ e neutrófilos Ly6G⁺ também foram encontrados (Figura 5.5).

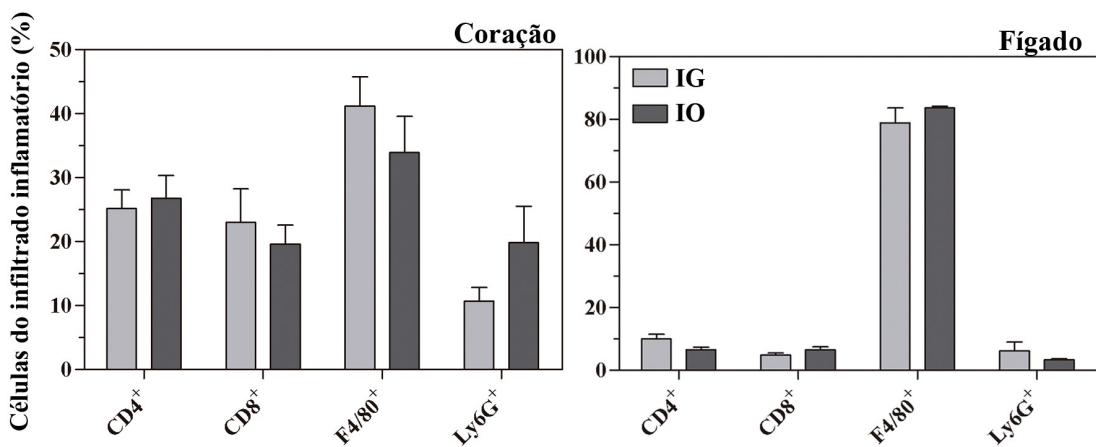


Figura 5.5. Composição celular do infiltrado inflamatório no coração e no fígado de camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). As análises de imunofluorescência indicando o percentual de cada população celular após 16 dpi, células CD4⁺, CD8⁺, F4/80⁺ e Ly6G⁺. n=3 camundongos/grupo (duas secções diferentes de cada camundongo de um experimento).

5.4 Camundongos infectados na cavidade oral apresentaram maiores níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias e IL-10 no tecido cardíaco que os pela via intragástrica

Foi realizado RT-PCR quantitativo para IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β a fim de analisar a presença de RNAm de citocinas no tecido cardíaco de animais infectados. Nossos resultados demonstram que a expressão gênica de IFN- γ , TNF- α e IL-10 foi maior no grupo IO do que no IG, enquanto TGF- β estava reduzido no IG em relação ao não infectado (Figura 5.6).

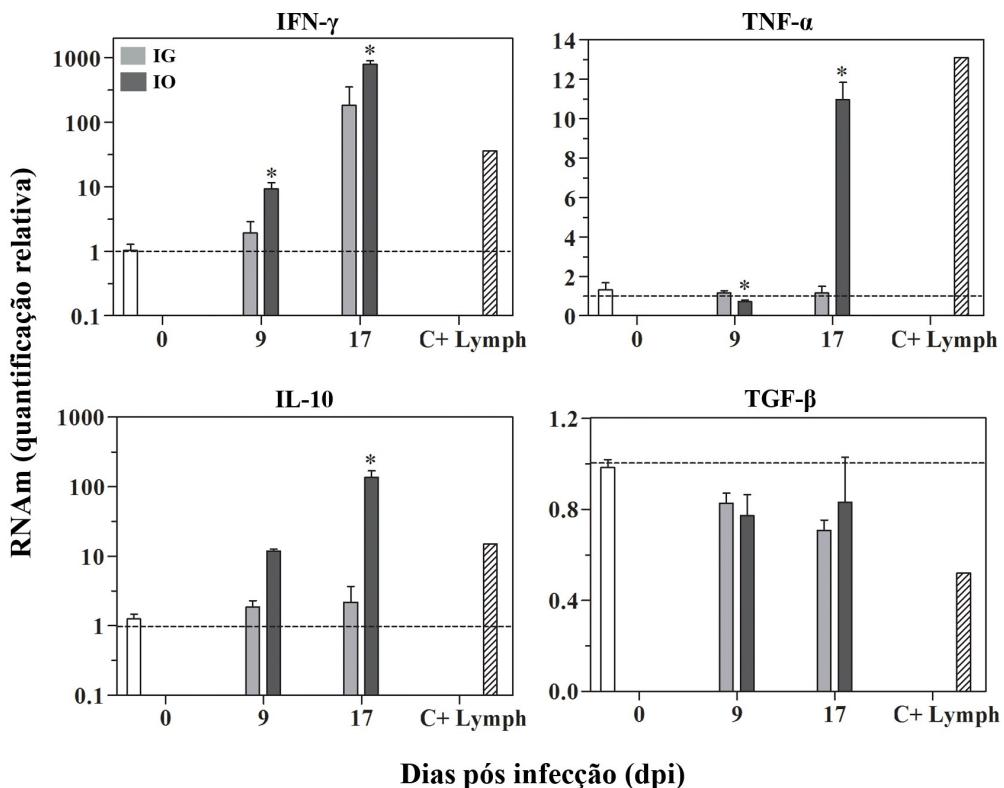


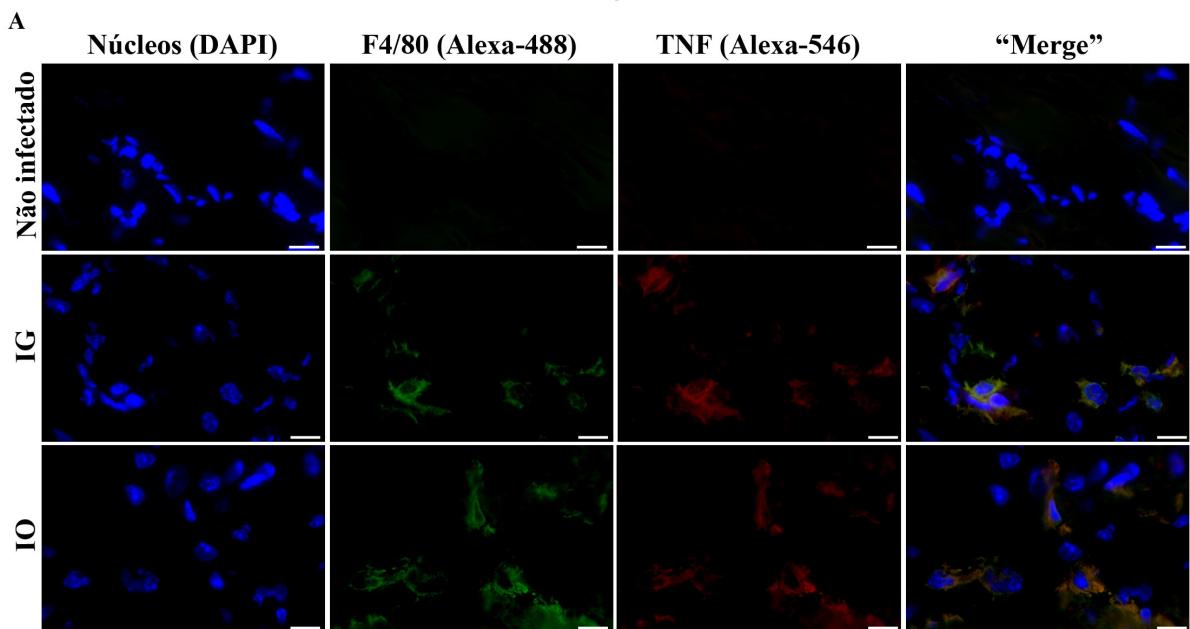
Figura 5.6. Perfil de citocinas em camundongos infectados pelo *T. cruzi* pelas vias intragátrica e oral.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). A quantificação relativa da expressão gênica de citocinas no coração foi obtida a partir de RT-qPCR. O RNA total foi extraído do tecido em diferentes dias pós-infecção (dpi), e a reação realizada utilizando o “SYBR Green Master Mix”. HPRT e β-actina foram utilizados como genes constitutivos. Os dados de RT-qPCR foram normalizados com os genes constitutivos, e o aumento da expressão (quantificação relativa) foi determinado em relação ao controle não infectado utilizando o “Expression Suite”. Como controle positivo para produção de citocinas, foram utilizados linfócitos de linfonodos subcutâneos de camundongos infectados estimulados *in vitro* com anticorpo contra CD3 (C+ Lymph). As análises estatísticas foram realizadas utilizando os valores de ΔCt . n de um experimento: não infectado (0)=5-9; 9 dpi IG=3, IO=2-3; 17 dpi IG=2-3, IO=2-3. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste Mann-Whitney (unilateral superior), “GraphPad Prism 5”. *, p=0,05; **, p=0,01; ***, p=0,001. *IG versus IO. O teste Kruskal-Wallis (teste Q de Dunn) foi utilizado para análise da cinética. IFN- γ aumentou em ambos os grupos comparados ao não infectado. TNF- α e IL-10 apresentaram aumento em IO, enquanto TGF- β estava reduzido em IG.

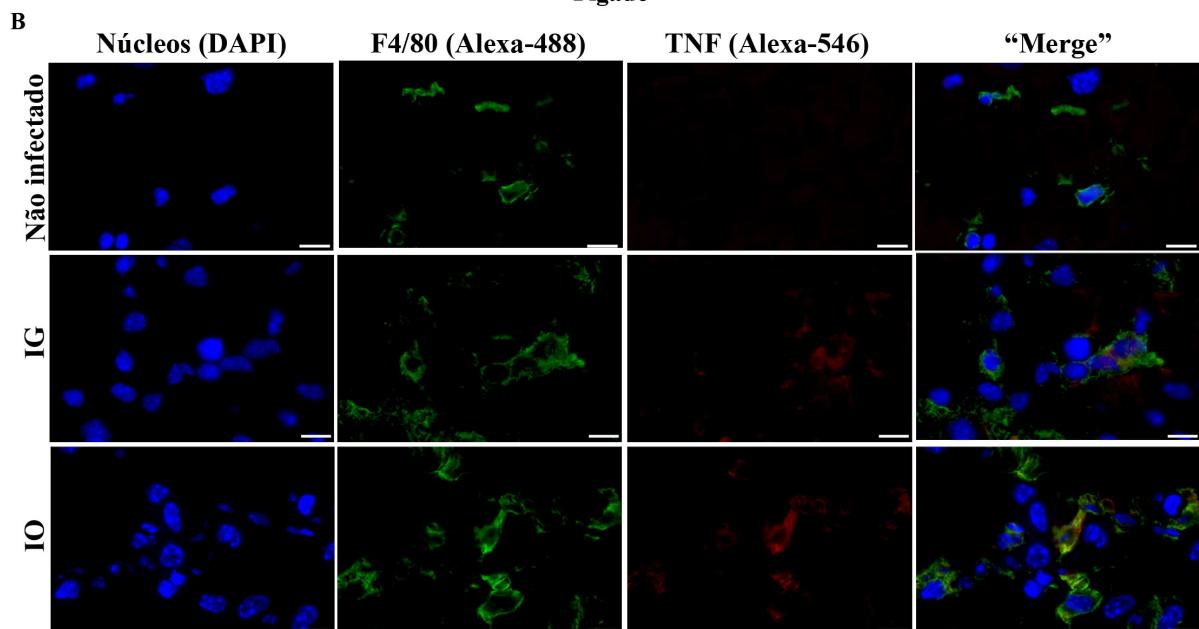
5.5 Os macrófagos são a principal fonte de TNF- α tecidual

Além da análise da composição do infiltrado inflamatório nos órgãos alvos estudados, investigamos quais seriam as células produtoras de TNF- α , citocina que se apresentou elevada tanto no soro como no coração dos animais infectados (Figura 1.9; Figura 5.6). Imunofluorescência de amostras de coração e fígado de animais com 16 dpi apresentaram a presença de TNF- α nesses tecidos. A marcação de TNF- α foi evidente em células inflamatórias, principalmente macrófagos (Figura 5.7). Nas secções de fígado, o grupo IO apresentou maior número de macrófagos do que o IG (média \pm erro padrão da média: 1200 \pm 18,68 *versus* 963 \pm 43,15, respectivamente) a partir da quantificação em 14 campos de dois lobos hepáticos diferentes.

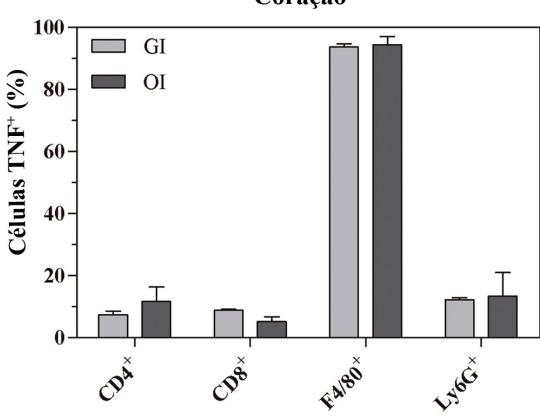
Coração



Fígado



Coração



D

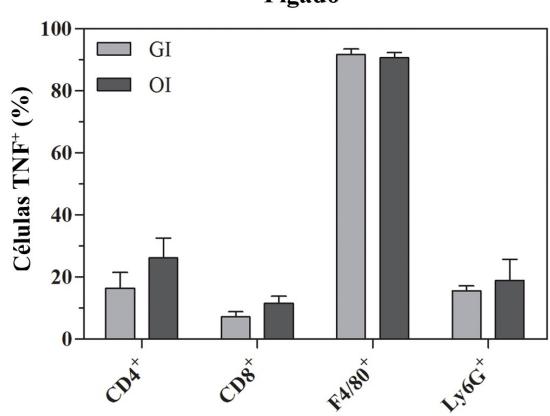


Figura 5.7. Células F4/80⁺ representam a maioria TNF⁺ no fígado e coração em camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

Camundongos BALB/c machos foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi* (cepa Tulahuén) por gavagem (IG) ou na cavidade oral (IO). **C,D**) As análises de imunofluorescência demonstram o percentual de células TNF⁺ em cada população celular após 16 dpi, CD4⁺, CD8⁺, F4/80⁺ e Ly6G⁺. **A, C)** coração e **B, D)** fígado. Os números representam média±erro padrão da média. n=3 camundongo/grupo (duas secções diferentes de cada camundongo de um experimento). As barras representam 100 µm.

5.6 A elevada produção de TNF- α está envolvida na mortalidade de camundongos infetados pela via oral

A fim de avaliar o impacto dos elevados níveis séricos de TNF- α (Figura 1.9) na resistência do hospedeiro, camundongos IO foram tratados com a proteína quimérica contra TNF- α . Inicialmente, foram testados início do tratamento com 0, 7 e 14 dpi. Estes resultados demonstraram que o início com 14 dpi apresentou uma tendência de sobrevida melhor em relação aos demais grupos. Além disso, 14 dpi precede o aumento de TNF- α sérico observado no soro (Figura 1.9). Portanto esse momento foi selecionado também considerando que o bloqueio de TNF- α em estágios mais iniciais da infecção prejudicaria o controle do parasito e consequentemente da infecção. Camundongos infectados IO tratados com Enbrel semanalmente a partir de 14 dpi apresentaram maior sobrevida que os não tratados, mas sem afetar os números de parasitos circulantes na corrente sanguínea (Figura 5.8).

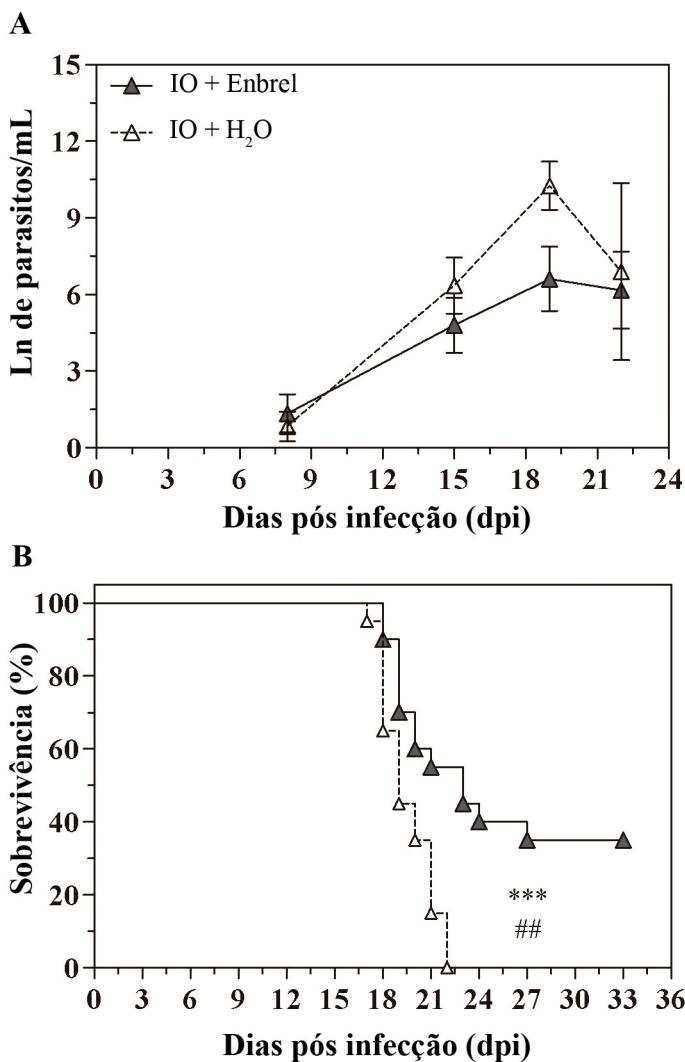


Figura 5.8. A terapia anti-TNF melhora a sobrevida de camundongos infectados pelo *T. cruzi* pela via oral (IO).

Camundongos machos BALB/c foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) na cavidade oral. O tratamento anti-TNF com etanercept começou depois de 14 dias pós-infecção (dpi) e foi realizado semanalmente. A parasitemia, **A**, (média e erro padrão da média do logaritmo de parasito/mL) e mortalidade, **B**, foram acompanhadas durante a fase aguda. Os parasitos foram contados no microscópio óptico, e a parasitemia calculada pelo método Brener. A análise estatística foi realizada utilizando “GraphPad Prism 5”. **A)** Para comparação de parasitemia nos dias 8, 15, 19 e 22 dpi foi utilizado o teste Mann-Whitney (unilateral superior). n: IO+enbrel=14-23 (n final e inicial respectivamente), IO+H₂O=3-23 (n final e inicial respectivamente). **B)** A sobrevida foi analisada pelos testes Mantel-Cox (****) e Gehan-Breslow-Wilcoxon (##). n=20 camundongos/grupo (equivalente a 100%) * p=0,05; ** p=0,01; *** p=0,001.

5.7 Disseminação inicial de *L. monocytogenes*

A fim de avaliar a distribuição inicial de *L. monocytogenes*, BALB/c e C57BL/6 foram infectados com uma cepa expressando OVA via IO e IV. A contagem de CFU foi realizada nos mandLNs, mLNs e baço após 18-20 h de infecção. A infecção oral promoveu disseminação preferencial para os mandLNs, enquanto a IV, como esperado, para o baço em camundongos BALB/c e C57BL/6. No entanto, a bactéria foi raramente encontrada nos mLNs (Figura 5.9). Estes dados preliminares demonstraram que quando a inoculação ocorreu na cavidade oral em duas linhagens diferentes de camundongos, a bactéria foi capaz de ultrapassar a barreira da mucosa oral e alcançar preferencialmente os linfonodos drenantes dessa região em momentos iniciais da infecção.

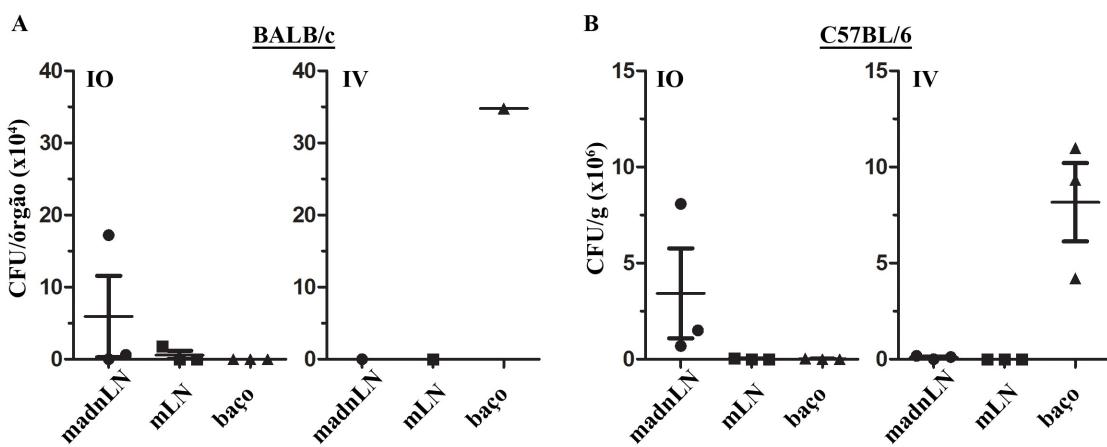


Figura 5.9. Distribuição tecidual de *L. monocytogenes*.

Fêmeas de camundongos BALB/c (**A**) e C57BL/6 (**B**) (10-12 semanas de idade) foram infectadas com *L. monocytogenes*-OVA na cavidade oral (IO) com $2,3 \times 10^8$ CFU (**A**) ou $1,2-2 \times 10^9$ CFU (**B**) ou por via intravenosa (IV) com 5×10^3 CFU. Após 18-20 h de infecção, os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mensentéricos (mLN), e o baço foram coletados. Esses tecidos foram homogeneizados, diluídos e plaqueados em meio BHI. A carga bacteriana representada como unidades formadoras de colônia (CFU) foi determinada após 24h. **A)** Oral: n=3; IV: n=1. **B)** n=3. As linhas horizontais representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

5.8 Análise da resposta T CD8⁺ específica em tecidos linfoideos após infecção oral por *L. monocytogenes*

Uma vez confirmada a presença de bactérias no órgãos analisados no nosso modelo, as respectivas dinâmicas celulares durante a infecção por *L.*

monocytogenes-OVA foram abordadas em diversos dias da cinética (1, 2, 5 e 12 dpi). Foram utilizadas células OT-I DsRed⁺ obtidas de camundongos Rag^{-/-} com TCR transgênico que reconhece SIINFEKL, uma sequência de aminoácidos de ovalbumina (OVA₂₅₇₋₂₆₄), no contexto H2-Kb (MHC de classe I). Estas células, que são T CD8 específicas para OVA, foram injetadas um dia antes da infecção com *L. monocytogenes* expressando OVA. Os resultados preliminares demonstraram que os mandLN estavam alterados após a infecção oral e sugerem uma tendência de aumento, enquanto o mesmo foi observado no baço após infecção IV. O número de células nos mLN não foi alterado (Figura 5.10).

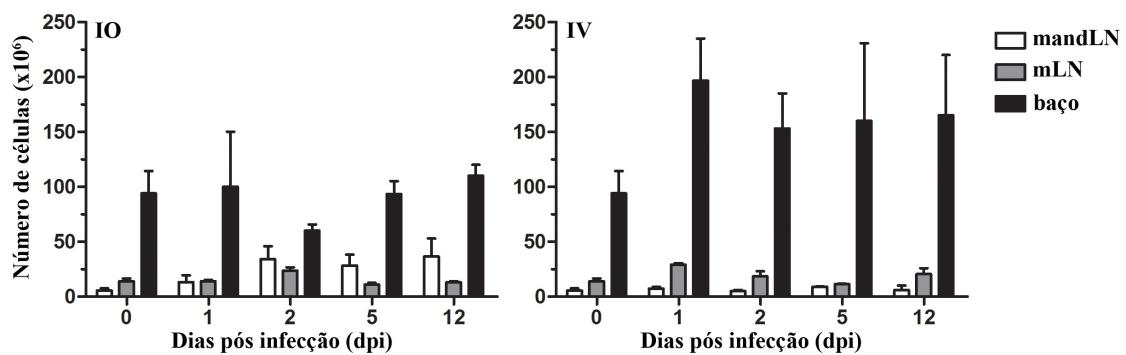


Figura 5.10. A infecção oral por *L. monocytogenes* afeta diferentemente órgãos linfoides secundários.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectadas na cavidade ora (IO) ou por via intravenosa (IV) com *L. monocytogenes*-OVA. Um dia antes da infecção, linfócitos OT-I DsRed⁺ foram injetados IV. Nos dias 1, 2, 5 e 12 pós infecção (dpi), os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mesentéricos (mLN), e baço foram coletados. O número total de células foi contado utilizando lâminas “Fast-Read 102®”. 0 dpi: n=5; 1, 2 e 5 dpi: n=3; 12 dpi: n=2. As barras representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

O percentual de linfócitos CD8⁺ não apresentou diferenças evidentes durante a cinética nos órgãos analisados de camundongos infectados via oral e um perfil semelhante foi observado com IV. Entretanto, refletindo a celularidade, os números absolutos de linfócitos CD8⁺ apresentaram tendência de aumento durante a cinética, na infecção oral principalmente nos mandLN e na IV, no baço (Figura 5.11A). Os dados sugerem que linfócitos OT-I, que reconhecem OVA expressa por *L. monocytogenes*, apresentaram maior percentual e número absoluto em 5 dias pós infecção (dpi) em todos os órgãos analisados em relação ao controle não infectado, e no baço de camundongos infectados via IV (Figura 5.11B).

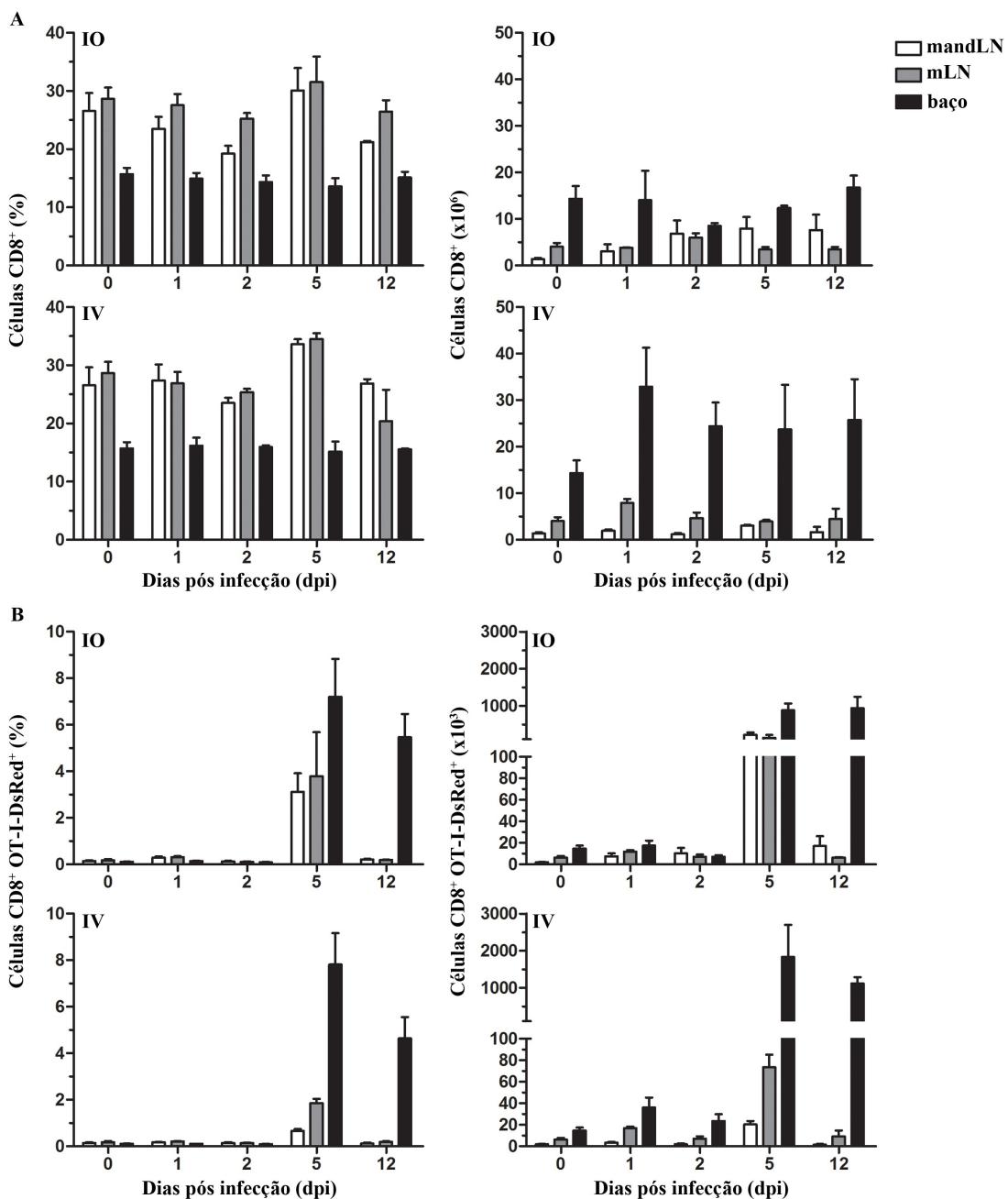


Figura 5.11. Expansão de OT-I em diferentes órgãos linfoides secundários após infecção oral por *L. monocytogenes*.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectados na cavidade oral (IO) ou por via intravenosa (IV) com *L. monocytogenes*-OVA. No dia anterior à inoculação, linfócitos OT-I DsRed⁺ foram injetados IV. Após 1, 2, 5 e 12 dias de infecção, os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mesentéricos, e baço foram coletados. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no FACS LRSII (BD) e os dados analisados utilizando o programa FlowJo (Tree Star). **A**) As células CD8⁺ foram selecionadas a partir da população células individuais, previamente em linfócitos. **B**) As células OT-I DsRed⁺ foram selecionadas a partir da população de CD8⁺. Paineis esquerdos, percentual e painéis direitos, números absolutos. 0 dpi: n=5; 1, 2 e 5 dpi: n=3; 12 dpi: n=2. As barras representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

Para avaliação da proliferação, células OT-I foram marcadas com CFSE antes de serem injetadas. Após 1, 2, 5 e 12 dpi, os órgãos foram coletados para análise. Estes resultados preliminares demonstraram que em estágios iniciais, ainda não foi possível detectar proliferação considerável, mas após 5 dias, todas as células já haviam proliferado independente do órgão e da via de inoculação, sugerindo que o período de maior proliferação foi entre os dias 3 e 4 (Figura 5.12).

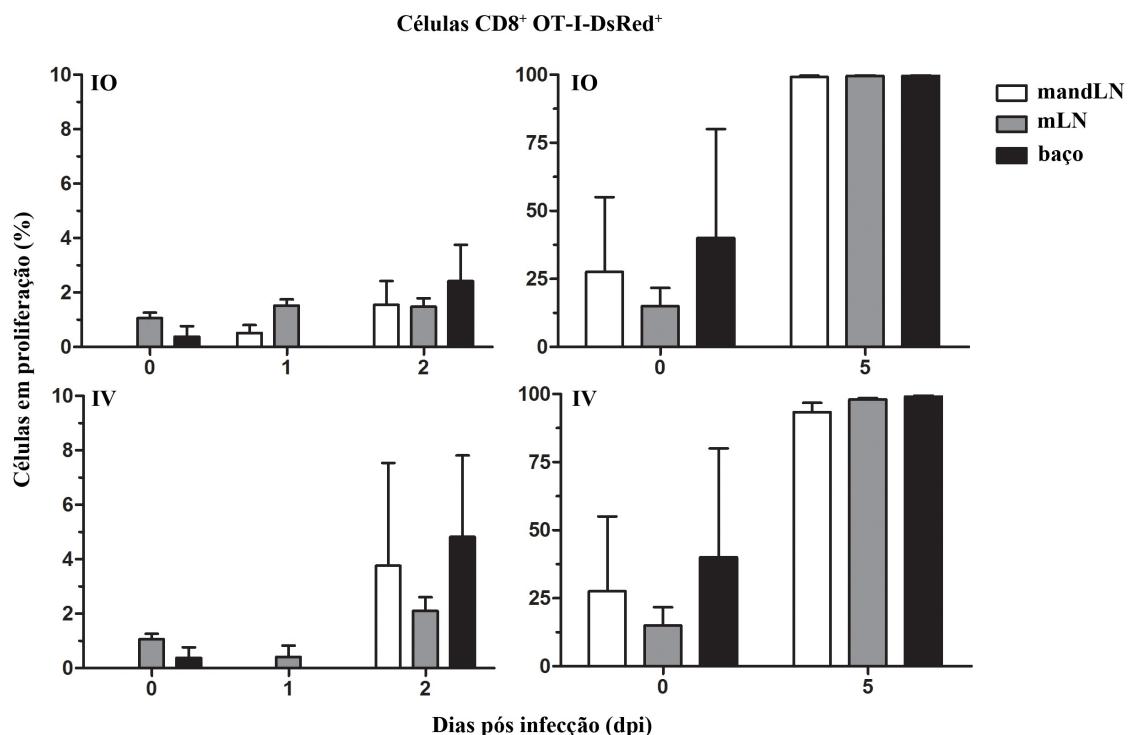


Figura 5.12. Análise de proliferação em diferentes órgãos linfoides secundários após infecção oral por *L. monocytogenes*.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectados na cavidade oral (IO) ou por via intravenosa (IV) com *L. monocytogenes*-OVA. No dia anterior à infecção, células OT-I DsRed⁺ marcadas com CFSE foram injetadas IV. Após 1, 2, 5 e 12 dias de infecção, os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mesentéricos (mLN), e baço foram coletados. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no FACS LRSII (BD) e os dados analisados utilizando o programa FlowJo (Tree Star). As células em proliferação (CFSE⁻) foram selecionadas dentro população de OT-I DsRed⁺. Painel esquerdo, 0, 1 e 2 dpi: n=3. Painel direito, 0 dpi: n=2; 5 dpi: n=3. As barras representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

Marcadores de ativação recente demonstraram diferentes perfis de acordo com o órgão e a via de inoculação. Linfócitos CD25⁺ e CD69⁺ apresentaram

tendência de aumento em percentuais e números absolutos nos mLN após infecção oral, enquanto apenas CD69⁺ apresentou tendência de aumento no baço de camundongos infectados IV. Nenhuma alteração evidente foi observada nos mLNs (Figura 5.13A e B).

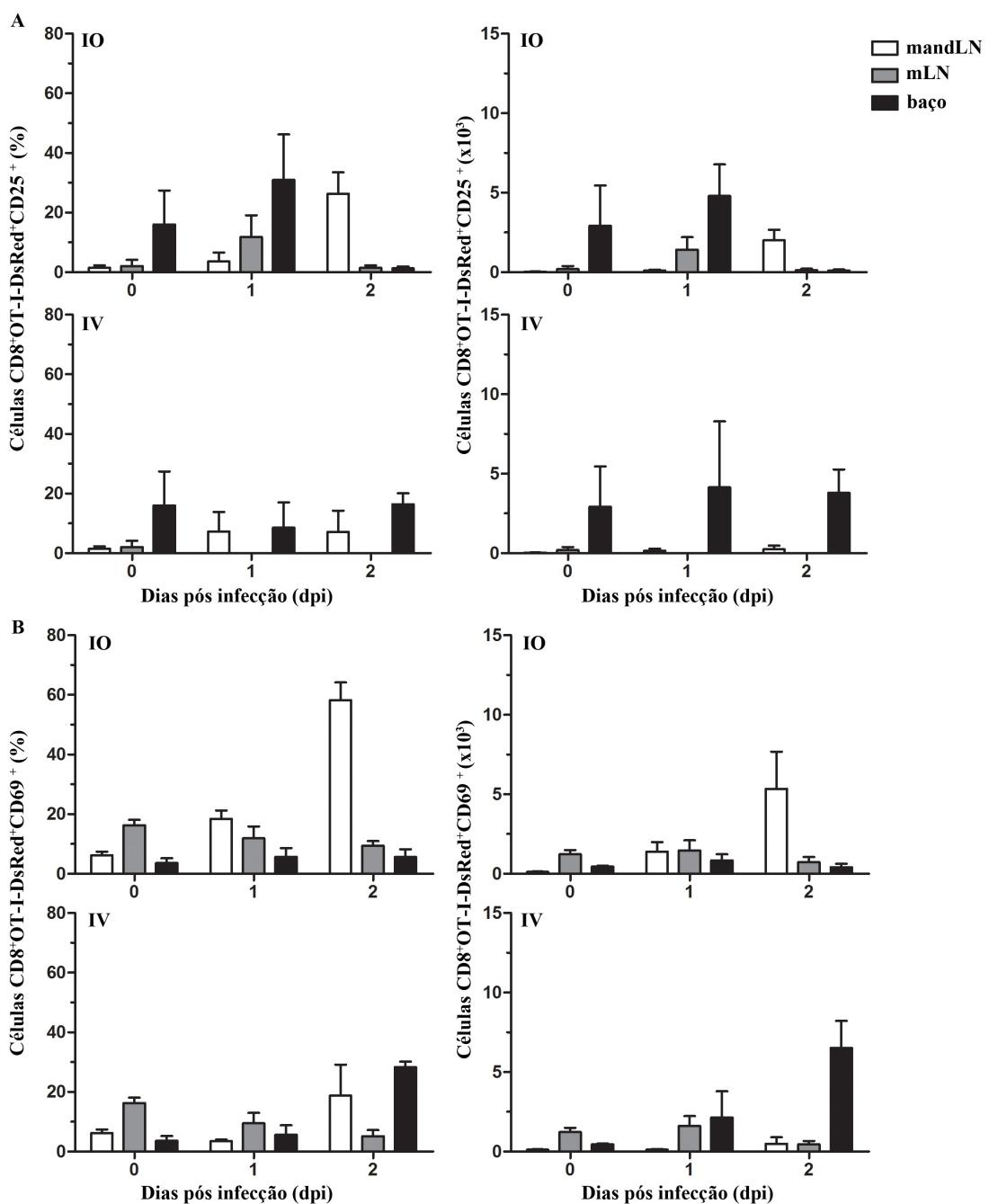


Figura 5.13. Fenótipos de ativação recente em órgãos linfoideos secundários após infecção oral por *L. monocytogenes*.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectados via oral ou intravenosa (IV) com *L. monocytogenes*-OVA. No dia anterior à infecção, células OT-I DsRed⁺ foram injetadas IV. Após 1, 2, 5 e 12 dias de infecção, os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mesentéricos (mLN), e baço foram coletados. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no FACS LRSII (BD) e os dados analisado utilizando o programa FlowJo (Tree Star). Linfócitos **A**) CD25⁺ e **B**) CD69⁺ foram selecionados dentro da população de linfócitos OT-I DsRed⁺. Painel esquerdo, percentuais e painel direito, números absolutos. n=3. As barras representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

Considerando os percentuais de precursores de linfócitos de memória central (T_{CM}) $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{high}}$, não foram observadas variações relevantes ao longo da infecção, no entanto, a infecção oral promoveu uma tendência de aumento em número absoluto dessa população em todos os órgãos, enquanto a IV, apenas no baço (Figura 5.14A). A população de células $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}$ (células de memória efetora e efetoras de vida curta) apresentou tendência de aumento após infecção oral em percentuais nos mandLN_s, em números absolutos em todos os órgãos. Entretanto, em camundongos infectados IV, esse fenômeno foi principalmente observado no baço (Figura 5.14B).

Tanto as células efetoras precursoras de memória (“Memory precursor effector cells”, MPECs) KLRG1 $^{\text{-}}$ CD127 $^{+}$, quanto as efetoras de vida curta (“Short lived effector cells”, SLEC) KLRG1 $^{+}$ CD127 $^{-}$ foram principalmente detectadas no baço independente da via de infecção, exceto por pequenos números detectados de ambas as populações nos mandLN_s após infecção oral (Figura 5.15).

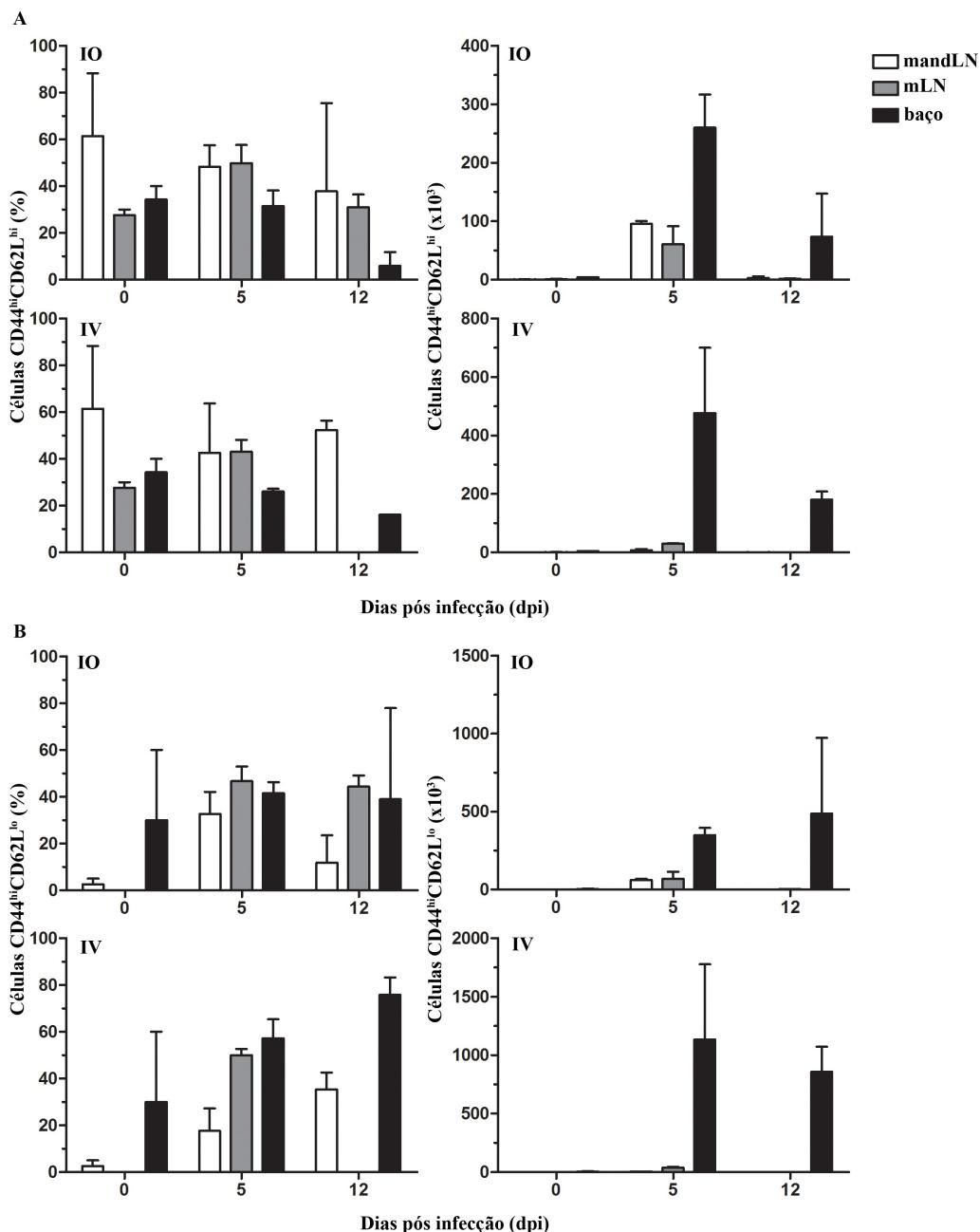


Figura 5.14. Perfis de células efetoras e precursores de memória em diferentes órgãos linfoideos após infecção oral por *L. monocytogenes*.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectados na cavidade oral (IO) ou por via intravenosa (IV) com *L. monocytogenes*-OVA. No dia anterior à infecção, células OT-I DsRed⁺ foram injetadas IV. Após 1, 2, 5 e 12 dias de infecção, os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mesentéricos (mLN), e baço foram coletados. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no FACS LRSII (BD) e os dados analisados utilizando o programa FlowJo (Tree Star). CD44 versus CD62L foi analisado dentro da população de linfócitos OT-I DsRed⁺. **A)** Linfócitos CD8⁺ DsRed⁺ CD44^{high}CD62L^{high} e **B)** Linfócitos CD8⁺ DsRed⁺ CD44^{high}CD62L^{low} cells. Painel esquerdo, percentuais e painel direito, números absolutos. 0 dpi: n=2; 5 dpi: n=3; 12 dpi: n=2. As barras representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

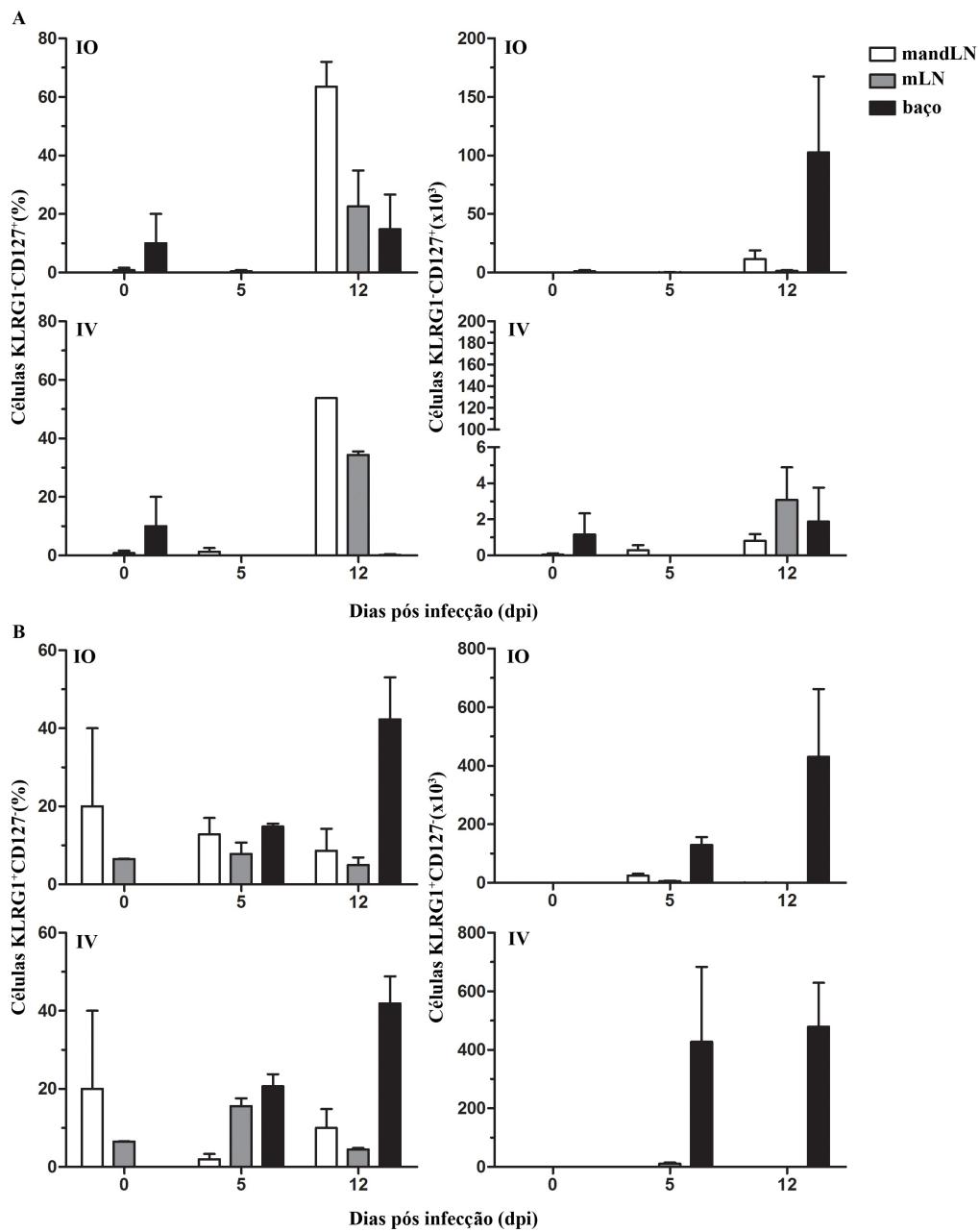


Figura 5.15. Perfis de células efetoras e precursores de memória em diferentes órgãos linfoideos após infecção oral por *L. monocytogenes*.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectados na cavidade oral (IO) ou por via intravenosa (IV) com *L. monocytogenes*-OVA. No dia anterior à infecção, células OT-I DsRed⁺ foram injetadas IV. Após 1, 2, 5 e 12 dias de infecção, os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mesentéricos (mLN), e baço foram coletados. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no FACS LRSII (BD) e os dados analisados utilizando o programa FlowJo (Tree Star). KLRG1 versus CD127 foi analisado dentro da população de linfócitos OT-I DsRed⁺. **A)** Linfócitos CD8⁺ DsRed⁺ KLRG1⁺CD127⁺ e **B)** Linfócitos CD8⁺ DsRed⁺ KLRG1⁺CD127⁻. Painel esquerdo, percentuais e painel direito, números absolutos. 0 dpi: n=2; 5 dpi: n=3; 12 dpi: n=2. As barras representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

5.9 Perfil de células CD8⁺ específicas após bloqueio da entrada e saída de linfócitos dos órgãos linfoideos secundários

No curso natural da infecção, nossos dados demonstraram que após a infecção oral por *L. monocytogenes*, os números de linfócitos OT-I antígenos específicos eram similares entre os órgãos (Figura 5.11B). No entanto, quando utilizamos anticorpo monoclonal clone MEL-14 para bloquear CD62L e fingolimoide FTY720 para bloquear o receptor de esfingosina 1 fosfato (S1P1) com 1 dpi e apenas FTY720 novamente com 3 dpi (Figura 5.16A), portanto inibindo entrada e saída de linfócitos dos órgãos linfoideos secundários, respectivamente, os perfis tornaram-se mais evidentes. Dados preliminares demonstraram que o percentual de CD8⁺ total não foi alterado, mas linfócitos OT-I específicos apresentaram tendência de expansão quase que exclusivamente nos mandLNs após a infecção oral (Figura 5.16B).

A infecção oral promoveu uma tendência de aumento do percentual de linfócitos CD44^{high}CD62L^{high} e CD44^{high}CD62L^{low} nos mandLNs, e CD44^{high}CD62L^{low}, também nos mLNs e baço. No que diz respeito a infecção IV, os resultados demonstraram que linfócitos CD44^{high}CD62L^{high} e CD44^{high}CD62L^{low} apresentaram tendência de aumento percentual no baço, e CD44^{high}CD62L^{high}, também nos mandLNs e mLNs (Figura 5.17A).

Linfócitos KLRG1⁻CD127⁺ apresentaram pequena tendência de aumento nos mLNs e KLRG1⁺CD127⁻ foram principalmente detectadas nos mandLNs após a infecção oral, enquanto na infecção IV, essa população foi mais evidente no baço (Figura 5.17B).

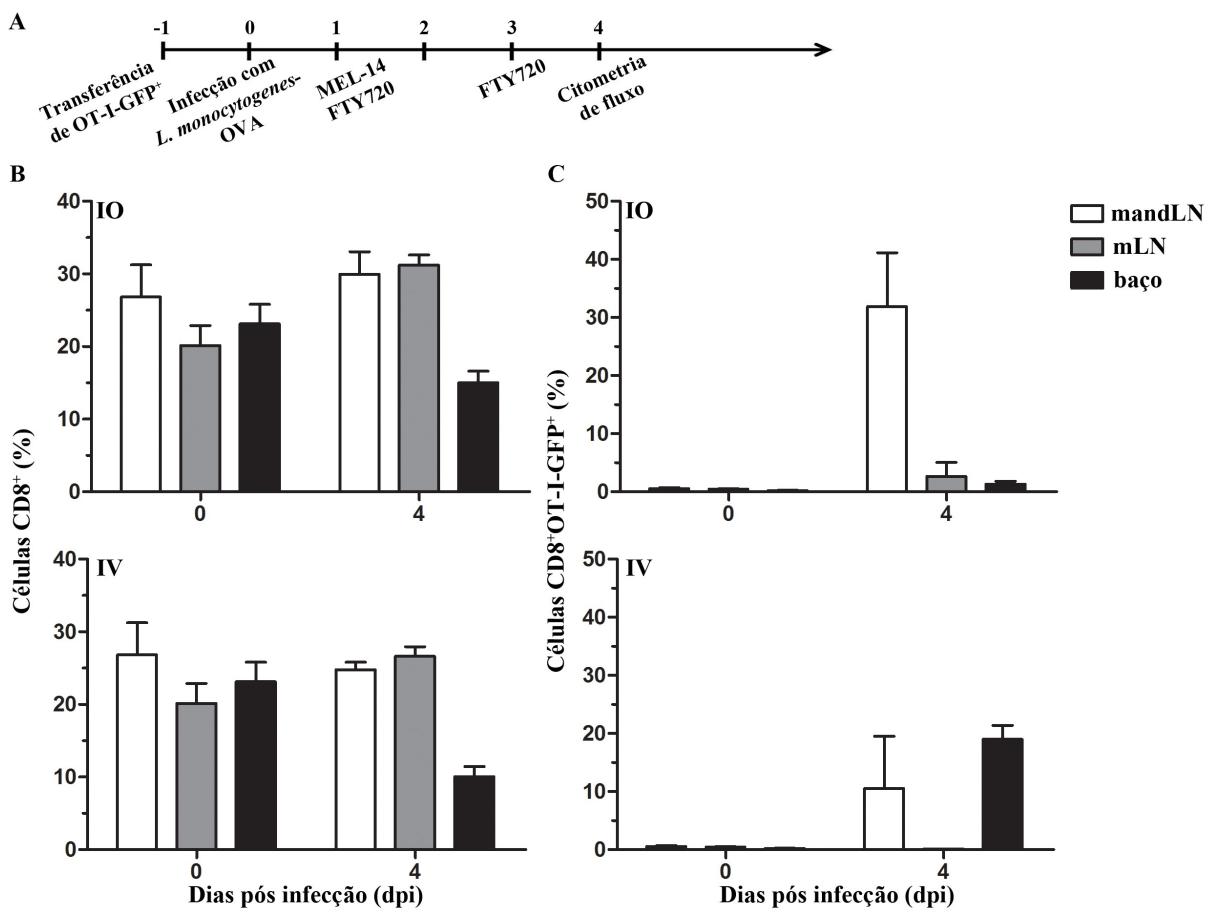


Figura 5.16. Expansão de linfócitos OT-I em diferentes órgãos linfoideos secundários após infecção oral por *L. monocytogenes* seguida de tratamento com MEL-14 e FTY720.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectados na cavidade oral (IO) ou por via intravenosa (IV) com *L. monocytogenes*-OVA. No dia anterior à infecção, células OT-I GFP⁺ foram injetadas IV. No dia 1 pós infecção, os camundongos foram tratados com injeção intraperitoneal de MEL-14 (150 µg/camundongo) e FTY720 (1 µg/kg), e no dia 3 novamente FTY720. Após 4 dpi, os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mesentéricos (mLN), e baço foram coletados. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no FACS LRSII (BD) e os dados analisado utilizando o programa FlowJo (Tree Star). **A**) Esquema representativo da cinética. **B**) Células CD8⁺ foram selecionadas dentro da população de células individuais previamente selecionadas em linfócitos. **C**) Células OT-I GFP⁺ foram selecionados na população de linfócitos CD8⁺. n=3. As barras representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

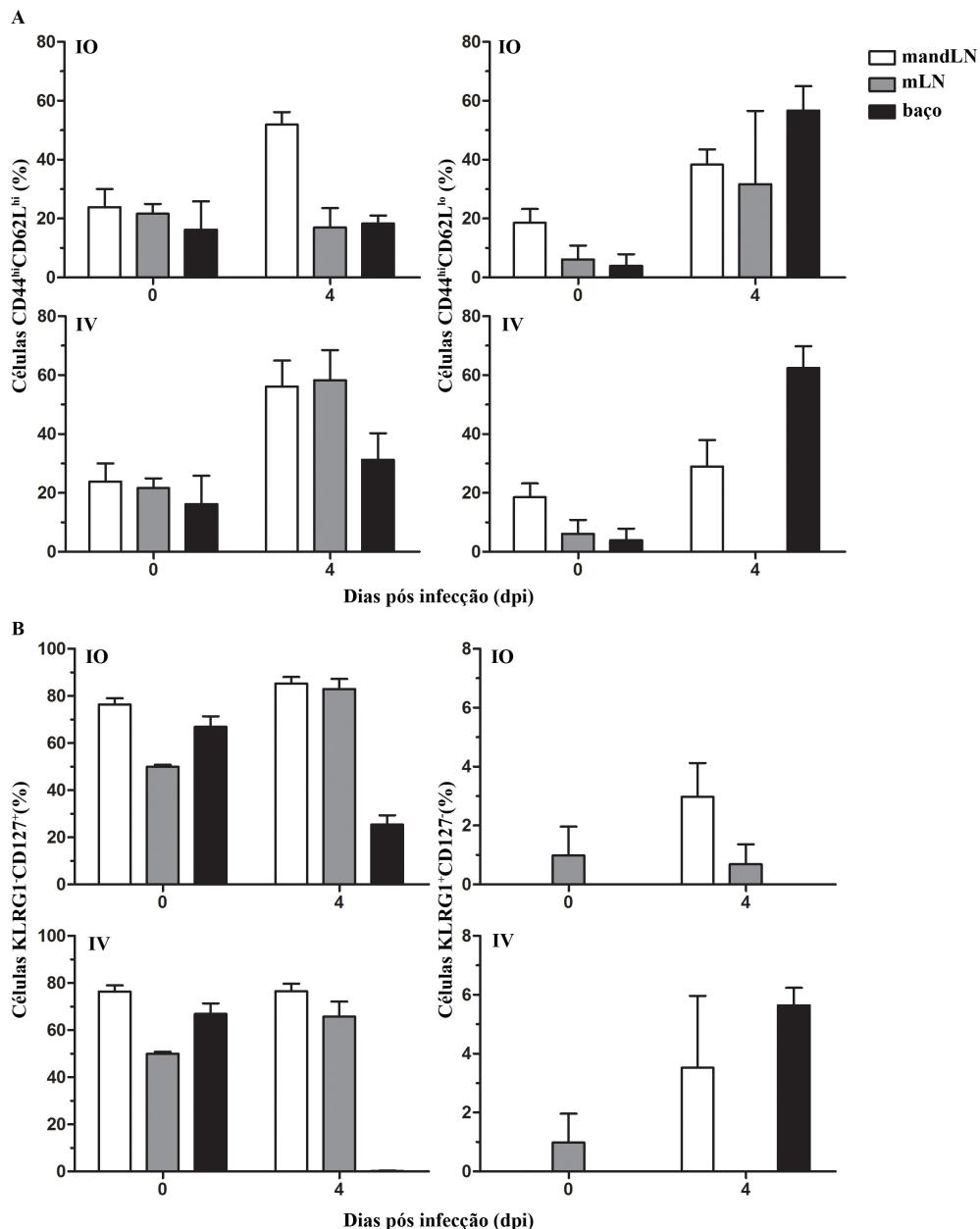


Figura 5.17. Perfis de células efetoras e precursores de memória em diferentes órgãos linfoideos secundários após infecção oral por *L. monocytogenes* seguida por tratamento com MEL-14 e FTY720.

Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectados na cavidade oral (IO) ou por via intravenosa (IV) com *L. monocytogenes*-OVA. No dia anterior à infecção, células OT-I GFP+ foram injetadas IV. No dia 1 pós infecção, os camundongos foram tratados com injeção intraperitoneal de MEL-14 (150 µg/camundongo) e FTY720 (1 µg/kg), e no dia 3 novamente FTY720. Após 4 dpi, os linfonodos mandibulares, mandibulares acessórios (mandLN) e mesentéricos (mLN), e baço foram coletados. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas no FACS LRSII (BD) e os dados analisados utilizando o programa FlowJo (Tree Star). CD44 versus CD62L e KLRG1versus CD127 foram analisados dentro da população de OT-I GFP+. **A)** Linfócitos CD44^{high}CD62L^{high} e CD44^{high}CD62L^{low}. **B)** Linfócitos KLRG1⁺CD127⁻ e KLRG1⁺CD127⁻. n=3. As barras representam média ± erro padrão. Os dados foram obtidos a partir de 1 experimento.

5.10 Estabelecimento da cirurgia dos linfonodos mandibulares para visualização por microscopia de dois fótons (2PM)

Inicialmente, a fim de melhor compreender a área de drenagem dos mandLNs, foram utilizados camundongos Prox1-GFP para visualização da rede de linfáticos em verde. Após a cirurgia com auxílio de um estereomicroscópio, fotos de fluorescência foram capturadas. Dessa forma, foi possível observar que os mandLNs estavam principalmente conectados por vasos linfáticos à região inferior da cavidade oral e das bochechas (Figura 5.18A). Utilizando suportes customizados para realização da operação (Figura 5.18B), foi estabelecida uma boa e estável preparação para imageamento intravital por 2PM (Figura 5.18C).

Posteriormente, foram realizados experimentos em condições homeostáticas com o objetivo de avaliar o comportamento natural das células. Após análise semi-automatizada da trajetória individual das células, a velocidade de cada uma foi obtida a partir do programa utilizado. Desta forma, foi calculada a velocidade média das células analisadas, sendo para linfócitos T, uma velocidade de 13 $\mu\text{m}/\text{min}$, enquanto para T CD8 $^{+}$, 16 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Figura 5.19A). Para análise em condições infecciosas, utilizamos nosso modelo de infecção oral por *L. monocytogenes*-OVA. Após 5 dias de infecção, a velocidade média de linfócitos policlonais GFP $^{+}$ foi de 16 $\mu\text{m}/\text{min}$, em contraste, linfócitos antígeno-específicos, OI-T-DsRed $^{+}$, apresentaram média de 18 $\mu\text{m}/\text{min}$ em experimentos preliminares (Figura 5.19B e C).

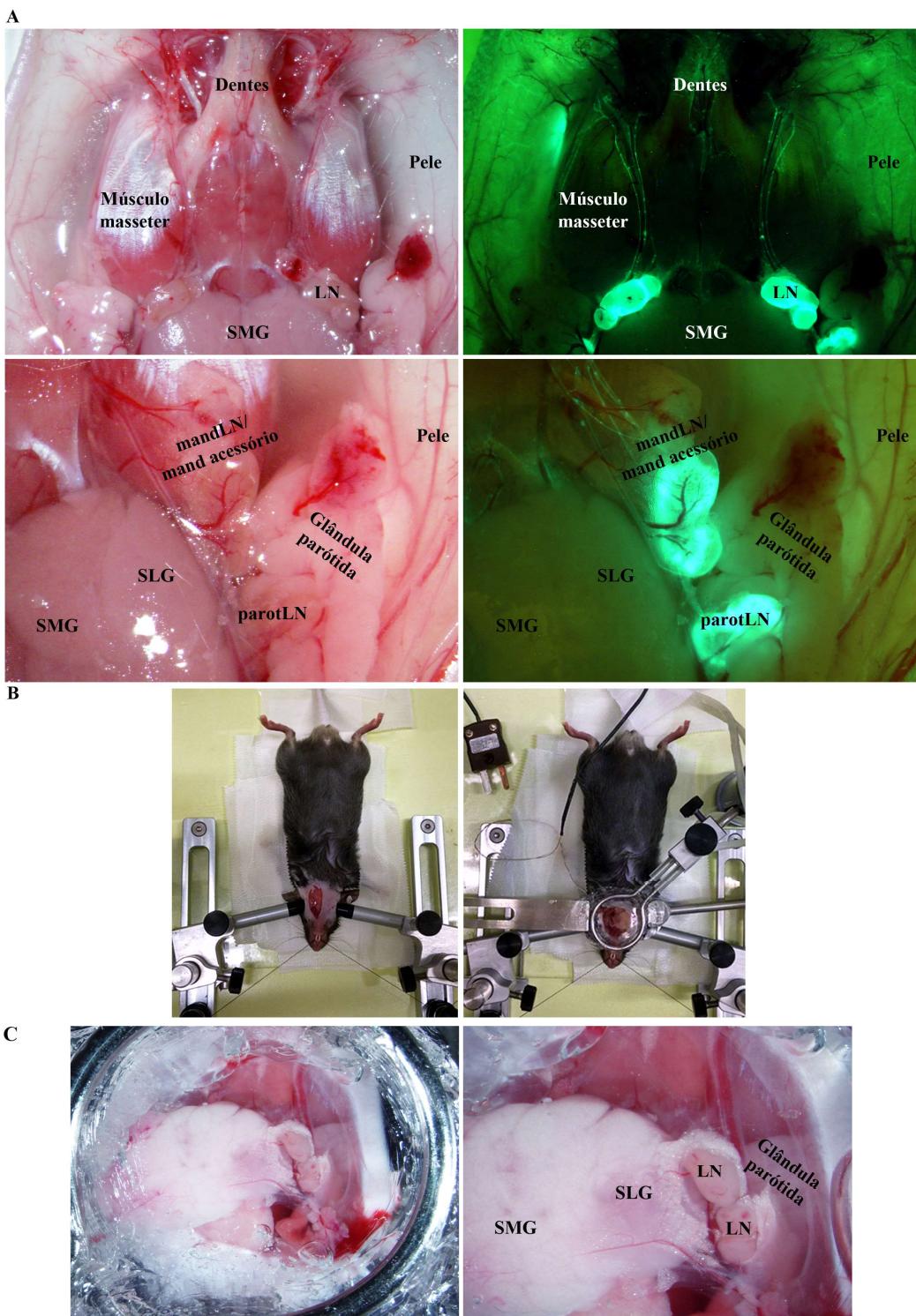


Figura 5.18. Exposição dos linfonodos mandibulares e mandibulares acessórios para visualização por 2PM.

Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal e, após remoção dos pelos, uma incisão foi realizada na região esquerda do pescoço para exteriorização dos linfonodos que foram mantidos úmidos com solução salina. **A)** Camundongos Prox1-GFP foram utilizados para visualizar as áreas de drenagem dos linfonodos de interesse. **B)** Imagens mostrando a fixação do camundongo no suporte. **C)** Preparação final para imageamento intravital. SMG, glândula salivar submandibular. mandLN, linfonodo mandibular. parotLN, linfonodo parótido.

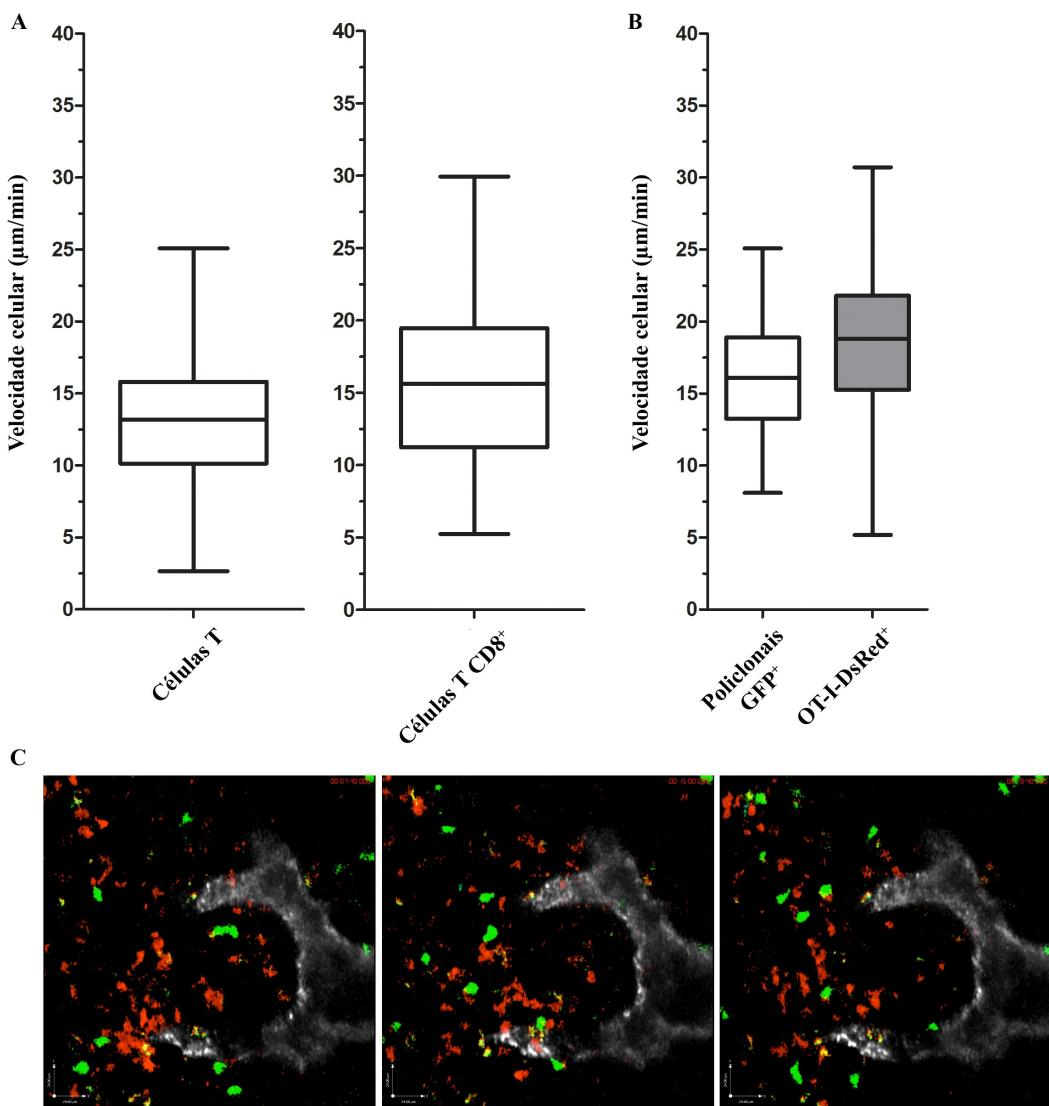


Figura 5.19. Velocidade celular em condições homeostáticas e durante a infecção por *L. monocytogenes*.

Os vídeos obtidos do imageamento intravital por microscopia de dois fótons (“Two Photon Microscopy” – 2PM) foram analisados utilizando o programa Velocity. **A)** Células marcadas com CMTMR foram injetadas IV em camundongos C57BL/6 pareados por sexo pelo menos 16h antes da visualização. Análise de linfócitos T: n=3 camundongos (14 vídeos/3 experimentos); Linfócitos T CD8⁺: n=3 camundongos (7 vídeos/1 experimento). **B)** Fêmeas de camundongos C57BL/6 (10-12 semanas de idade) foram infectadas via oral com *L. monocytogenes*-OVA. Linfócitos OT-I-DsRed⁺ foram transferidos IV no dia 1 pós infecção e linfócitos policlonais GFP no dia 3 em C57BL/6 infectados pareados por sexo. A visualização foi realizada no dia 5. n=1 mouse (2 vídeos/ 1 experimento). **A/B)** As caixas representam mediana e intervalo interquartil. **C)** Imagens representativas de **B** em 7, 15 e 20 min de vídeo. Verde, linfócitos policlonais GFP⁺. Vermelho, OT-I-DsRed⁺. Cinza, vênulas de endotélio alto (“High endothelial venules”, HEV) detectadas por MECA-79.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a transmissão oral da doença de Chagas representa a via mais importante no Brasil (70-80% dos casos) (48). Na Venezuela, Colômbia, Bolívia, Argentina e Equador também houve casos relatados da doença aguda associada ao consumo de alimentos/bebidas contaminados, mas há poucos estudos nessas regiões (49). Esses pacientes oralmente infectados desenvolvem sintomatologia intensa (febre, edema facial, exantema, hemorragia, meningoencefalite, dores abdominais, entre outros), acompanhada pelo envolvimento cardíaco clássico. Além disso, a elevada mortalidade nas duas primeiras semanas (8-35%) supera as taxas resultantes da infecção pela via vetorial clássica com picada e contaminação com as fezes contaminadas do vetor (5-10%) (52). Acredita-se que a via de entrada do parasito no hospedeiro seja um fator chave na patogênese da doença (230). Trabalhos na literatura demonstraram que infecções sistêmicas *versus* na mucosa promovem distintos perfis ao longo da infecção. Foi demonstrado que camundongos CFI infectados com a cepa Peruviana (TcII) do *T. cruzi* por vias sistêmicas como IP, intravenosa ou subcutânea apresentaram maiores taxas de infectividades (67-100%) quando comparadas a vias de mucosa como IO, IG, intrarretal, genital ou conjuntival (17-67%)(181). Além disso, Caradonna and Pereiraperrin (231) infectaram camundongos BALB/c e C57BL/6 com a cepa Tulahuén (TcVI) via subcutânea e intranasal, e observaram maior mortalidade no grupo subcutâneo. Vale ressaltar que camundongos infectados intranasalmente desenvolveram maior parasitismo cerebral e menor parasitemia que aqueles infectados subcutaneamente, sugerindo uma migração preferencial de parasitos para o cérebro após administração intranasal (231). Quando camundongos foram infectados com essa mesma cepa simulando vias naturais de infecção, desafios oral (na orofaringe) ou cutâneo (inserindo o parasito em um corte cutâneo), tripomastigotas metacíclicos derivados do inseto vetor são mais infectivos pela inoculação oral (232). Independente do DTU (cepas TcI ou TcII), a infecção por gavagem (IG) apresenta menor infectividade, parasitemia e mortalidade que injeções intraperitoneais (233), da mesma forma, observamos com a cepa Tulahuén (TcVI). Resultados prévios demonstraram que a infecção IO induz maior taxa de infectividade comparada a IG (Figura 1.8). Assim como a via de inoculação, outros fatores como, tamanho do inóculo, DTU e estágio de desenvolvimento do *T. cruzi*, podem estar envolvidos no prognóstico da doença. Trabalhos de outros grupos demonstraram que a infecção por gavagem (IG) com 5×10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y (TcII) promove maior parasitemia que a

cepa Colombiana (Tcl) (233). Além disso, a infecção IP apresenta maior infectividade com parasitos de sangue do que com tripomastigotas metacíclicos derivados do inseto vetor (234).

As glicoproteínas gp82 e gp30 estão envolvidas na invasão da mucosa gástrica e podem estar diferencialmente expressas entre as diferentes cepas e estágios evolutivos. Além disso, Cortez e colaboradores identificaram uma sequência de ligação à mucina presente na gp82 de tripomastigotas metacíclicos da cepa Y (TcII) e sua equivalente Tc85-11, envolvida na invasão celular por tripomastigotas derivados de cultura (TCT) (102). No nosso modelo, ambos TCT e metacíclicos derivados de cultura foram capazes de infectar pela IG. Além disso, tanto tripomastigotas metacíclicos derivados do inseto vetor como também parasitos derivados de células/sangue (consumo de animais reservatório infectados) estão associados aos surtos de transmissão oral em pacientes (49, 235, 236).

O sítio inicial de entrada do parasito na infecção oral ainda não é bem determinado. Hoft e colaboradores demonstraram que em camundongos infectados oralmente (IO), não há detecção de parasitos na orofaringe e esôfago, mas sim, detectou-se a presença de ninhos de amastigotas no estômago (84). Nessa mesma linha, outro grupo sugeriu que glicoproteínas do parasito, como gp82 e gp30, estão envolvidas na invasão do epitélio gástrico após inoculação intragástrica/intrafaringeana (85, 97, 171, 237). Em conjunto, esses trabalhos consideram a administração do parasito seja pela via intragástrica, intrafaringeana ou na cavidade oral, como infecção “oral”. Nos resultados obtidos durante o mestrado, demonstramos que camundongos BALB/c infectados pelo inoculo na cavidade oral (IO) apresentaram maior infectividade quando comparados ao grupo IG (Figura 1.8). Desta forma, esses dados constituem o primeiro relato abordando potenciais diferenças no desenvolvimento da infecção de acordo com as vias IG e IO. Após alcançar a circulação sistêmica, *T. cruzi* pode multiplicar-se no interior de diversos tipos celulares, como por exemplo, macrófagos, fibroblastos, músculo esquelético e cardíaco, neurônios e células epiteliais. O parasito possui tropismo para o tecido cardíaco, onde forma ninhos de amastigotas e desencadeia o recrutamento de células inflamatórias (70). Nossos resultados anteriores mostraram que apesar da menor parasitemia e mortalidade, o grupo IG apresenta uma perimiocardite mais grave que o IO, sugerindo que o envolvimento cardíaco não esteja relacionado à elevada mortalidade do grupo IO (Figura 1.8, Figura 1.10).

Também já foi demonstrado que o *T. cruzi* é capaz de infectar o sistema reticuloendotelial, incluindo medula óssea, baço e fígado. Além disso, a infecção IP promove apoptose de células hepáticas e inflamação devido à produção de TNF- α . Nesse sentido, foi previamente descrito que a cepa Tulahuén do *T. cruzi* induz a produção de TNF- α e apoptose de hepatócitos, comprometendo a função do órgão (109). No nosso modelo, a infecção IO apresentou dano hepático mais grave que a IG, como observado na histopatologia e elevada atividade sérica de ALT e AST (Figura 5.2). Tem sido descrito que hepatócitos não são comumente infectados *in vivo*, mas ninhos de amastigotas podem ser observados nas células sinusoidais e de Kupffer (108). Nesse trabalho, amastigotas foram raramente detectados no fígado, provavelmente em células de Kupffer. Esta escassez pode ocorrer devido ao eficiente controle do parasito que ocorre nesse órgão (110). No entanto, outros dados do grupo demonstraram a presença de DNA satélite do parasito por PCR em tempo real (178). Adicionalmente, o fígado é descrito como a primeira linha de proteção contra patógenos e em respostas tolerogênicas a抗ígenos oriundos do trato gastrointestinal através do sistema porta (20, 25, 110, 238). Nossos resultados demonstraram que os macrófagos são as principais células produtoras de TNF- α no fígado (Figura 5.7). Essas células podem estar envolvidas na eliminação tecidual do parasito. Considerando o envolvimento de TNF- α na morte celular, vale ressaltar que foi observada marcação positiva para apoptose em regiões ricas em TNF- α (Figura 5.4).

Paralelamente às diferenças parasitológicas e histopatológicas, nossos dados também haviam demonstrado que camundongos infectados IG e IO apresentaram elevados níveis séricos de IFN- γ , enquanto TNF- α estava elevado apenas em IO (Figura 1.9). A resposta imune celular adaptativa é essencial para o controle do parasitismo durante a infecção (239).

As citocinas T_H1 possuem um papel importante na regulação da replicação do *T. cruzi* e na resposta imune conferindo resistência do hospedeiro, enquanto citocinas T_H2, como IL-4 e IL-5, estão associadas à susceptibilidade do hospedeiro (70). No início da infecção, DNA do parasito e glicoconjugados de superfície são capazes de desencadear a resposta imune inata através da ligação com TLR-2, -4 e -9 em macrófagos e DCs, aumentando sua capacidade endocítica e de eliminação do parasito por estresse oxidativo. Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , favorece a ativação de células inflamatórias que migram para controle da carga parasitária

(239). Elevados níveis de TNF- α , como observados em IO, podem estar envolvidos com danos cardíaco, esplênico e hepático, e choque tóxico em camundongo, como já foi descrito em outros estudos (142, 240). Reforçando essa ideia, IO apresentou pico de TNF- α com 17 dpi, quando se inicia a mortalidade (Figura 1.8). O grupo IG também começa a morrer nesse mesmo momento, mas em taxas mais baixas que IO. Nesse sentido, a detecção de TNF- α por RT-PCR também foi maior em amostras de coração do grupo IO que do IG (Figura 5.6). Além disso, também demonstramos anteriormente que tanto em IG como em IO, IL-10 e IL-4 estavam aumentadas (17 dpi), enquanto IO apresentava menor quantidade da citocina reguladora TGF- β circulante. Essas citocinas estão envolvidas na inibição da função microbicida de macrófagos e na proteção do hospedeiro contra dano tecidual (142, 144). Tem sido descrito que células produtoras de IL-17 contribuem para a formação da barreira gastrointestinal (184). Os resultados obtidos durante o mestrado demonstraram que, como esperado, a inoculação do parasito por vias de mucosa (IG e IO), desencadeia a ativação dessas células, elevando a produção desta citocina (Figura 1.9).

Estudos abordando diferentes vias de infecção são relevantes uma vez que parecem promover diferenças na resposta imune e no prognóstico da doença. Infecções bacterianas como com *L. monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* e *Francisella tularensis* através da mucosa (intranasal ou oral) promovem resposta TH17, enquanto vias sistêmicas (intravenosa ou subcutânea), TH1. Antígenos administrados pela via de mucosa estimulam células produtoras de IL-17 (241), como foi também observado na infecção pelo *T. cruzi*.

Nos camundongos infectados IO, os elevados níveis circulantes de TNF- α em 17 dpi estavam associados a dano hepático e morte. Resultados similares foram observados em camundongos deficientes de IL-10, que desenvolvem aumentada destruição hepática e choque tóxico por TNF- α elevado. Para corroborar que TNF- α estava envolvido na morte dos camundongos IO, bloqueamos esta molécula. Por essa citocina ser crítica no controle da parasitemia [32,48], a administração de etanercepte começou em 14 dpi, quando a parasitemia já estaria sendo controlada pela resposta imune humoral. O tratamento com etanercepte atrasou a mortalidade sem alterar a parasitemia, revelando o papel crítico de TNF- α no curso da infecção IO (Figura 5.8). Resultados similares foram também observados por Rodríguez-Angulo e colaboradores (242).

Vários grupos de pesquisa incluindo o nosso demonstraram que a via de inoculação do parasito é fator chave no que diz respeito ao desenvolvimento da doença, portanto vale considerar a infecção oral especificamente, uma vez que a transmissão oral tem apresentado grande relevância epidemiológica. Nesse trabalho, demonstramos que a resposta do hospedeiro é distinta quando o parasito é inoculado na boca ou por gavagem. Se compararmos com os pacientes, os surtos de transmissão oral estão relacionados à ingestão de comidas/bebidas contaminadas (49), e curiosamente, os pacientes apresentam edema de face (243). Parasitos/antígenos podem ser capturados por células dendríticas tolerogências da mucosa oral produtoras de IL-10 e IL-12 (perfil regulador e inflamatório), ou no trato gastrointestinal de onde podem ser drenados para o fígado pelo sistema porta (20, 244). Considerando a infecção oral, não podemos assumir que o processo infeccioso é o mesmo após inoculação oral ou por gavagem (intragástrica/intrafaringeana).

Dados do nosso grupo demonstraram que após a infecção oral o *T. cruzi* é detectado nos linfonodos mandibulares (mandLNs)(178), corroborando a importância do contato do patógeno na cavidade oral antes da chegada ao trato gastrointestinal inferior. Portanto, avaliamos a drenagem e ativação inicial da resposta imune específica nesses linfonodos após a infecção oral por *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes foi principalmente descrita por infectar o intestino delgado, mas o cólon também já foi relatado como sítio primário de replicação bacteriana após ingestão de alimentos contaminados (220). No entanto, o papel da boca e dos linfonodos drenantes ainda não foram abordados.

Após infecção pela via tradicional descrita na literatura por inoculação IV, camundongos BALB/c apresentam carga bacteriana principalmente no baço e fígado, e em menor proporção nos intestinos delgado e grosso após 24h de infecção. No entanto, após inoculação intragástrica (IG), *L. monocytogenes* é preferencialmente detectada nos mLNs, e intestinos delgado e grosso, mas também no fígado em camundongos BALB/c e C57BL/6 (mais e menos suscetível respectivamente). Além disso, a microbiota intestinal foi descrita como protetora contra a infecção IG (18, 218, 223).

D’Orazio discute que a questão da inoculação IG pode promover diferentes resultados no que diz respeito à disseminação bacteriana. Alguns autores mostram

que *L. monocytogenes* alcança o baço e o fígado em 4h, mas outros não observaram disseminação sistêmica após 48h (218). Ghanem e colaboradores desenvolveram um modelo de infecção oral por ingestão de pão contaminado, utilizando uma cepa murinizada, *L. monocytogenes-InlA^m*, e detectaram carga bacteriana nos intestino e posterior disseminação para o baço e o fígado (220). Entretanto, a disseminação para tecidos adjacentes à cavidade oral não foram estudados anteriormente. Nesse trabalho, demonstramos que a bactéria é capaz de alcançar os mLN dentro de 20h pós-infecção, em vez do mLNs (Figura 5.9). Em contraste, a infecção IV, como esperado promove tropismo preferencial para o baço. Interessantemente, um relato clínico na literatura demonstrou um caso de linfadenite com presença de *L. monocytogenes* em secções histológicas do linfonodo cervical de um paciente (245). Estes dados corroboram a importância de considerar que esses patógenos são capazes de atravessar a barreira da mucosa oral antes de alcançar o intestino em infecções oralmente adquiridas. Em contraste, infecção IV com doses mais altas de Lm selvagem (5×10^5 CFU de EGDe) também permite a detecção da bactéria em linfoides cervicais em menor proporção em comparação com o baço (246).

Duas proteínas de invasão celular estão envolvidas na entrada de *L. monocytogenes* em células não fagocíticas, InlA e InlB (247). InlA liga-se à E-caderina humana, promovendo a invasão de células epiteliais (248, 249), enquanto InlB reconhece receptores HGF ou Met, tanto murino quanto humano, em diversos tipos celulares de mamíferos, como hepatócitos e células endoteliais (185, 186). Entretanto, apesar da E-caderina humana e murina possuirem 90% de identidade, InlA liga-se fracamente à molécula de origem murina (193). A fim de otimizar o modelo murino de infecção oral, foi desenvolvida uma cepa geneticamente modificada expressando InlA que reconhece E-caderina de camundongo com alta afinidade, conhecida como murinizada (*L. monocytogenes-InlA^m*) (194). Nesse trabalho, utilizamos uma cepa expressando OVA (*L. monocytogenes-OVA*) e InlA selvagem. Apesar da invasão celular mediada por InlA ser mais rápida, também é capaz de utilizar vias alternativas, como a passagem por células M para translocar através da mucosa intestinal (250). Uma vez nas placas de Peyer (PP), ambas as cepas selvagem e murinizada provavelmente são capturadas por macrófagos independentemente de InlA/B, e em seguida, essas células migram para os mLN e sangue (194). Células dendríticas CD8α⁺ também estão envolvidas na disseminação

de *L. monocytogenes* para o baço de forma independente de internalinas (251). Considerando que nosso objetivo é investigar a importância do contato da bactéria com a cavidade oral, vale ressaltar que este ambiente é rico em diferentes populações de DCs e sua capacidade migratória poderia auxiliar a disseminação através do sistema linfático, incluindo linfonodos drenantes da cavidade oral (27, 252-254). Portanto, mesmo na ausência do ligante de alta afinidade de E-caderina, *L. monocytogenes* é capaz de atravessar a barreira da mucosa oral e alcançar os mandLN como foi observado. Além disso, até mesmo cepas deficientes de InLA estabelecem infecção intestinal após infecção por alimento contaminado (220). Após 60-72h de infecção oral ou IG, em contraste à *L. monocytogenes*-InLA^m, a cepa selvagem (InLA de baixa afinidade) começa a ser eliminada (194). Essa cepa murinizada pode também aumentar a disseminação a partir do intestino para os mLNs, mas esse processo não é exclusivamente dependente de InLA (220). Interessantemente, as cepas selvagem e murinizada podem apresentar diferentes níveis intracelulares, mas a maioria ainda é encontrada no meio extracelular em mLNs (221). Estudos epidemiológicos demonstraram que carreadores assintomáticos e produtos alimentares estão associados cepas com InLA truncada ou secretada, enquanto em pacientes, InLA completa é mais frequente, sugerindo uma correlação entre essa molécula e a virulência de *L. monocytogenes* (195, 196).

Após infecção IG, altas frequências de linfócitos T CD8⁺ LLO-específicos são detectadas na lâmina própria dos intestinos, enquanto após IV, no fígado e baço. Dentro da população de linfócitos intraepiteliais dos intestinos, PP e mLNs, células específicas são menos abundantes independentemente da via de infecção em camundongos BALB/c (223). A infecção oral por *L. monocytogenes* também promove robusta expansão de linfócitos T CD8⁺ endógenos antígeno-específicos sistemicamente e nos compartimentos da lâmina própria e intraepitelial. Além disso, a remoção do baço não afeta a resposta, sugerindo que este órgão não seja essencial para a ativação inicial após infecção oral, mas sim os mLNs (201). Nossos resultados sugerem que na verdade, os mandLN são o principal sítio de expansão de linfócitos antígeno-específicos após infecção oral por *L. monocytogenes*-OVA, em vez dos mLNs e baço. Além disso, os dados sugerem uma expansão de OT-I que foi acompanhada por uma tendência de aumento na expressão de marcadores de ativação recente, CD25 e CD69, nos mandLN (Figura 5.11; Figura 5.13). Interessantemente, um modelo experimental de infecção intrabucal (injeção na base

do vestíbulo mandibular anterior) com *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria gram-negativa que causa periodontite, demonstrou o envolvimento dos linfonodos submandibulares. Após reestimulação específica *in vitro*, células T provenientes desses linfonodos de camundongos infectados eram capazes de produzir elevados níveis de IFN- γ e IL-17 (255).

A eliminação de patógenos é seguida pela formação de populações de memória distintas, incluindo linfócitos T CD8 $^{+}$. Essas populações apresentam propriedades e localizações definidas, e são capazes de responder rapidamente a um segundo desafio. As células T de memória central (“Central memory”, T_{CM}) residem em tecidos linfoideos, enquanto as de memória efetora e uma subpopulação associada, as residentes de memória (“Resident memory”, T_{RM}) são principalmente encontradas em tecidos periféricos não linfoideos (10, 16, 256, 257). Nossos dados mostraram uma tendência de aumento em números absolutos de precursores de T_{CM} (CD44^{high}CD62L^{high}) em todos os órgãos após infecção oral, enquanto IV, apenas no baço. Células efetoras precursoras de memória (“Memory precursor effector cells”, MPEC) e efetoras de vida curta (“Short-lived effector cells”, SLEC) representadas em conjunto na população CD44^{high}CD62L^{low} foram detectadas nos mandLNs, mLNs e baço, mas após infecção IV, principalmente no baço (Figura 5.14; Figura 5.15).

Sheridan e colaboradores demonstraram que após infecção oral com Lm-InIA^m há uma rápida formação de linfócitos T CD8 $^{+}$ KLRG1 $^{-}$ CD127 $^{+}$ intestinais (MPECs). Essas células aumentam preferencialmente a expressão de CD103 e CD69 e sobreveem a longo prazo, corroborando o conceito de que T_{RM}, caracterizada pela expressão dessas moléculas, podem ser derivadas de MPECs infiltrantes no início da resposta. As T_{RM} intestinais são essenciais para proteção ótima contra a bactéria nesse modelo, uma vez que há uma elevada expressão de $\alpha 4\beta 7$ e seu bloqueio sistêmico aumenta a carga bacteriana no fígado e mLNs. Em contraste, linfócitos T CD8 $^{+}$ KLRG1 $^{+}$ CD127 $^{-}$ (SLECs) entram em apoptose no intestino. Apesar dos níveis similares no início da infecção, MPECs aumentam e SLECs diminuem ao longo do tempo (201). Em vez do intestino, avaliamos os mandLNs, mLNs e baço. Nossos resultados mostraram que MPECs e SLECs foram principalmente detectadas no baço independente da via de infecção, mas também em menor proporção nos mandLN após infecção oral.

As infecções IO e IV foram realizadas com inóculos diferentes devido a maior letalidade pela via IV, portanto não comparamos numericamente os dados entre as duas vias. No entanto, mesmo com menor inóculo, a infecção IV induziu intensa resposta (tendência de aumento de celularidade e números de OT-I) no baço semelhante à infecção oral. Dessa forma, a via IV representa um bom controle positivo da infecção. Os resultados sugerem que a infecção oral, que representa melhor a via natural de transmissão, promove intensa resposta principalmente nos mandLN, enquanto IV pouco afeta os mandLN. Interessantemente, o bloqueio da entrada e saída de linfócitos dos órgãos linfoides através do tratamento com MEL-14 e FTY720 demonstrou uma tendência mais evidente nesses perfis (Figura 5.16; Figura 5.17).

Estudos anteriores abordaram a preparação dos linfondos cervicais em camundongos para avaliar hemodinâmica e interações linfócitos-HEV (Vênulas de endotélio alto) através de microscopia de fluorescência intravital (9). De forma semelhante, demonstramos a área de drenagem dos mandLN e padronizamos a cirurgia para exposição dos mesmos como uma ferramenta para avaliar o comportamento em condições homeostáticas e na imunidade adaptativa utilizando o modelo de infecção oral por *L. monocytogenes*. Nossos resultados relacionados à velocidade de células T em torno de 15 µm/min em condições homeostáticas estão de acordo com a literatura (258).

Diferenças na nomenclatura anatômica na literatura dificultam comparações. Nesse trabalho, utilizamos a nomenclatura proposta por Van den Broeck e colaboradores, que descreve principalmente 4 grupos de linfonodos na região do pescoço: mandibular, mandibular acessório, parótido superficial e cranial profundo (12). Nossos experimentos foram realizados com os linfonodos mandibulares e mandibulares acessórios, aqui identificados genericamente como mandLN.

O presente trabalho apresenta dados inovadores mostrando a importância do contato do patógeno com a mucosa oral e considerando os linfonodos mandibulares como um importante sítio de disseminação de Lm e ativação inicial da resposta imune após infecção oral em camundongos. Além disso, apresentamos um modelo apropriado para imageamento intravital da resposta de linfócitos T CD8⁺ T em linfonodos drenantes da cavidade oral após infecção oral (Figura 5.18; Figura 5.19).

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conclusões parciais:

- Nossos resultados demonstraram que as diferenças de infectividade e parasitemia após a infecção IG e IO pelo *T. cruzi* observadas anteriormente, no nosso modelo, não podem ser atribuídas a um efeito deletério do pH gástrico.
- O grupo IO apresentou hepatite mais intensa que o grupo IG, e ambos os grupos apresentaram composição de infiltrado inflamatório semelhante, presença de morte celular e deposição de colágeno tanto no coração como no fígado. No coração houve uma maior detecção de expressão gênica de citocinas no grupo IO em relação ao IG.
- Os macrófagos foram identificados como a principal fonte tecidual de TNF- α , e os elevados níveis séricos dessa citocina estavam relacionados à morte dos camundongos IO.
- Após a infecção na cavidade oral por *L. monocytogenes*, houve uma detecção da bactéria nos mandLN e os dados sugerem que esse seja o local prefencial de ativação da resposta de células T CD8 antígeno-específicas.
- Nesse trabalho foi padronizada a cirurgia para exposição dos mandLN que permitiu uma preparação estável para visualização intravital de células antígeno-específicas.

Conclusão final:

Nossos dados demonstraram que a passagem do patógeno pela a cavidade oral inflencia a parasitemia, mortalidade, comprometimento de órgãos alvo e perfil de citocinas, e os elevados níveis de TNF- α observados após a infecção oral estão associados à alta mortalidade. Além disso, os dados sugerem que há um direcionamento inicial do patógeno para os linfonodos mandibulares, onde ocorre preferencialmente a ativação da resposta de células T CD8 antígeno-específicas.

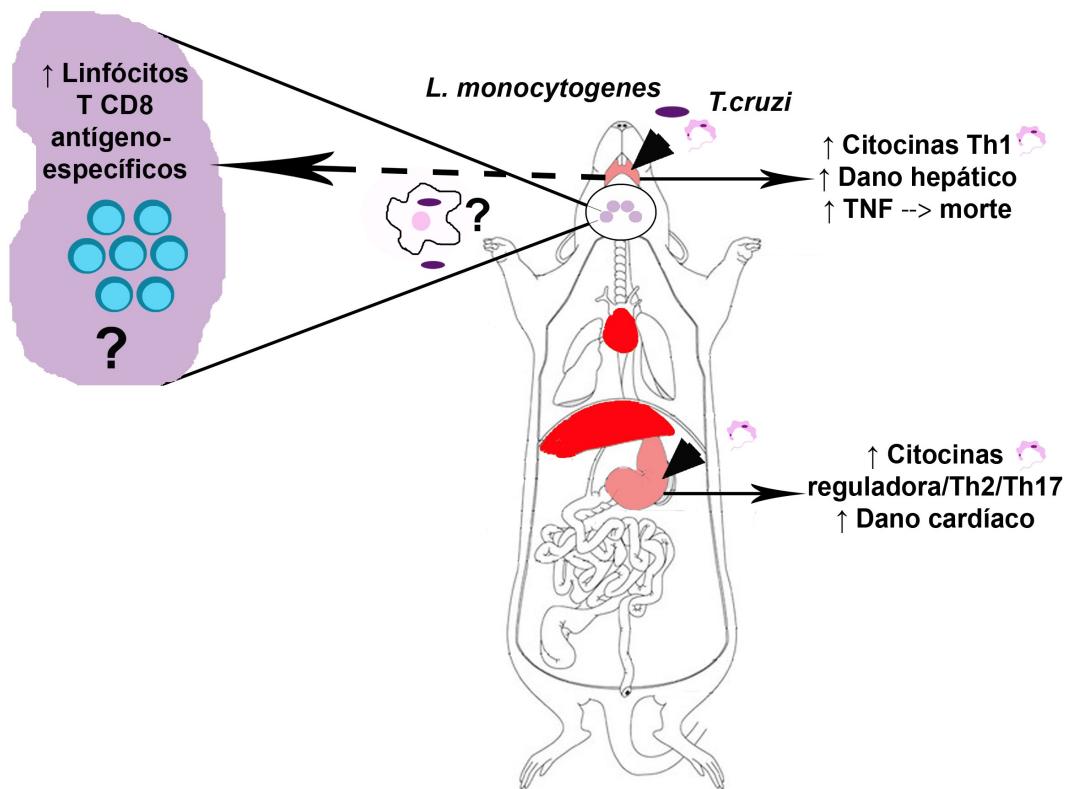


Figura 7.1 Infecção oral pelo *T. cruzi* e *L. monocytogenes*.

O esquema representa o desfecho da infecção por diferentes portas de entrada (rosa). A entrada do *T. cruzi* pela cavidade oral (IO) ou diretamente no estômago (IG) promove diferenças com relação a órgãos alvo (vermelho) e resposta imune. A infecção IO desencadeia maiores níveis séricos de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF- α), dano hepático e os elevados níveis de TNF- α circulante estão envolvidos com a morte. Já a Infecção IG leva a maior detecção de citocinas reguladoras/Th2/Th17 (TGF- β , IL-4 e IL-17) e maior dano cardíaco. Após inoculação de *L. monocytogenes* na cavidade oral, a bactéria é capaz de alcançar os linfonodos mandibulares (lilás) e possivelmente promove a expansão de linfócitos T CD8 antígeno-específicos. No entanto, não se sabe se a bactéria chega aos linfonodos livremente ou transportada por fagócitos. Adaptado de (120).

Como perspectivas, pretendemos:

- Avaliar a resposta imune específica ao *T. cruzi* nos mandLNs;
- Avaliar por bioluminescência a cinética de infecção e selecionar momentos específicos para análise individual de determinados órgãos após a infecção oral por *L. monocytogenes*;
- Padronizar protocolo de visualização por 2PM de migração de células efetoras antígeno-específicas na região mandibular após a infecção oral por *L. monocytogenes*;
- Visualizar *L. monocytogenes*-InIA^m-OVA-RFP em diferentes órgãos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol.* 2004 Nov;25(11):570-7.
2. Craig SW, Cebra JJ. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med.* 1971 Jul 01;134(1):188-200.
3. McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J Exp Med.* 1977 Apr 01;145(4):866-75.
4. Cornes JS. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut.* 1965 Jun;6(3):225-9.
5. Smith PD, MacDonald TT, Blumberg RS. Principles of Mucosal Immunology Garland Science; 2013.
6. Pabst R. Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? *Immunol Lett.* 2007 Sep 15;112(1):1-8.
7. Newberry RD, Lorenz RG. Organizing a mucosal defense. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:6-21.
8. Yasuda M, Jenne CN, Kennedy LJ, Reynolds JD. The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development. *Vet Res.* 2006 May-Jun;37(3):401-15.
9. Schramm R, Schafers HJ, Harder Y, Schmits R, Thorlacius H, Menger MD. The cervical lymph node preparation: a novel approach to study lymphocyte homing by intravital microscopy. *Inflamm Res.* 2006 Apr;55(4):160-7.
10. Schenkel JM, Fraser KA, Vezys V, Masopust D. Sensing and alarm function of resident memory CD8(+) T cells. *Nat Immunol.* 2013 May;14(5):509-13.
11. Chabot S, Wagner JS, Farrant S, Neutra MR. TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium. *J Immunol.* 2006 Apr 1;176(7):4275-83.
12. Van den Broeck W, Derore A, Simoens P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J Immunol Methods.* 2006 May 30;312(1-2):12-9.
13. Mach J, Hsieh T, Hsieh D, Grubbs N, Chervonsky A. Development of intestinal M cells. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:177-89.
14. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2011 May;9(5):356-68.
15. Elphick DA, Mahida YR. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut.* 2005 Dec;54(12):1802-9.
16. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol.* 2009 May;10(5):524-30.
17. Ariotti S, Haanen JB, Schumacher TN. Behavior and function of tissue-resident memory T cells. *Adv Immunol.* 2012;114:203-16.
18. Archambaud C, Sismeiro O, Toedling J, Soubigou G, Becavin C, Lechat P, et al. The intestinal microbiota interferes with the microRNA response upon oral *Listeria* infection. *MBio.* 2013 Dec 10;4(6):e00707-13.
19. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol.* 2006 Jun-Dec;13(2-4):143-57.
20. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2011 May;241(1):241-59.
21. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):725-31.

22. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):671-2.
23. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* 2007 Aug 06;204(8):1757-64.
24. Yang R, Liu Q, Grosfeld JL, Pescovitz MD. Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg.* 1994 Aug;29(8):1145-8.
25. Limmer A, Ohl J, Wingender G, Berg M, Jungerkes F, Schumak B, et al. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol.* 2005 Oct;35(10):2970-81.
26. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 2012 May;5(3):232-9.
27. Novak N, Haberstok J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med.* 2008 May;14(5):191-8.
28. Walker DM. Oral mucosal immunology: an overview. *Ann Acad Med Singapore.* 2004 Jul;33(4 Suppl):27-30.
29. Feller L, Altini M, Khammissa RA, Chandran R, Bouckaert M, Lemmer J. Oral mucosal immunity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013 Nov;116(5):576-83.
30. Fabian TK, Hermann P, Beck A, Fejerdy P, Fabian G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4295-320.
31. Fabian TK, Fejerdy P, Csermely P. Salivary Genomics, Transcriptomics and Proteomics: The Emerging Concept of the Oral Ecosystem and their Use in the Early Diagnosis of Cancer and other Diseases. *Curr Genomics.* 2008 Mar;9(1):11-21.
32. Brandtzaeg P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar;1098:288-311.
33. Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2004;35:135-57.
34. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Perez AR, Berbert LR, de Santana-van-Vliet E, Farias-de-Oliveira DA, 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 Jun;9(6):e0003849.
35. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis.* 2013;13:11.
36. Desvignes C, Esteves F, Etchart N, Bella C, Czerninsky C, Kaiserlian D. The murine buccal mucosa is an inductive site for priming class I-restricted CD8+ effector T cells in vivo. *Clin Exp Immunol.* 1998 Sep;113(3):386-93.
37. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis), Fact Sheet. World Health Organization; 2012.
38. PAHO. Quantitative estimation of Chagas disease in the Americas. . Pan American Health Organization (PAHO). 2006:(OPS/HDM/CD/425-06).
39. WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2010:75-81.
40. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010 Jul-Aug;115(1-2):5-13.
41. Milei J, Guerri-Guttenberg RA, Grana DR, Storino R. Prognostic impact of Chagas disease in the United States. *Am Heart J.* 2009 Jan;157(1):22-9.

42. DNDi. Mapa cortesia do "Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases, 2013". Disponível em: <http://wwwdndiorg/diseases-projects/chagas/chagas-disease-background/>. [acesso em 20 mar 2017].
43. Valente V. Potential for domestication of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Lepidoptera, reduviidae, triatominae) in the municipality of Muana, Marajo island, state of Para, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:399-400.
44. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001 Sep;1(2):92-100.
45. Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002 Apr;18(4):171-6.
46. Dias JC, Machado EM, Fernandes AL, Vinhaes MC. [General situation and perspectives of chagas disease in Northeastern Region, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2000;16 Suppl 2:13-34.
47. Gascon J, Albajar P, Canas E, Flores M, Gomez i Prat J, Herrera RN, et al. [Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic]. *Rev Esp Cardiol.* 2007 Mar;60(3):285-93.
48. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2012 Mar;54(6):845-52.
49. Toso MA, Vial UF, Galanti N. [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Med Chil.* 2011 Feb;139(2):258-66.
50. Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Kishino F, Tawara T, Watanabe TM, et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell.* 2014 Apr 24;157(3):726-39.
51. Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol.* 2006 Sep 10;112(1):132-3.
52. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010 Apr 17;375(9723):1388-402.
53. da Silva NN, Clausell DT, Nolibos H, de Mello AL, Ossanai J, Rapone T, et al. [Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1968 Sep-Oct;10(5):265-76.
54. Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 May-Jun;41(3):296-300.
55. Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W. [Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997 Mar-Apr;30(2):139-44.
56. Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, et al. Trypanosoma cruzi in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol.* 2009 Apr;39(5):615-23.
57. Nobrega AA, Garcia MH, Tato E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009 Apr;15(4):653-5.
58. de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(7):e417.
59. Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991 Sep-Oct;33(5):351-7.

60. Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 1991 Sep;7(9):240-4.
61. Rey L. *Bases Da Parasitologia Médica*. ed., editor: Guanabara Koogan. 2002.; 2002.
62. Epting CL, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2010 Nov;126(3):283-91.
63. Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O, et al. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1114-8.
64. Nde PN, Lima MF, Johnson CA, Pratap S, Villalta F. Regulation and use of the extracellular matrix by *Trypanosoma cruzi* during early infection. *Front Immunol*. 2012;3:337.
65. Lecuit M, Vandormael-Pourrin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*. 2001 Jun 01;292(5522):1722-5.
66. Yoshida N, Favoreto S, Jr., Ferreira AT, Manque PM. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Mar;33(3):269-78.
67. Cortez M, Neira I, Ferreira D, Luquetti AO, Rassi A, Atayde VD, et al. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infect Immun*. 2003 Nov;71(11):6184-91.
68. Yoshida N, Cortez M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell Biochem*. 2008;47:82-91.
69. Villalta F, Scharfstein J, Ashton AW, Tyler KM, Guan F, Mukherjee S, et al. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitol Res*. 2009 Jun;104(6):1251-60.
70. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol*. 2009 Nov;31(11):673-85.
71. Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*. 2003 Apr;5(5):419-27.
72. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.
73. Ferreira AV, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, de Oliveira Andrade L, et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect*. 2011 Nov;13(12-13):1002-5.
74. Guarner J, Bartlett J, Zaki SR, Colley DG, Grijalva MJ, Powell MR. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Aug;65(2):152-8.
75. Andrade ZA, Silva HR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995 Jul-Aug;90(4):521-2.
76. Combs TP, Nagajyothi, Mukherjee S, de Almeida CJ, Jelicks LA, Schubert W, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):24085-94.
77. Buckner FS, Wilson AJ, Van Voorhis WC. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase. *Infect Immun*. 1999 Jan;67(1):403-9.
78. 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 Apr;173(1-2):12-22.

79. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(7):e1689.
80. Moreira OC, Ramirez JD, Velazquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* Jan;125(1):23-31.
81. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, 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.
82. Veloso VM, Guedes PM, Andrade IM, Caldas IS, Martins HR, Carneiro CM, et al. *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Sep;103(6):528-34.
83. Guillermo LV, Silva EM, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Pereira WF, Yagita H, et al. The Fas death pathway controls coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol.* 2007 Apr;81(4):942-51.
84. Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun.* 1996 Sep;64(9):3800-10.
85. Cortez M, Silva MR, Neira I, Ferreira D, Sasso GR, Luquetti AO, et al. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect.* 2006 Jan;8(1):36-44.
86. Silva EM, Guillermo LV, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Nunes MP, Senra JF, et al. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol.* 2007 Mar;37(3):738-46.
87. Morocoima A, Rodriguez M, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism of bone and cartilage. *Parasitol Res.* 2006 Nov;99(6):663-8.
88. Baena Teran R, Arancibia A, Basquiera AL, De La Fuente JL, Ricchi B, de Diller AB. *Trypanosoma cruzi* in the bone marrow. *Br J Haematol.* Apr;157(1):1.
89. Da Costa SC, Calabrese KS, Bauer PG, Savino W, Lagrange PH. Studies of the thymus in Chagas' disease: III. Colonization of the thymus and other lymphoid organs of adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathol Biol (Paris).* 1991 Feb;39(2):91-7.
90. Mortara RA, da Silva S, Patrício FR, Higuchi ML, Lopes ER, Gabbai AA, et al. Imaging *Trypanosoma cruzi* within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. *Parasitol Res.* 1999 Oct;85(10):800-8.
91. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 May 25;100(2):163-72.
92. Rachid MA, Teixeira AL, Barcelos LS, Machado CR, Chiari E, Tanowitz HB, et al. Role of endothelin receptors in the control of central nervous system parasitism in *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *J Neuroimmunol.* 2010 Mar 30;220(1-2):64-8.
93. Schijman AG, Vigliano CA, Viotti RJ, Burgos JM, Brandariz S, Lococo BE, et al. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Feb;70(2):210-20.
94. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1805-9.

95. Giddings OK, Eickhoff CS, Smith TJ, Bryant LA, Hoft DF. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. *Infect Immun.* 2006 Oct;74(10):5549-60.
96. Vago AR, Silva DM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, d'Avila Reis D. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaoesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003 May-Jun;97(3):308-9.
97. Staquicini DI, Martins RM, Macedo S, Sasso GR, Atayde VD, Juliano MA, 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.
98. Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int.* 2008 Jun;57(2):105-9.
99. Neira I, Silva FA, Cortez M, Yoshida N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):557-61.
100. Ruiz RC, Favoreto S, Jr., Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J.* 1998 Feb 15;330 (Pt 1):505-11.
101. Dorta ML, Ferreira AT, Oshiro ME, Yoshida N. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 Jul;73(1-2):285-9.
102. Cortez C, Yoshida N, Bahia D, Sobreira TJ. 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.
103. Malaga S, Yoshida N. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun.* 2001 Jan;69(1):353-9.
104. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003 Oct 15;60(1):96-107.
105. Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J.* 2006 Dec;82(974):788-98.
106. Tanowitz HB, Gumprecht JP, Spurr D, Calderon TM, Ventura MC, Raventos-Suarez C, et al. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis.* 1992 Sep;166(3):598-603.
107. Luppi P, Rudert WA, Zanone MM, Stassi G, Trucco G, Finegold D, et al. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen-driven autoimmune disease. *Circulation.* 1998 Aug 25;98(8):777-85.
108. Bouzahzah B, Nagajyothi F, Desrusseaux MS, Krishnamachary M, Factor SM, Cohen AW, et al. Cell cycle regulatory proteins in the liver in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Cycle.* 2006 Oct;5(20):2396-400.
109. Ronco MT, Frances DE, Ingaramo PI, Quiroga AD, Alvarez ML, Pisani GB, et al. Tumor necrosis factor alpha induced by *Trypanosoma cruzi* infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice. *Cytokine.* 2010 Jan;49(1):64-72.
110. Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Imperio Lima MR, et al. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2006 Apr;74(4):2031-42.
111. Kierszenbaum F, Sztein MB. Mechanisms underlying immunosuppression induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 1990 Aug;6(8):261-4.

112. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 2006 Jul;145(1):81-92.
113. Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 2007 Feb 14;115(3):279-83.
114. Braz LM, Amato Neto V, Okay TS. Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008 Jan-Feb;50(1):65-6.
115. Pinto AY, Valente Vda C, Coura JR, Valente SA, Junqueira AC, Santos LC, et al. Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazole in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. *PLoS One.* 2013;8(5):e64450.
116. Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa Cesar M, dos Santos MP, Miranda CO, et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Mar;103(3):291-7.
117. Morillo CA, Marin-Neto JA, 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 Oct;373(14):1295-306.
118. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003 Mar;71(3):1185-93.
119. Reis DD, Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Colley DG. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. *J Immunol.* 1993 Feb 15;150(4):1611-8.
120. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 2001 Aug;17(1):99-107.
121. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun.* 2005 Dec;73(12):7960-6.
122. Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, Luz ZM, et al. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res.* 1998 Jan;31(1):127-31.
123. Correa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:253-5.
124. Ribeirao M, Pereira-Chioccola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol.* 2000 Jan;22(1):49-53.
125. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 2006 Feb;39(1):41-54.
126. Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC, et al. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scand J Immunol.* 2007 Aug-Sep;66(2-3):362-71.
127. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenutti L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a

- molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 2005 Aug;167(2):305-13.
128. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2005 Sep;62(3):297-308.
129. Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM, et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1630.
130. Watthanakulpanich D, Smith HV, Hobbs G, Whalley AJ, Billington D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. *Acta Trop.* 2008 May;106(2):90-5.
131. Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol.* 1986 Dec;24(6):661-8.
132. d'Imperio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol.* 1986 Jul 1;137(1):353-6.
133. Minoprio PM, Coutinho A, Joskowicz M, D'Imperio Lima MR, Eisen H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 1986 Dec;24(6):669-79.
134. Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol.* 1988 Apr 15;140(8):2769-73.
135. DosReis GA, Lopes MF. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:259-62.
136. Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol.* 1996 Nov;84(2):231-44.
137. Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Padua MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Jan;31(1):111-5.
138. Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS. 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 Aug;67(8):3864-71.
139. Chandra M, Tanowitz HB, Petkova SB, Huang H, Weiss LM, Wittner M, et al. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Int J Parasitol.* 2002 Jun 15;32(7):897-905.
140. Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 2001 Apr;158(4):1433-40.
141. Bilate AM, Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008 Mar-Apr;50(2):67-74.
142. Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):4075-83.

143. Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med.* 1991 Sep 1;174(3):539-45.
144. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 1994 Oct 1;153(7):3135-40.
145. Waghabi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazare CSM, Mendonca-Lima L, et al. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Aug;51(8):2905-10.
146. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, 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.
147. Devera R, Fernandes O, Coura JR. 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 Jan;98(1):1-12.
148. Spinella S, Liegeard P, Hontebeyrie-Joskowicz M. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. *Exp Parasitol.* 1992 Feb;74(1):46-56.
149. el Bouhdidi A, Truyens C, Rivera MT, Bazin H, Carlier Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies. *Parasite Immunol.* 1994 Feb;16(2):69-76.
150. Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol.* 1988 Nov;28(5):553-61.
151. Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1998 May;20(5):207-16.
152. Almeida IC, Milani SR, Gorin PA, Travassos LR. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Immunol.* 1991 Apr 1;146(7):2394-400.
153. Mota I, Umekita LF. The effect of C3 depletion on the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies. *Immunol Lett.* 1989 Jun 1;21(3):223-5.
154. Lima-Martins MV, Sanchez GA, Krettli AU, Brener Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasite Immunol.* 1985 Jul;7(4):367-76.
155. Scott MT, Moyes L. 75Se-methionine labelled *Trypanosoma cruzi* blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. *Clin Exp Immunol.* 1982 Jun;48(3):754-7.
156. Kawano Y, Noma T, Yata J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol.* 1994 Dec 1;153(11):4948-58.
157. Briere F, Servet-Delprat C, Bridon JM, Saint-Remy JM, Banchereau J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (slgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med.* 1994 Feb 1;179(2):757-62.
158. Murphy KP. *Janeway's Immunobiology*: Garland Science; 2012.

159. Spinella S, Milon G, Hontebeyrie-Joskowicz M. A CD4+ TH2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response in vivo. *Eur J Immunol.* 1990 May;20(5):1045-51.
160. Minoprio P, Bandeira A, Pereira P, Mota Santos T, Coutinho A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. *Int Immunol.* 1989;1(2):176-84.
161. de Meis J, Mendes-da-Cruz DA, Farias-de-Oliveira DA, Correa-de-Santana E, Pinto-Mariz F, Cotta-de-Almeida V, et al. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. *Microbes Infect.* 2006 Jan;8(1):221-31.
162. Antunez MI, Feinstein RE, Cardoni RL, Gronvik KO. *Trypanosoma cruzi*: T cell subpopulations in the Peyer's patches of BALB/c infected mice. *Exp Parasitol.* 1997 Sep;87(1):58-64.
163. de Meis J, Ferreira LM, Guillermo LV, Silva EM, Dosreis GA, Lopes MF. Apoptosis differentially regulates mesenteric and subcutaneous lymph node immune responses to *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol.* 2008 Jan;38(1):139-46.
164. Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today.* 1999 Mar;15(3):94-9.
165. Minoprio P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6):588-91.
166. Girones N, Rodriguez CI, Basso B, Bellon JM, Resino S, Munoz-Fernandez MA, et al. Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Nov;8(6):1039-43.
167. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Russo M, Fonseca SG, et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007 Jul;9(9):1104-13.
168. Kirchhoff LV, Hoft DF. Immunization and challenge of mice with insect-derived metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1990 Jan;12(1):65-74.
169. Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002 Mar-Apr;44(2):97-103.
170. Collins MH, Craft JM, Bustamante JM, Tarleton RL. Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8(+) T cell response and protection against heterotopic challenge. *Infect Immun.* 2011 Aug;79(8):3397-406.
171. Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:101-7.
172. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends Tcl to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Nov;104(7):1051-4.
173. Rodrigues AA, Notario AF, Teixeira TL, e Silva RT, Quintal AP, Alves RN, et al. A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection. *Acta Trop.* 2016 May;157:42-53.
174. Domingues CS, Hardoim DJ, Souza CS, Cardoso FO, Mendes VG, Previtali-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.
175. Kuehn CC, Oliveira LG, Miranda MA, Prado JC. Distinctive histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal *Trypanosoma cruzi* Y strain infection. *Parasitology.* 2014 Jun;141(7):904-13.

176. Abel LC, Iwai LK, Viviani W, Bilate AM, Fae KC, Ferreira RC, et al. T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes Infect.* 2005 Aug-Sep;7(11-12):1184-95.
177. Williams MA, Schmidt RL, Lenz LL. Early events regulating immunity and pathogenesis during *Listeria monocytogenes* infection. *Trends Immunol.* 2012 Oct;33(10):488-95.
178. Silva-Dos-Santos D, Barreto-de-Albuquerque J, Guerra B, Moreira OC, Berbert LR, Ramos MT, et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Apr;11(4):e0005507.
179. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *J Infect Dis.* 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S18-24.
180. Kumar V, Scandella E, Danuser R, Onder L, Nitschke M, Fukui Y, et al. Global lymphoid tissue remodeling during a viral infection is orchestrated by a B cell-lymphotoxin-dependent pathway. *Blood.* 2010 Jun 10;115(23):4725-33.
181. Marsden PD. *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. II. Infections induced by different routes. *Ann Trop Med Parasitol.* 1967 Mar;61(1):62-7.
182. Abe J, Ozga AJ, Swoger J, Sharpe J, Ripoll J, Stein JV. Light sheet fluorescence microscopy for *in situ* cell interaction analysis in mouse lymph nodes. *J Immunol Methods.* 2016 Apr;431:1-10.
183. Zehn D, Lee SY, Bevan MJ. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature.* 2009 Mar 12;458(7235):211-4.
184. Blaschitz C, Raffatellu M. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J Clin Immunol.* 2010 Mar;30(2):196-203.
185. Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell.* 2000 Oct 27;103(3):501-10.
186. Khelef N, Lecuit M, Bierne H, Cossart P. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol.* 2006 Mar;8(3):457-70.
187. Stavru F, Archambaud C, Cossart P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):160-84.
188. Pizarro-Cerda J, Kuhbacher A, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Nov 01;2(11).
189. Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S, Sansonetti P. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun.* 1987 Nov;55(11):2822-9.
190. Mengaud J, Chenevert J, Geoffroy C, Gaillard JL, Cossart P. Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun.* 1987 Dec;55(12):3225-7.
191. Domann E, Wehland J, Rohde M, Pistor S, Hartl M, Goebel W, et al. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 1992 May;11(5):1981-90.
192. Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, Khun H, Huerre M, Vacher-Lavenu MC, et al. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 20;101(16):6152-7.
193. Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, Fedor-Chaiken M, Gumbiner B, Cossart P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 1999 Jul 15;18(14):3956-63.

194. Wollert T, Pasche B, Rochon M, Deppenmeier S, van den Heuvel J, Gruber AD, et al. Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell*. 2007 Jun 01;129(5):891-902.
195. Olier M, Pierre F, Rousseaux S, Lemaitre JP, Rousset A, Piveteau P, et al. Expression of truncated Internalin A is involved in impaired internalization of some *Listeria monocytogenes* isolates carried asymptotically by humans. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1217-24.
196. Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Martin PM, Cossart P, Lecuit M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis*. 2004 Jun 01;189(11):2094-100.
197. CDC. Centers for Disease Control and Prevention CDC 24 /7: Saving Lives, Protecting People™. 2016.
198. Godshall CE, Suh G, Lorber B. Cutaneous listeriosis. *J Clin Microbiol*. 2013 Nov;51(11):3591-6.
199. McLauchlin J, Low JC. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet Rec*. 1994 Dec 24-31;135(26):615-7.
200. Kursar M, Kohler A, Kaufmann SH, Mittrucker HW. Depletion of CD4+ T cells during immunization with nonviable *Listeria monocytogenes* causes enhanced CD8+ T cell-mediated protection against listeriosis. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):3167-72.
201. Sheridan BS, Pham QM, Lee YT, Cauley LS, Puddington L, Lefrancois L. Oral infection drives a distinct population of intestinal resident memory CD8(+) T cells with enhanced protective function. *Immunity*. 2014 May 15;40(5):747-57.
202. de Noya BA, Gonzalez ON. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop*. 2015 Nov;151:94-102.
203. Mackaness GB. Cellular resistance to infection. *J Exp Med*. 1962 Sep 1;116:381-406.
204. Waite JC, Leiner I, Lauer P, Rae CS, Barbet G, Zheng H, et al. Dynamic imaging of the effector immune response to listeria infection in vivo. *PLoS Pathog*. 2011 Mar;7(3):e1001326.
205. Cabanes D, Lecuit M, Cossart P. Animal models of *Listeria* infection. *Curr Protoc Microbiol*. 2008 Aug;Chapter 9:Unit9B 1.
206. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3725-9.
207. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 2002 Aug;17(2):211-20.
208. Zammit DJ, Cauley LS, Pham QM, Lefrancois L. Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity*. 2005 May;22(5):561-70.
209. Dietrich N, Rohde M, Geffers R, Kroger A, Hauser H, Weiss S, et al. Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 11;107(19):8748-53.
210. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004 Feb;16(1):3-9.
211. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*. 1993 Apr 23;260(5107):547-9.
212. Seaman MS, Wang CR, Forman J. MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2000 Nov 01;165(9):5192-201.

213. Hamada S, Umemura M, Shiono T, Tanaka K, Yahagi A, Begum MD, et al. IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *J Immunol.* 2008 Sep 01;181(5):3456-63.
214. Matsuzaki G, Vordermeier HM, Hashimoto A, Nomoto K, Ivanyi J. The role of B cells in the establishment of T cell response in mice infected with an intracellular bacteria, *Listeria monocytogenes*. *Cell Immunol.* 1999 Jun 15;194(2):178-85.
215. Shen H, Whitmire JK, Fan X, Shedlock DJ, Kaech SM, Ahmed R. A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*. *J Immunol.* 2003 Feb 01;170(3):1443-51.
216. Edelson BT, Cossart P, Unanue ER. Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J Immunol.* 1999 Oct 15;163(8):4087-90.
217. Edelson BT, Unanue ER. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity.* 2001 May;14(5):503-12.
218. D'Orazio SE. Animal models for oral transmission of *Listeria monocytogenes*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:15.
219. Miller JK, Burns J. Histopathology of *Listeria monocytogenes* after oral feeding to mice. *Appl Microbiol.* 1970 May;19(5):772-5.
220. Bou Ghanem EN, Jones GS, Myers-Morales T, Patil PD, Hidayatullah AN, D'Orazio SE. InIA promotes dissemination of *Listeria monocytogenes* to the mesenteric lymph nodes during food borne infection of mice. *PLoS Pathog.* 2012;8(11):e1003015.
221. Jones GS, Bussell KM, Myers-Morales T, Fieldhouse AM, Bou Ghanem EN, D'Orazio SE. Intracellular *Listeria monocytogenes* comprises a minimal but vital fraction of the intestinal burden following foodborne infection. *Infect Immun.* 2015 Aug;83(8):3146-56.
222. Kursar M, Bonhagen K, Kohler A, Kamradt T, Kaufmann SH, Mittrucker HW. Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):6382-7.
223. Kursar M, Bonhagen K, Kohler A, Kamradt T, Kaufmann SH, Mittrucker HW. Antigen-specific CD8+ T cell responses in intestinal tissues during murine listeriosis. *Microbes Infect.* 2004 Jan;6(1):8-16.
224. Sheridan BS, Romagnoli PA, Pham QM, Fu HH, Alonzo F, 3rd, Schubert WD, et al. gammadelta T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues. *Immunity.* 2013 Jul 25;39(1):184-95.
225. Araújo-Jorge T, Castro S. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal: Editora Fiocruz; 2000.
226. Ribeiro-Romao RP, Saavedra AF, Da-Cruz AM, Pinto EF, Moreira OC. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors.* 2016 Jun 27;9(1):361.
227. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
228. Nauli AM, Nauli SM. Intestinal transport as a potential determinant of drug bioavailability. *Curr Clin Pharmacol.* 2013 Aug;8(3):247-55.
229. Sardinha LR, Mosca T, Elias RM, do Nascimento RS, Goncalves LA, Bucci DZ, et al. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(1):e578.

230. de Meis J, Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, 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. *Frontiers in Immunology*. 2013 Jul;4(216):1-7.
231. Caradonna K, Pereiraperrin M. Preferential brain homing following intranasal administration of Trypanosoma cruzi. *Infect Immun*. 2009 Apr;77(4):1349-56.
232. Eickhoff CS, Dunn BA, Sullivan NL, Hoft DF. Comparison of the infectivity of Trypanosoma cruzi insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013 Jun;108(4):508-11.
233. Dias GB, Gruendling AP, Araujo SM, Gomes ML, Toledo MJ. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of Trypanosoma cruzi I and II. *Exp Parasitol*. 2013 Nov;135(3):511-7.
234. McHardy N, Neal RA. A comparison of challenge with Trypanosoma cruzi blood-stream trypomastigotes and metacyclic trypomastigotes from Rhodnius prolixus in mice immunized with killed antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979;73(4):409-14.
235. Coura JR. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39 Suppl 3:113-7.
236. Pereira KS, Schmidt FL, Barbosa RL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, et al. Transmission of chagas disease (American trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr Res*. 2010;59:63-85.
237. 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 Dec;37(14):1609-16.
238. Watanabe T, Katsukura H, Shirai Y, Yamori M, Nishi T, Chiba T, et al. A liver tolerates a portal antigen by generating CD11c+ cells, which select Fas ligand+ Th2 cells via apoptosis. *Hepatology*. 2003 Aug;38(2):403-12.
239. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:252-8.
240. Andrade SG, Magalhaes Ldos A, Pessina DH. 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 Feb;103(1):21-6.
241. Hu W, Pasare C. Location, location, location: tissue-specific regulation of immune responses. *J Leukoc Biol*. 2013 Sep;94(3):409-21.
242. Rodriguez-Angulo H, Thomas LE, Castillo E, Cardenas E, Mogollon F, Mijares A. Role of TNF in sickness behavior and allodynia during the acute phase of Chagas' disease. *Exp Parasitol*. 2013 Aug;134(4):422-9.
243. Pinto AY, Ferreira AG, Jr., Valente Vda C, Harada GS, Valente SA. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica*. 2009 Jan;25(1):77-83.
244. Moingeon P, Mascarell L. Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:623474.
245. Rosenthal R, Vogelbach P, Gasser M, Zimmerli W. Cervical lymphadenitis--a rare case of focal listeriosis. *Infection*. 2001 May-Jun;29(3):170-2.
246. Solodova E, Jablonska J, Weiss S, Lienenklau S. Production of IFN-beta during Listeria monocytogenes infection is restricted to monocyte/macrophage lineage. *PLoS One*. 2011 Apr 11;6(4):e18543.

247. Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 2003 Jan;13(1):23-31.
248. Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell.* 1991 Jun 28;65(7):1127-41.
249. Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell.* 1996 Mar 22;84(6):923-32.
250. Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, et al. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 20;101(16):6110-5.
251. Neuenhahn M, Kerksiek KM, Nauerth M, Suhre MH, Schiemann M, Gebhardt FE, et al. CD8alpha⁺ dendritic cells are required for efficient entry of *Listeria monocytogenes* into the spleen. *Immunity.* 2006 Oct;25(4):619-30.
252. Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Berche P, Milon G, Geissmann F, et al. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol.* 2001 May;3(5):331-40.
253. Westcott MM, Henry CJ, Cook AS, Grant KW, Hiltbold EM. Differential susceptibility of bone marrow-derived dendritic cells and macrophages to productive infection with *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* 2007 Jun;9(6):1397-411.
254. Chalermsarp N, Azuma M. Identification of three distinct subsets of migrating dendritic cells from oral mucosa within the regional lymph nodes. *Immunology.* 2009 Aug;127(4):558-66.
255. Monteiro AC, Scovino A, Raposo S, Gaze VM, Cruz C, Svensjo E, et al. Kinin danger signals proteolytically released by gingipain induce Fimbriae-specific IFN-gamma- and IL-17-producing T cells in mice infected intramucosally with *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol.* 2009 Sep 15;183(6):3700-11.
256. Gebhardt T, Whitney PG, Zaid A, Mackay LK, Brooks AG, Heath WR, et al. Different patterns of peripheral migration by memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Nature.* 2011 Aug 14;477(7363):216-9.
257. Ariotti S, Beltman JB, Chodaczek G, Hoekstra ME, van Beek AE, Gomez-Eerland R, et al. Tissue-resident memory CD8⁺ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Nov 27;109(48):19739-44.
258. Soriano SF, Hons M, Schumann K, Kumar V, Dennier TJ, Lyck R, et al. In vivo analysis of uropod function during physiological T cell trafficking. *J Immunol.* 2011 Sep 01;187(5):2356-64.

9 ANEXOS

9.1 Anexo I

Sequências dos iniciadores para cada alvo avaliado

Alvo (RNAm)	Senso	Não senso	Fabricante	Ciclagem da PCR	Concentração
IL-10	ATGGCCTTGTAGAC ACCTTG	GCTATCGATTCTCCC CTGTG	IDT (NM_010548)	95 °C – 10 min 95 °C – 15s 63 °C – 1min } 40x	300nM
IFN-γ	GCCTAGCTCTGAGA CAATGAACGC	CACCATCCTTTGCC AGTTCCCTCCA	IDT (Este estudo)	95 °C – 10 min 95 °C – 15s 63 °C – 1min } 40x	300nM/300nM
TNF-α	GGCAGAAGAGGCAC TCCCCCA	TGGTGGTTGCTACG ACGTGGG	IDT (Este estudo)	95 °C – 10 min 95 °C – 15s 64 °C – 30s } 40x	100nM/100nM
TGF-β	CCGAATGTCTGACG TATTGAAGA	GCGGACTACTATGCT AAAGAGG	IDT (NM_011577)	95 °C – 10 min 95 °C – 15s 63 °C – 1min } 40x	300nM
HPRT	TCCCAGCGTCGTGA TTAGCGATG	GGCCACAATGTGATG GCCTCCC	Invitrogen (H6995B01/ H6995B02)	95 °C – 10 min 95 °C – 15s 63 °C/64 °C – 1min/30s } 40x	300nM
β-actin	GTCCACACCCGCCA CCAGTCG	ATGCCGGAGCCGTTG TCGAC	Invitrogen (467G05/467G06)	95 °C – 10 min 95 °C – 15s 63 °C/64 °C – 1min/30s } 40x	300nM

*20µL volume final da reação

9.2 Anexo II

Anticorpos utilizados na imunofluorescência.

Especificidade (antígeno)	Especificidade (espécie)	Espécie de origem e isotipo	Concentração estoque	Diluição	Clone	Fabricante
Anticorpos primários						
CD4	Camundongo	Rato, IgG2a, κ	0,5 mg/mL	1:20	H129.19	BD Pharmingen
CD8a	Camundongo	Rato, IgG2a, κ	0,5 mg/mL	1:20	53-6.7	BD Pharmingen
F4/80	Camundongo	Rato, IgG2b	0,1 mg/mL	1:50	Cl:A3-1	Abcam
Ly6G	Camundongo	Rato, κ	0,5 mg/mL	1:50	1A8	BD Pharmingen
TNF alfa	Camundongo /etc	Coelho, IgG	0,2 mg/mL	1:25	Policlonal	Abcam
Anticorpos secundários						
IgG	Rato	Cabra, Alexa Fluor® 488	2 mg/mL	1:400	_____	Invitrogen
IgG	Coelho	Cabra, Alexa Fluor® 546	2 mg/mL	1:400	_____	Invitrogen

Abreviações: Ig, imunoglobulina.

9.3 Anexo III

Produção científica durante o período de doutorado

Artigos publicados:

1. DANIELLE SILVA-DOS-SANTOS, **JULIANA BARRETO-DE-ALBUQUERQUE**, BÁRBARA GUERRA, OTACILIO MOREIRA, LUIZ RICARDO BERBERT, MARIANA TAVARES RAMOS, BARBARA ANGELICA S. MASCARENHAS, CONSTANÇA BRITTO, ALEXANDRE MORROT, DÉA M. SERRA VILLA-VERDE, LUCIANA RIBEIRO GARZZONI, WILSON SAVINO, VINÍCIUS COTTA-DE-ALMEIDA, JULIANA DE MEIS.

'Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues.' PLoS Neglected Tropical Diseases (Online), v.11, p. e0005507, 2017.

2. **BARRETO-DE-ALBUQUERQUE**, J., SILVA-DOS-SANTOS, D., PEREZ, A. R., BERBERT, L.R., SANTANA-VAN-VLIET, E., FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A., MOREIRA, O. C., ROGGERO, E., CARVALHO-PINTO, C.E., JURBERG, J., COTTA-DE-ALMEIDA,V., BOTASSO, O., SAVINO, W., DE MEIS, J.

'*Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: New disease formfrom an old infection?'. PLoS Neglected Tropical Diseases (Online), v.9, p.e0003849, 2015.

3. DE MEIS, J., **BARRETO-DE-ALBUQUERQUE**, J., SANTOS, D. S., FARIAS-DE-OLIVEIRA,D.A., BERBERT, L.R., COTTA-DE-ALMEIDA,V, SAVINO, W.

'*Trypanosoma cruzi* Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice'. Frontiers in Immunology (Online). , v.4, p.1, 2013.

RESEARCH ARTICLE

Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues

Danielle Silva-dos-Santos¹, Juliana Barreto-de-Albuquerque¹, Bárbara Guerra², Otacilio C. Moreira³, Luiz Ricardo Berbert¹, Mariana Tavares Ramos¹, Barbara Angelica S. Mascarenhas¹, Constança Britto³, Alexandre Morrot⁴, Déa M. Serra Villa-Verde¹, Luciana Ribeiro Garzoni⁵, Wilson Savino¹, Vinícius Cotta-de-Almeida¹, Juliana de Meis^{1*}



1 Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, **2** National Center of Structural Biology and Bio-imaging—CENABIO, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratory on Molecular Biology and Endemic Diseases, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Department of Immunology, Microbiology Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Laboratory for Innovations in Therapies, Education and Bioproducts, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

* jdeimeis@ioc.fiocruz.br

OPEN ACCESS

Citation: Silva-dos-Santos D, Barreto-de-Albuquerque J, Guerra B, Moreira OC, Berbert LR, Ramos MT, et al. (2017) Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. PLoS Negl Trop Dis 11(4): e0005507. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507>

Editor: Herbert B. Tanowitz, Yeshiva University Albert Einstein College of Medicine, UNITED STATES

Received: June 9, 2016

Accepted: March 20, 2017

Published: April 5, 2017

Copyright: © 2017 Silva-dos-Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by the Rio de Janeiro State Science Foundation (FAPERJ) and the Brazilian National Research Council (CNPq). Grant numbers: FAPERJ: E-26/010.001561/2014; E-26/110.135/2014; E-26/110.042/2014. CNPq:

Abstract

Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, is the most important route of infection in Brazilian Amazon and Venezuela. Other South American countries have also reported outbreaks associated with food consumption. A recent study showed the importance of parasite contact with oral cavity to induce a highly severe acute disease in mice. However, it remains uncertain the primary site of parasite entry and multiplication due to an oral infection. Here, we evaluated the presence of *T. cruzi* Dm28c luciferase (Dm28c-luc) parasites in orally infected mice, by bioluminescence and quantitative real-time PCR. *In vivo* bioluminescent images indicated the nasomaxillary region as the site of parasite invasion in the host, becoming consistently infected throughout the acute phase. At later moments, 7 and 21 days post-infection (dpi), luminescent signal is denser in the thorax, abdomen and genital region, because of parasite dissemination in different tissues. *Ex vivo* analysis demonstrated that the nasomaxillary region, heart, mandibular lymph nodes, liver, spleen, brain, epididymal fat associated to male sex organs, salivary glands, cheek muscle, mesenteric fat and lymph nodes, stomach, esophagus, small and large intestine are target tissues at latter moments of infection. In the same line, amastigote nests of Dm28c GFP *T. cruzi* were detected in the nasal cavity of 6 dpi mice. Parasite quantification by real-time qPCR at 7 and 21 dpi showed predominant *T. cruzi* detection and expansion in mouse nasal cavity. Moreover, *T. cruzi* DNA was also observed in the mandibular lymph nodes, pituitary gland, heart, liver, small intestine and spleen at 7 dpi, and further, disseminated to other tissues, such as the brain, stomach, esophagus and large intestine at 21 dpi. Our results clearly demonstrated that oral cavity and adjacent compartments is the main target region in oral *T. cruzi* infection leading to parasite multiplication at the nasal cavity.

467314/2014-4. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* associated with food/beverage consumption is presently an important route of infection in Brazil and Venezuela. Colombia, Bolivia, Argentina and Ecuador have also reported to have acute cases of Chagas disease transmission through the oral route. Significant studies about this form of *T. cruzi* infection are largely lacking. In addition to the classic cardiac involvement, orally-infected patient progress to a highly symptomatic disease and increased mortality rate (8–35%), surpassing the calculated mortality produced by the disease resulting from the biting of infected insect vectors (5–10%). Here, we explored by in vivo bioluminescent images, qPCR and fluorescence microscopy the primary site of parasite entry and multiplication in oral infection (OI). Our results clearly demonstrated that the oral cavity is the main *T. cruzi* target region in OI, leading to parasite multiplication at the nasal cavity and parasite dissemination to the brain and peripheral tissues. Interestingly, facial edema, paraesthesia of the tongue, gingivitis and dry cough were already described in affected patients. These findings might be associated to our present data, which describe for the first time the nasomaxillary region as the main target tissue following oral *T. cruzi* infection.

Introduction

Human Chagas disease (American trypanosomiasis) is a neglected tropical illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Infection affects 6–8 million people worldwide and is considered a global health problem. Chagas disease is endemic in Mexico, Central America and South America and is also spreading in non-endemic countries through migration of infected people [1]. It can be transmitted by excreta deposition after biting of blood sucking *Triatominae* bugs, blood transfusion; organ transplantation; laboratory accident; congenitally and orally [2, 3].

Outbreaks of oral transmission of Chagas disease were described in Brazil, Venezuela, Colombia, French Guyana, Bolivia, Argentina and Ecuador [4–9]. All of these outbreaks were associated with contaminated food/beverage consumption as wild animal meat, vegetables, sugar cane extract, açaí pulp, guava juice, bacaba, babaçu and vino de palma [10–12]. From 1968 to 2000, 50% of acute cases in Amazon region were attributed to oral transmission [8] and these numbers reached 70% between 2000–2010 [6]. Venezuela has also reported the biggest outbreak described so far, with two distinct occurrences affecting respectively 103 and 88 people. These outbreaks involved adults and children from urban and rural schools [5, 13]. Mortality rate in orally infected patients is reported as higher (8–35%) when compared to the classical vectorial transmission, through triatomine excreta deposition after biting (<5–10%) [14]. It is well known that both trypomastigotes and metacyclic trypomastigotes are associated with oral Chagas transmission [15–17]. Regarding *T. cruzi* genotypes, isolates from DTUs I, II, III, IV and VI have been associated with patients from oral Chagas outbreaks [18–25]. Although relevant, there are few reports about *T. cruzi* oral transmission in the literature. Some authors have demonstrated parasite-mucosa interaction, some aspects of immune response as well as disease outcome after intragastric, pharyngeal or buccal parasite challenge. These models of oral *T. cruzi* infections present both patent parasitemia and heart parasitism, which indicate systemic infection [26–30]. In addition, *T. cruzi* glycoprotein gp82 seems to bind gastric mucin, promoting invasion and replication in epithelial cells from the gastric mucosa [31]. This initial invasion is related to establishment of a progressive gastritis and allows further systemic dissemination of

the parasite. Nonetheless, the short replication period at this mucosal site induces specific immunity, as protection was observed after a secondary mucosal challenge, involving the production of IgA and IgG antibodies [27]. In orally infected mice, inflammatory infiltrates are observed in tissues such as pancreas, spleen, liver, bone marrow, heart, duodenum, adrenal glands, brain and skeletal muscle. Moreover, it was suggested that intraepithelial and lamina propria lymphocytes are involved in IFN- γ but not IL-4 production in orally infected hosts [27]. Following disease outbreaks caused by *T. cruzi* food contamination, a clear increase in severity of clinical manifestations was observed in patients, as compared with other types of transmission routes [8, 14]. These observations raise important questions concerning the particular features of *T. cruzi* entry via the mucosa, including the possible modulation of local immune mechanisms and the impact on regional and systemic immunity [32, 33]. We have recently demonstrated that the site of parasite entrance, through oral infection (OI)—directly in the mouth, as observed in natural infection, or gastrointestinal infection (GI)—directly to the stomach via gavage differentially affects host immune response and mortality. Thus, comparing to GI mice, we observed that OI mice presented elevated infection rate and parasitemia, higher TNF serum levels, more severe hepatitis and milder carditis [15]. This difference in immunological response and infection severity between GI and OI mice raised important questions about the primary site of *T. cruzi* infection by the oral route and its impact on disease progression.

Bioluminescent imaging is a promising technique that brings the opportunity to approach the *in vivo* host-pathogen interactions through a highly sensitive and non-invasive way [34]. In addition to allow the follow up of infection progression by keeping the animal alive, this technique also gives the possibility to observe new sites of infection and parasite distribution that are hardly observed by histological techniques [35]. In the past years, some reports developed *in vivo* bioluminescent analysis both in *T. cruzi* infected mice and in the invertebrate host [35–37]. In the present work, by employing the bioluminescent technique and real-time qPCR, we followed the dynamics of *T. cruzi* Dm28c luciferase (Dm28c-luc) distribution throughout the host using our well-established model of OI in mice [15]. The bioluminescence results indicated the nasal cavity as the main primary site of parasite invasion and multiplication in the host. At later moments, luminescent signal progressively increased in the abdomen and genital region, as a result of parasite dissemination. Quantification of parasite load, via *T. cruzi* satellite DNA (SatDNA) detection by real-time qPCR at 7 and 21 dpi, corroborated the bioluminescence results, showing predominant *T. cruzi* detection in mouse nasal cavity. Parasite amplification was also observed in the mandibular lymph nodes, pituitary gland, heart, liver, small intestine and spleen at 7 dpi, and was disseminated to other tissues, such as the brain, stomach, esophagus and large intestine at 21 dpi. Our results indicate the oral cavity and adjacent tissues as the main target region for oral *T. cruzi* infection, leading to parasite multiplication at the nasal cavity.

Methods

Mice and *Trypanosoma cruzi* infection

Male BALB/c mice, aged 6–8 weeks, were obtained from the animal facility of Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) and used in all experiments. Animals were handled according to the rules of the Ethics Committee for Animal Research of Oswaldo Cruz Foundation. The total number of mice used in each experimental set is described in S1 Fig flowchart. Mice were infected via the oral cavity (OI) with trypomastigotes of a Dm28c (DTU- TcI) genetically modified to express the firefly luciferase (Dm28c-luc), Dm28c-GFP or Tulahuén (DTU- TcVI) strains [35, 38].

Parasites were obtained from infected cultures of a monkey kidney epithelial cell line (Vero cells) from the particular Cell Line Collection of the Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute. *T. cruzi* were counted using Neubauer's chamber in phosphate buffered saline (PBS). Mice were maintained starving for 4 hours and then infected with 1×10^6 trypomastigotes in 50 μL of parasite suspension into the mouth. At the infection moment, mice swallowing time was respected to avoid parasite aspiration.

A control experiment was performed with injection of 50 μL of black ink suspension at the oral cavity or intranasally to validate our protocol of oral infection and to exclude the possibility of an intranasal contamination ([S2 Fig](#)).

Ethics statement

This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation and the Federal Law 11.794 (10/2008). The Institutional Ethics Committee for Animal Research of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA-FIOCRUZ, License: LW-23/12) approved all the procedures used in this study.

Parasitemia

Mouse parasitemia was individually evaluated at different days post-infection (4, 7, 11, 14 and 21 dpi—[S1 Fig](#)) by counting trypomastigotes in 5 μL of tail vessels blood. Blood-parasite number was calculated according to the Brenner method.

In vivo and ex vivo bioluminescence imaging (BLI)

Photoluminescence signals were measured at different time points post-infection (15 and 60 minutes (min), 7 and 21 dpi—[S1 Fig](#)), in anesthetized animal, by ventral and lateral position using the IVIS Lumina image system (Xenogen Corp, CA, EUA). D-luciferin potassium salt (Xenogen) stock solution was prepared in PBS at 15 mg/mL and stored at -80°C.

Analyses of 15 min post-infection imaging were performed with a 5 min pre-incubation of Dm28c-luc with 0.15 mg in PBS (10 μL) of D-luciferin stock solution followed by mouse infection. Photoluminescent images of infected mice were acquired 15 min later.

Images at 60 min post-infection were carried out after intraperitoneal injection of D-luciferin (150 mg/Kg of body weight) followed by an addition of 50 μL of D-luciferin (0.75 mg in PBS) at the oral cavity, just before capturing the images.

At 7 and 21dpi analyses, photoluminescent signals were measured with images starting 15 min after an intraperitoneal injection of D-luciferin solution in potassium salt (150 mg/Kg of body weight).

Mice were placed inside the animal chamber anaesthesia delivery system (Xenogen XGI-8 Gas Anaesthesia system). Isoflurane (1.5%) anaesthesia was applied until the mice became recumbent. These animals were then placed into the image chamber of IVIS Lumina system (Xenogen Corp, CA, USA) and controlled flow of isoflurane, with a nose cone device into the chamber, maintained them anesthetized during the bioluminescence imaging acquisition.

For the analysis of *T. cruzi* presence in specific organs, mice were injected with D-luciferin at different times post-infection ([S1 Fig](#)), and 10 min later mice were euthanized in order to perform single tissue harvest. Tissues were removed, transferred to a culture dish and images acquired at the IVIS Lumina image system.

Acquisition of bioluminescent images of both mice and tissues was performed by 5 min of exposure and the photons emitted from luciferase-expression *T. cruzi* were quantified using the Living Image 3.0 software program.

Ex vivo analysis of parasite nests

Uninfected and six days post infection mice were euthanized, the nasal cavity were isolated and tissue were included in tissue tek (OCT, Sakura, USA). Cryosections (5 µm) of frozen tissues were analyzed using a fluorescent Zeiss microscope (Germany). Images were digitalized using AxioCam HRm and Axio Vision Rel 4.8 software.

DNA extraction from tissues

DNA extraction was performed from nasal cavity, palate, tongue, esophagus, stomach, small intestine, large intestine, liver, heart, spleen, mandibular lymph nodes, pituitary gland and brain, using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, CA). Tissues were obtained from dissected infected mice at different time points (60 min, 7 and 21 dpi), individually weighted (maximum 10 mg for spleen and 30 mg for other tissues was used), washed in PBS (except tissues from nasal cavity, mandibular lymph nodes and pituitary gland) and stored at -20°C until DNA extraction. Blood was drawn via cardiovascular perfusion with PBS, immediately after euthanasia. Nasal cavity tissue was obtained after scraping the region. Tissues and organs from non infected mice were used for negative control. The protocol was carried out according to the manufacturer's instructions and the DNA was eluted with 100 µL of elution buffer (AE). As a qualitative internal reference control, the exogenous internal amplification control (IAC), a pZErO-2 plasmid containing an insert from the *A. thaliana* aquaporin gene, was used as reported by Duffy (2009). Before DNA extraction, 5 µL (40 pg/mL) of linearized IAC were added to the samples. DNAs were stored at -20 °C until use and their purity and concentration were determined using a Nano-drop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) at 260/280 and 260/320 nm.

Quantitative duplex real-time PCR (qPCR)

According to the international consensus for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Chagas disease patients [39], Quantitative Real Time PCR Multiplex assays using TaqMan probes were performed targeting the satellite region of the nuclear DNA (SatDNA) of *T. cruzi* and the exogenous internal amplification control (IAC), as described in Duffy et al, 2009. The qPCR reactions were performed in a final volume of 10 µL containing 1.5 µL of DNA template, 5 µL of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 750 nM of both cruzi1 (5'ASTCGGCTGATCGTTTCGA 3') and cruzi2 (5'AATTCCCTCCAAGCAGCGGAT A3') primers and 50 nM cruzi3 probe (5'FAM- CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB 3') specific for *T. cruzi* SatDNA; 100 nM IAC Fw (5'CCGTCATGGAACAGCACGTA3') and IAC Rv (5'CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT 3') primers and 50 nM IAC Tq probe (5' VIC-AG CATCTGTTCTGAAGGT-NFQ-MGB 3'). Cycling conditions were a first step at 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 58°C for 1 minute. The amplifications were carried out in a ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Standard curves for the absolute quantification were constructed by serial dilution of DNA, extracted from 1×10^6 trypomastigotes of *T. cruzi* (Dm28c-luc and Tulahuén strain), ranging from 10^5 to 0.5 parasite equivalents (par. eq). Normalization of the parasite load was performed by tissue mass, after the absolute quantification of *T. cruzi* by real time qPCR and results were expressed as parasite equivalents/tissue mass (g).

Statistical analyses

Kruskal-Wallis (Dunn's post-test) or Mann-Whitney tests were used for the statistical analyses. P values < 0.05 were considered statistically significant. Tests were performed using GraphPad Prism 5.

Results

Trypanosoma cruzi-luc inoculation through the oral route promotes acute infection in mice

Mice orally infected with *T. cruzi*Dm28c-luc were examined for blood parasitemia during the acute phase of infection. Peripheral blood parasites started to be detectable at 7 dpi, with a peak of parasitemia at 11 dpi. At later moments, the number of circulating parasites gradually decreased (Fig 1).

The head region is the main affected area in orally *Trypanosoma cruzi* infected mice

In order to determine the anatomical route of parasites entrance after OI, mice were infected and evaluated by bioluminescence imaging. At 15 and 60 min after OI, mice were placed inside the IVIS Lumina chamber and the images were obtained in ventral (upper panels) and lateral (lower panels) position (Fig 2). Detection of bioluminescence images after 15 min of OI showed that all infected mice analyzed had highest intensity of bioluminescence in the head region, concerning the mouth, nose and eyes. Although less intensive, bioluminescence was also observed in the neck, thorax and at the abdominal region. Bioluminescence signals were consistently observed from either ventral or lateral viewpoints (Fig 2A and 2B). One hour after infection, the major bioluminescence image detected remained in the head region (Fig 2C and 2D).

To confirm luciferase activity in living trypomastigotes, 5×10^4 Dm28c-luc *T. cruzi* parasites were incubated *in vitro* with medium or D-luciferin in 24 well plate (black circle). Medium or D-luciferin (150 µg/mL) substrate was added to the well and, after 5 min of incubation, images

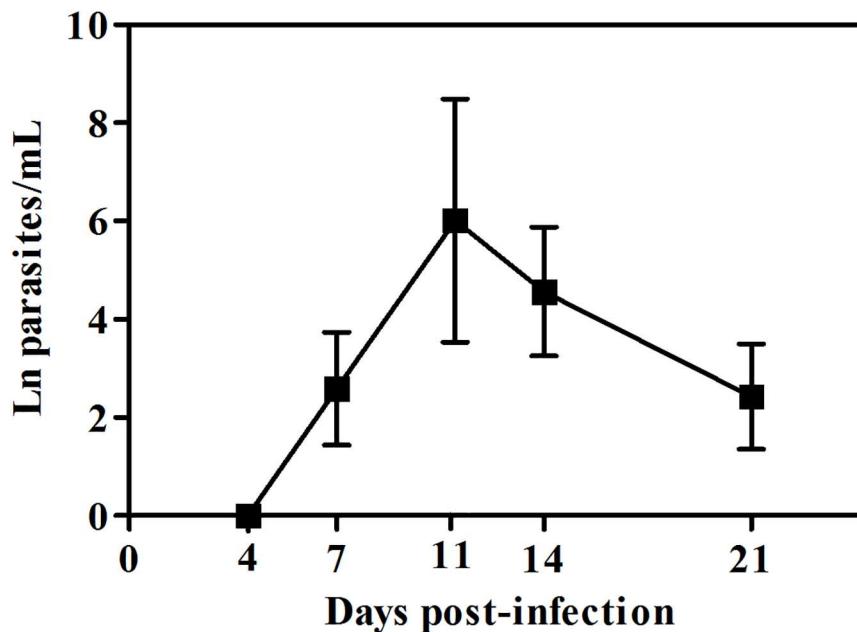


Fig 1. Parasitemia levels in mice orally infected with Dm28c-luc. Male BALB/c mice were infected with 1×10^6 trypomastigotes forms of *T. cruzi* expressing luciferase (Dm28c-luc) through the oral cavity (OI). Parasitemia was assessed during acute phase by counting parasites with light microscope and the number of peripheral blood parasites was calculated by the Brener method. Values represent mean ± SEM. n: 4 and 11 dpi = 6; 7, 14 and 21 dpi = 16. The total number was obtained from two independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g001>

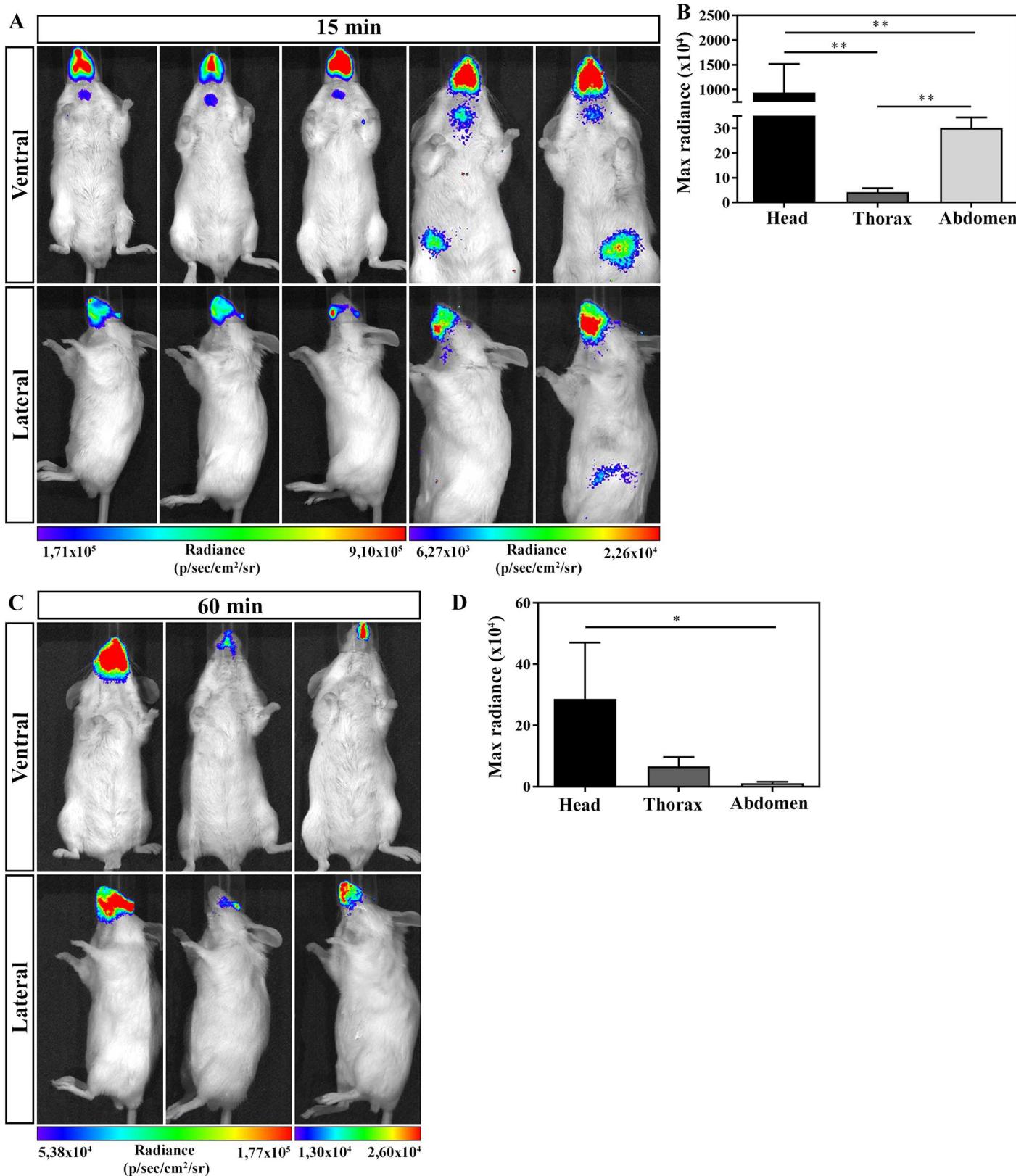


Fig 2. *In vivo* bioluminescence imaging of mice infected with Dm28c-luc at 15 and 60 min of infection. Male BALB/c mice were infected in the oral cavity (OI) with 1×10^6 trypanosomes forms of *T. cruzi* expressing luciferase (Dm28c-luc). Evaluation of OI mice was performed at 15 (A and B) and 60

min (C and D) post-infection using bioluminescent imaging (IVIS Lumina system). (A) *In vivo* bioluminescence imaging at 15 min post-infection ($n = 5$). (B) *In vivo* quantification of luminescent signal at 15 min post-infection ($n = 5$). (C) *In vivo* bioluminescence imaging at 60 min post-infection ($n = 3$). (D) *In vivo* quantification of luminescent signal at 60 min post-infection ($n = 3$). The scale bar for radiance (below) was correlated with the signal intensity, where red indicates higher signal and blue indicates a lower signal. Maximum and minimum signals are indicated at the right and left of the scale bar, respectively. Numbers represent mean \pm SEM. Data were analyzed using one tailed Mann-Whitney test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g002>

were acquired. As demonstrated in S3 Fig, luminescent signals were only detected in D-luciferin treated parasites. Moreover, as *in vivo* controls, non-infected mice were treated with D-luciferin and bioluminescent signal analyzed. S4 and S5 Figs show that, in absence of *T. cruzi* infection, D-luciferin was incapable to promote bioluminescent signal.

The nasal cavity is the site of parasite persistence in acute oral Chagas disease

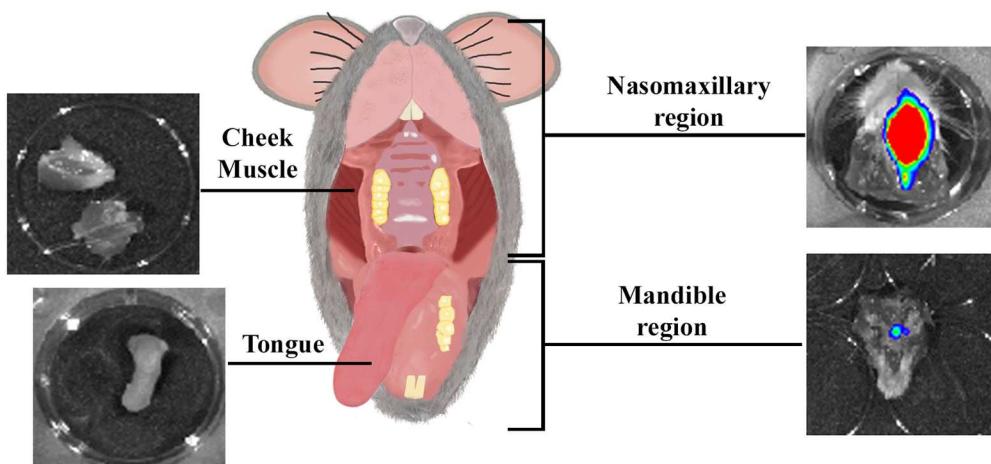
For *ex vivo* evaluation of parasites in specific organs, mice were euthanized at 15 and 60 min and 48 hours after OI. The selected head tissues (nasomaxillary region, mandible region, cheek muscle, tongue and eyes) and gastrointestinal tract (esophagus, stomach, small and large intestine) were excised. The *ex vivo* evaluation of dissected organs and tissues by bioluminescence imaging confirmed the *in vivo* bioluminescent *T. cruzi* foci, as most of the signal detected was localized in the head, specifically in the nasomaxillary region (including areas of the nose, nasal cavity and upper oral cavity) (Fig 3A and 3B). A slight bioluminescence signal was observed in the cecum and mandible region in one single animal, 15 and 60 min after infection, respectively (Fig 3B). Furthermore, no luminescent signal was observed in tongue, eyes, cheek muscle, stomach and small intestine at this time (Fig 3B). At 60 min and 48 hours after OI, *ex vivo* bioluminescence imaging of the heart, brain, spleen, liver, male sex organs, lung and salivary gland was negative (Fig 3C). Taken together, our data suggests that the primary site of *T. cruzi* invasion due to OI is located at the upper region of the oral cavity, specifically at the nasomaxillary region. To exclude the possibility of an intranasal contamination in our oral infection protocol, mice were inoculated with black ink suspensions at the oral cavity or intranasally. As observed in S2 Fig orally inoculated mice after 5 min showed ink labeling in the tongue and the oral cavity, but were negative in the nasal cavity. In contrast, the intranasal inoculation clearly labeled the nasal cavity (S2 Fig).

To have an overview of parasite distribution at different stages of infection, OI mice were analyzed at 7 dpi, an early stage of infection when blood parasites started to be detected, and at 21 dpi, a late point of the acute phase allowing a better analysis of parasite distribution and the target tissues. On 7 dpi, bioluminescent signal was detected in the head, neck and abdomen. It is noteworthy that the head region (mouth, nose and eyes) remained the major focus of bioluminescence (Fig 4). At 21 dpi, infection was dispersed through the animal body, including head, ears, abdomen, genital region and thorax. Interestingly, at this moment, the genital region showed to be an important focus of bioluminescence signal (Fig 4).

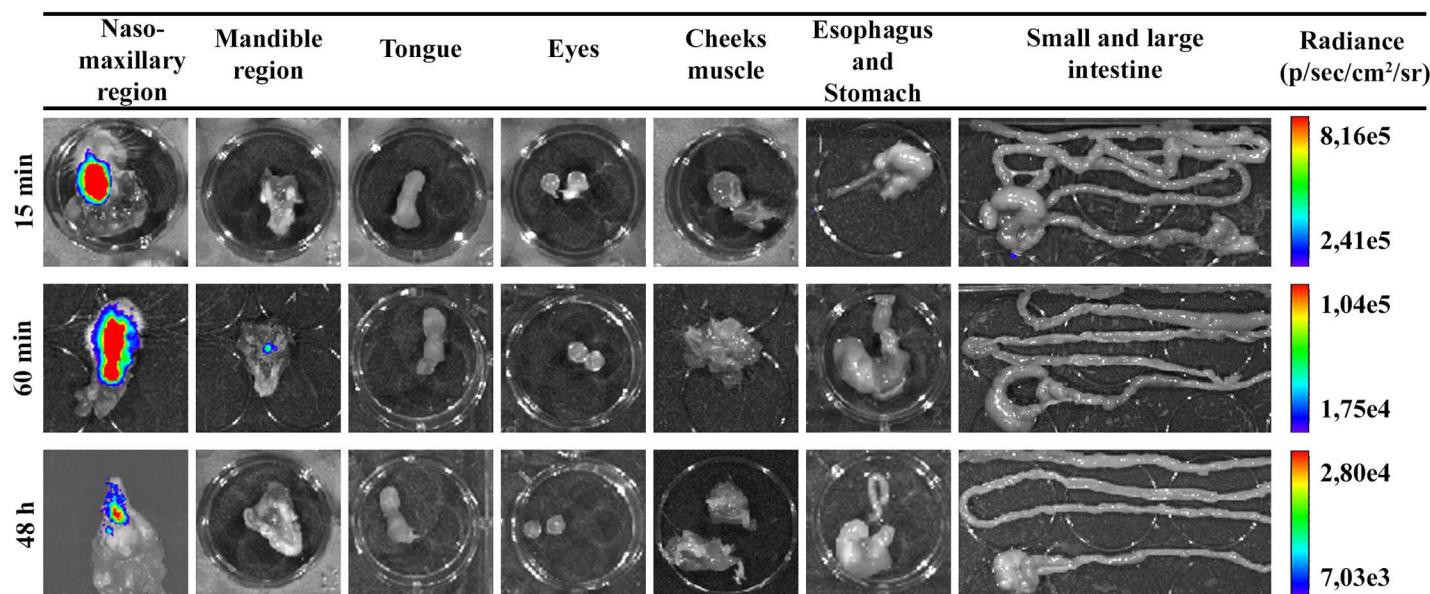
To accurately identify the infected tissue, images of individual organs were captured at 7 and 21 dpi. Dissected tissues comprise the nasomaxillary region, palate, mandible, tongue, eyes, cheeks muscle, esophagus, stomach, small and large intestines, mandibular lymph nodes, salivary gland, heart, lung, spleen, liver, brain, pituitary gland, mesenteric fat and lymph nodes and male sex organ, including preputial glands, testicles, epididymis fat and penis. To better evaluate the nasomaxillary region, we removed the hard and soft palate exposing nasal septum and nasal cavity.

Ex vivo evaluation of dissected organs and tissues at 7 dpi demonstrated that high bioluminescent signal remained at the nasomaxillary region of the mice (Fig 5A and S6 Fig).

A



B



C

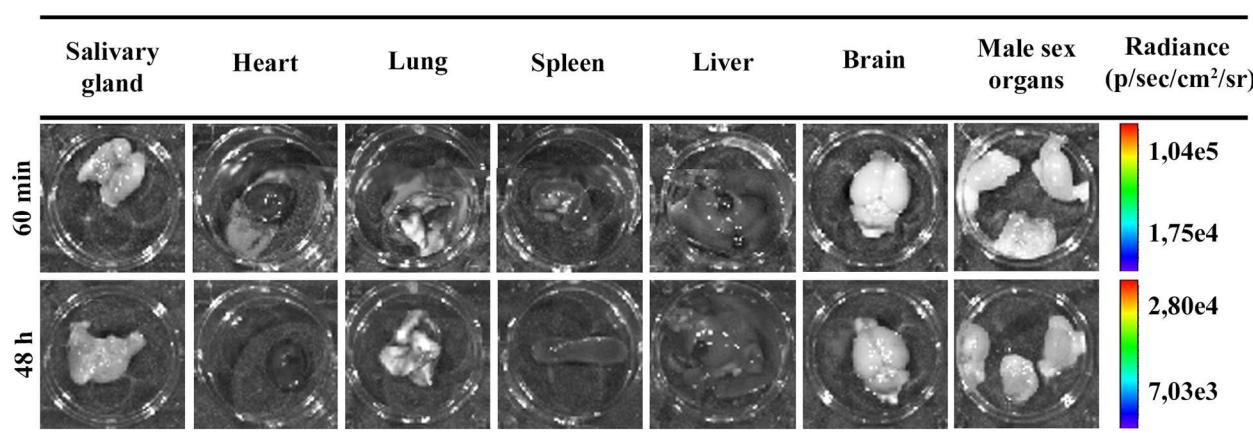


Fig 3. Ex vivo evaluation of dissected organs and tissues by bioluminescent imaging. Male BALB/c mice were infected in the oral cavity (OI) with 1×10^6 trypanomastigotes forms of *T. cruzi* expressing luciferase (Dm28c-luc). After 10 min of D-luciferin i.p administration (150 mg/kg), organs were harvested

and images were captured using an IVIS Lumina II system. (A) Schematic picture for anatomic localization of organs and tissues analyzed. Nasomaxillary region includes all tissues from regions of the nose, nasal cavity and upper region of the oral cavity with exception of the cheek muscle. Mandible region includes all tissues of the mandible and the lower region of the oral cavity, with exception of the tongue (B and C). *Ex vivo* bioluminescence imaging from selected organs and tissues at 15 min ($n = 3$), 60 min ($n = 4$ in the nasomaxillary region; $n = 2$ in other organs) and 48 hours ($n = 5$) post-infection. The scale bar for radiance (right) was correlated with the signal intensity, where red indicates higher signal and blue indicates a lower signal. Maximum and minimum signals are indicated at the top and bottom of the scale bar, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g003>

Furthermore, after removal of the entire palate, nasal cavity and nasal septum region showed the major bioluminescence signal (Fig 5A). Light foci were also detected in the palate in 75% of OI mice, shown in Table 1, which describes the percentage *T. cruzi*-positive tissues analyzed (Fig 5A and Table 1 and S6 Fig). Interestingly, at this moment of infection, images of *T. cruzi* were detected in the brain, located in the olfactory bulb region (Fig 5C and S6 Fig). Bioluminescence was also detected in the cheek muscle, mandibular lymph nodes and mandible in 50% of OI mice (Fig 5A and 5C and Table 1 and S6 Fig) and 66.6% of spleens (Fig 5D and Table 1). A slight bioluminescence signal was observed in the esophagus, liver, large and small intestines, mesenteric fat and lymph nodes (Fig 5B and 5D and S6 Fig). Bioluminescent foci were also detected in male sex organs, specifically in the testicle and epididymis fat in 33.33% of OI mice (Fig 5E and Table 1 and S6 Fig). The bioluminescence signal was undetected at this time in the tongue, eyes, stomach, pituitary gland, salivary gland, lung and heart (Fig 5A, 5B, 5C and 5F and S6 Fig). In agreement with initial bioluminescent images, a large number of *T. cruzi* Dm28c-GFP amastigote nests are detected in the nasal cavity of OI mice at 6 dpi (Fig 6).

At 21 dpi, bioluminescence was clearly observed in the nasomaxillary region, palate, mandible region, cheek muscle, esophagus, mandibular lymph nodes, spleen, liver, mesenteric fat and lymph nodes and male sex organ (Fig 5A, 5B, 5C, 5D and 5E and S7 Fig). The major affected tissues and organs in the genital region were penis and preputial gland (Fig 5E). In addition, tissues such as the salivary glands, heart and lung started to reveal parasite presence at this moment (Fig 5C and 5F and S7 Fig). At this time of infection, we also observed an increased signal of bioluminescence in the gastrointestinal tract, mostly in the stomach, intestines and mesenteric fat (Fig 5B and 5D and S7 Fig). Bioluminescence signal was observed in 75% of the intestines analyzed and in 50% of stomach and esophagus (Fig 5B and Table 1 and S7 Fig). Finally, at 21 dpi, the *ex vivo* evaluation revealed that parasites were disseminated to different organs of the body.

In conclusion, at 7 and 21 dpi, *T. cruzi* spreads to other parts of the body, infecting other organs. The persistence of bioluminescence signal emitted from the nasomaxillary region suggested the existence of a general maintenance of parasite proliferation in this region.

Quantitative PCR detected parasite loads correlated with *ex vivo* bioluminescence and confirmed the nasal cavity as the major site of parasite burden

In contrast to the classical techniques, bioluminescence imaging is able to identify small foci of infection in the whole animal, but, in some cases, bioluminescent signal can be under detection limits. Quantitative real-time PCR (qPCR) is an accurate technique to evaluate the presence of parasites in tissues. To examine the parasite burden in target tissues, we collected tissues from orally infected mice at 60 min, 7 and 21 dpi and performed qPCR to compute parasite load. Initially, tissues of the oral cavity, the gastrointestinal tract and adjacent regions, such as the nasal cavity, tongue, palate, mandibular lymph nodes, esophagus, stomach, large and small intestines were all analyzed by qPCR.

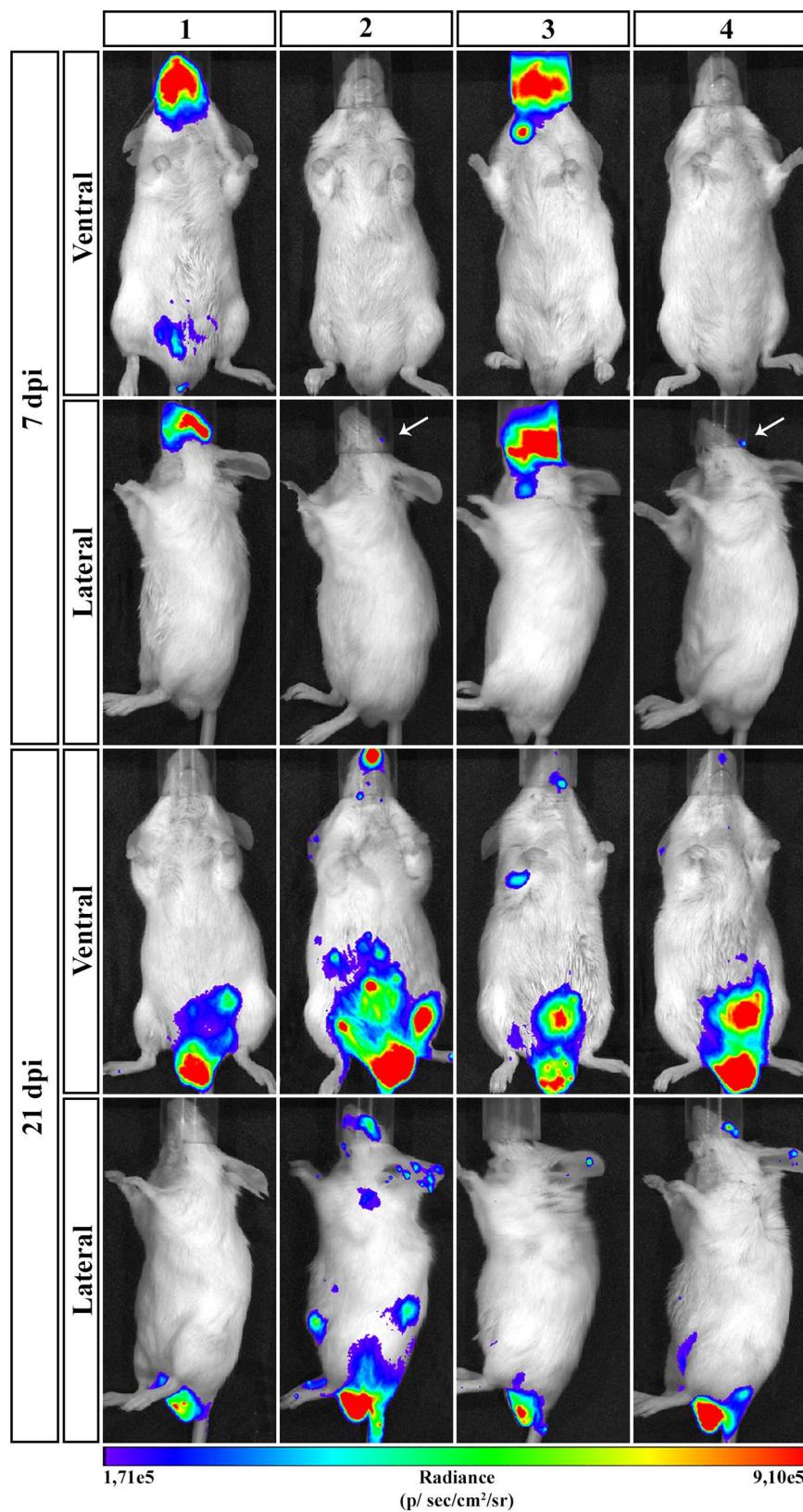


Fig 4. Course of parasite dissemination in *Trypanosoma cruzi* oral infection. Male BALB/c mice were infected in the oral cavity (OI) with 1×10^6 trypomastigotes forms of *T. cruzi* expressing luciferase (Dm28c-luc).

Representative *in vivo* bioluminescence images were acquired in the same mice (n = 6), at 7 and 21 dpi, after 15 min of D-luciferin IP administration (150 mg/kg), using IVIS Lumina image system (Xenogen). The scale bar for radiance (below) was correlated with the signal intensity, where red indicates higher signal and blue indicates a lower signal. Maximum and minimum signals are indicated at the right and left of the scale bar, respectively. White arrows indicate the presence of bioluminescence.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g004>

Consistent with the bioluminescence results observed in the nasomaxillary region at 60 min (Fig 3B) and 7 dpi (Fig 5A), *T. cruzi* foci were detected in elevated numbers at the nasal cavity by qPCR. The first hour after infection showed *T. cruzi* Sat DNA detection in the nasal cavity among 80% of OI mice, with parasite quantification up to 560 parasite equivalents/g (par.eq./g) (mean of 180) (Fig 7A and Table 1). Parasite amplification was also detected in the esophagus, stomach, small intestine and large intestine (Fig 7A), although these tissues were negative by bioluminescence imaging (Fig 3B). Interestingly, at 60 min, SatDNA detection was observed in one OI mouse at the esophagus, small intestine and large intestine (Fig 7A). Furthermore, *T. cruzi* SatDNA was detected in 75% of the analyzed OI mice in the stomach and mandibular lymph nodes at 60 min, with *T. cruzi* quantification up to 191.1 (mean of 52.0) and up to 1.63 (mean of 1.0) par.eqs./g, respectively (Fig 7A and Table 1).

In addition, SatDNA *T. cruzi* quantification in the nasal cavity was much higher at 7 dpi, ranging from 6.2×10^3 to 7.5×10^6 par.eqs./g (mean of 2.2×10^6) (Fig 7A). In this time points after infection, nasal cavity showed the highest parasite load among the analyzed tissues. Interestingly, mandibular lymph nodes also showed high parasite loads, ranging from 31.2 to 6300 par.eqs./g (mean of 3.5×10^3) (Fig 7A). It becomes evident that the mean parasite load detected in the nasal cavity was 10^3 times higher than in the other organs (Fig 7A).

At 21 dpi, due to parasite dissemination, high levels of par.eqs./g were detected in all tissues (Fig 7A), in accordance to the bioluminescence imaging. In addition, it was not possible to detect parasite presence in the palate and tongue due to PCR inhibition (no amplification of the qualitative exogenous internal amplification control (IAC)). To evaluate parasite dissemination throughout the body and to determine if there was any correlation with the bioluminescence signal, we analyzed parasite load in the pituitary gland, brain, heart, spleen and liver at 60 min, 7 and 21 dpi. *Ex vivo* imaging of the brain, spleen and liver did not reveal any bioluminescence signal at 60 min (Fig 3C). As expected, qPCR results confirmed the bioluminescence imaging and *T. cruzi* DNA amplification was undetectable in these organs (Fig 7B). Low amount of parasite detection was observed in the heart of a single animal (0.8 par.eq./g), at 60 min (Fig 7B). At 7 dpi, *T. cruzi* SatDNA was detected in the heart, spleen, liver and pituitary gland (Fig 7B). Finally, at 21 dpi, parasite dissemination favored *T. cruzi* detection in all analyzed tissues (Fig 7B).

T. cruzi is highly genetically diverse and currently six Discrete Typing Units (DTU), TcI to TcVI, are recognized [38]. TcI, TcII, TcIII, TcIV and TcVI genotype has been reported in oral transmission of acute Chagas disease [18–25]. Because of this biological polymorphism, different strains may present tropisms for distinct tissues (cardiac muscle, myoenteric plexuses in the esophagus and rectum and others tissues) and consequently differences in the clinical forms of the disease [40]. Due to this difference tissues tropism in *T. cruzi* strains, qPCR of gastrointestinal tract, nasal cavity and heart tissues from OI mice using a different strain (Tulahuén strain, DTU—TcVI) was performed to compute parasite load. Tissues were collected at 60 min and 7 dpi from OI mice.

Consistent with the qPCR results observed in OI mice with Dm28c-luc strain (DTU- TcI) (Fig 7), sixty minutes after infection, *T. cruzi* foci was detected in elevated numbers at the nasal cavity in OI mice with Tulahuén strain (DTU- TcVI). *T. cruzi* presence was also detected in the stomach at this time point (Fig 8). However, at 7dpi the highest SatDNA *T. cruzi*

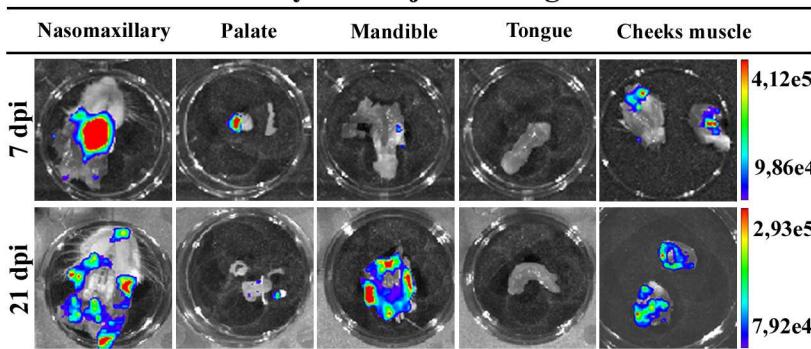
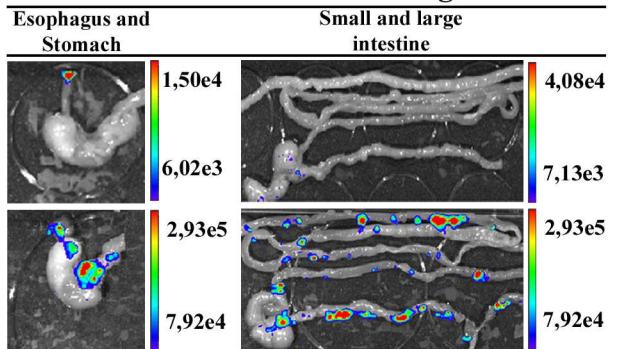
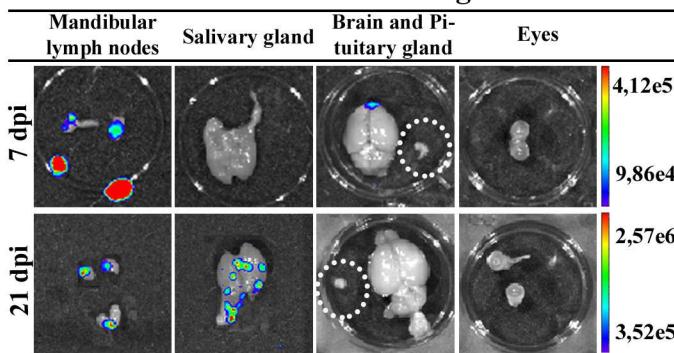
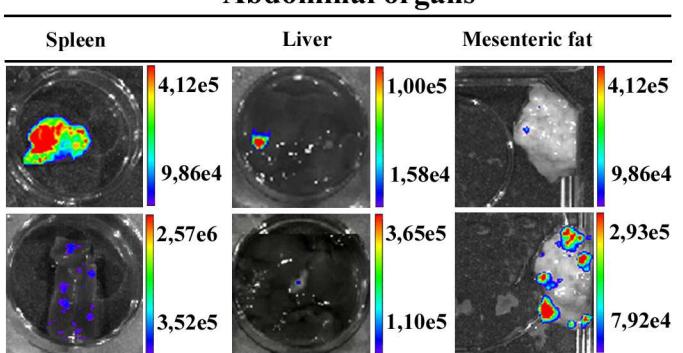
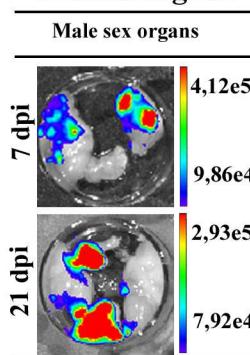
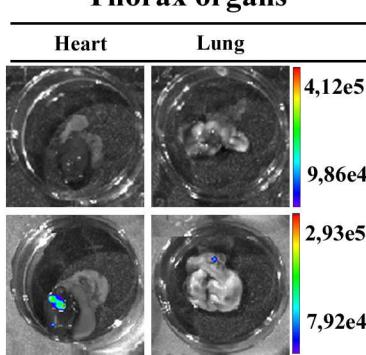
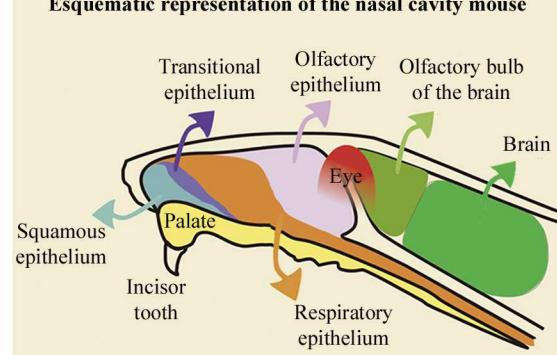
A**Oral cavity and adjacents organs****B****Gastrointestinal tract organs****C****Other head and neck organs****D****Abdominal organs****E****Genital organs****F****Thorax organs****G****Esquematic representation of the nasal cavity mouse**

Fig 5. Ex vivo bioluminescence images from infected mice confirm the systemic dissemination of the parasite. Male BALB/c mice were infected in the oral cavity (OI) with 1×10^6 trypomastigotes forms of *T. cruzi* expressing luciferase (Drm28c-luc). After 10 min of D-luciferin administration IP (150 mg/kg), organs were harvested and images were captured using an IVIS Lumina II system. *Ex vivo* bioluminescence imaging at 7 and 21 dpi: (A) oral cavity and adjacent organs; (B) gastrointestinal tract organs; (C) others head and neck organs. Pituitary gland: inside white circle; (D) abdominal organs; (E) In the male sex organ image, testicle and epididymal fat are located at the sides and the preputial gland in the bottom; (F) thorax organs. (n = 4 palate, cheek muscle; pituitary gland, mandibular lymph nodes mesenteric fat and lymph nodes; n = 6, others organs). The scale bar for radiance (right) was correlated with the signal intensity, where red indicates higher signal and blue indicates a lower signal. Maximum and minimum signals are indicated at the top and lower region of scale bar, respectively. (G) Schematic drawing of an anatomic section from a mouse head. The septum was removed, exposing the lateral wall and some of the major structures in the head. Palate (yellow), eyes (red), brain (light and dark green), olfactory bulb (light green) and nasal cavity are shown and the distribution of surface epithelial types lining the nasal airways is represented in blue, dark-purple, orange and light-purple colors for the squamous, transitional, respiratory, and olfactory epithelium, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g005>

Table 1. Percentage of *T. cruzi*—positive tissues analyzed by bioluminescence and qPCR methods.

Region	Tissues	Times after infection					
		60 min		7 dpi		21 dpi	
		BLI (n)	qPCR (n)	BLI (n)	qPCR (n)	BLI (n)	qPCR (n)
Oral cavity and adjacent organs	Nasal cavity	100% (4)	80% (5)	100% (6)	100% (5)	50% (4)	100% (4)
	Palate	NA	I	75% (4)	I	25% (4)	I
	Mandible	50% (2)	NA	50% (6)	NA	75% (4)	NA
	Cheeks muscle	ND (2)	NA	50% (4)	NA	100% (4)	NA
	Tongue	ND (2)	I	ND (6)	I	ND (4)	I
Head and neck organs	Mandibular LN	NA	75% (4)	50% (4)	100% (3)	25% (4)	100% (3)
	Salivary gland	ND (2)	NA	ND (6)	NA	75% (4)	NA
	Brain	ND (2)	ND (5)	66,6% (6)	20% (5)	ND (4)	100% (4)
	Pituitary gland	NA	ND (5)	ND (4)	80% (5)	ND (4)	100% (4)
	Eyes	ND (2)	NA	ND (6)	NA	ND (4)	NA
Abdominal organs	Spleen	ND (2)	ND (5)	66,6% (6)	100% (4)	25% (4)	100% (4)
	Liver	ND (2)	ND (5)	33,3% (6)	60% (5)	25% (4)	100% (4)
	Mesenteric fat and LN	NA	NA	25% (4)	NA	100% (4)	NA
Gastrointestinal tract organs	Esophagus	ND (2)	25% (4)	16,6% (6)	NA	50% (4)	100% (3)
	Stomach	ND (2)	75% (4)	ND (6)	25% (4)	50% (4)	100% (3)
	Small intestine	ND (2)	20% (5)	50% (6)	100% (3)	75% (4)	100% (4)
	Large intestine	ND (2)	20% (5)	16,6% (6)	ND (4)	75% (4)	100% (4)
Genital organs	Male sex organs	ND (2)	NA	33,3% (6)	NA	100% (4)	NA
Thorax organs	Heart	ND (2)	20% (5)	ND (6)	80% (5)	50% (4)	100% (4)
	Lung	ND (2)	NA	ND (6)	NA	25% (4)	NA

BLI: Bioluminescence imaging; n: number of animals; LN: Lymph nodes; NA- not analyzed; ND- not detected; I- PCR inhibition. The percentage of infected tissues was obtained from the number of tissues presenting bioluminescence signal or *T. cruzi* SatDNA amplification, over the total number of tissue (from different mice) analyzed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.t001>

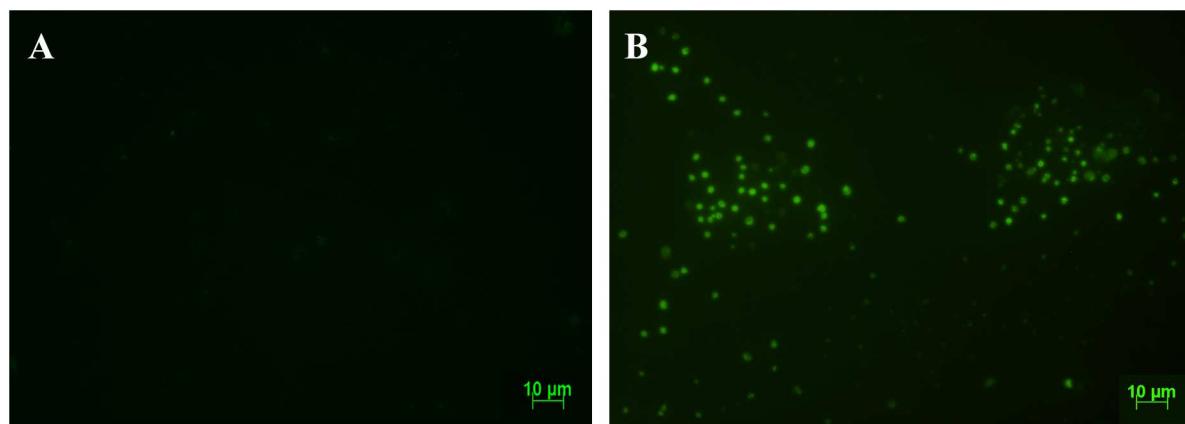


Fig 6. Amastigote nests detection by fluorescence microscopy of nasal cavity from mice infected with Dm28c-GFP. Male BALB/c mice were infected with 1×10^6 tryomastigotes forms of *T. cruzi* expressing GFP reporter gene (Dm28c-GFP). At 6 dpi, the nasal cavity tissues were removed, frozen and sections were prepared for fluorescence microscopy analysis. (A) Representative fluorescence image of the nasal cavity from uninfected mice. (B) Representative fluorescence image of the nasal cavity from infected mice. Several amastigote nests (green) can be observed in the nasal cavity. Data represent analysis from an experiment with $n = 2$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g006>

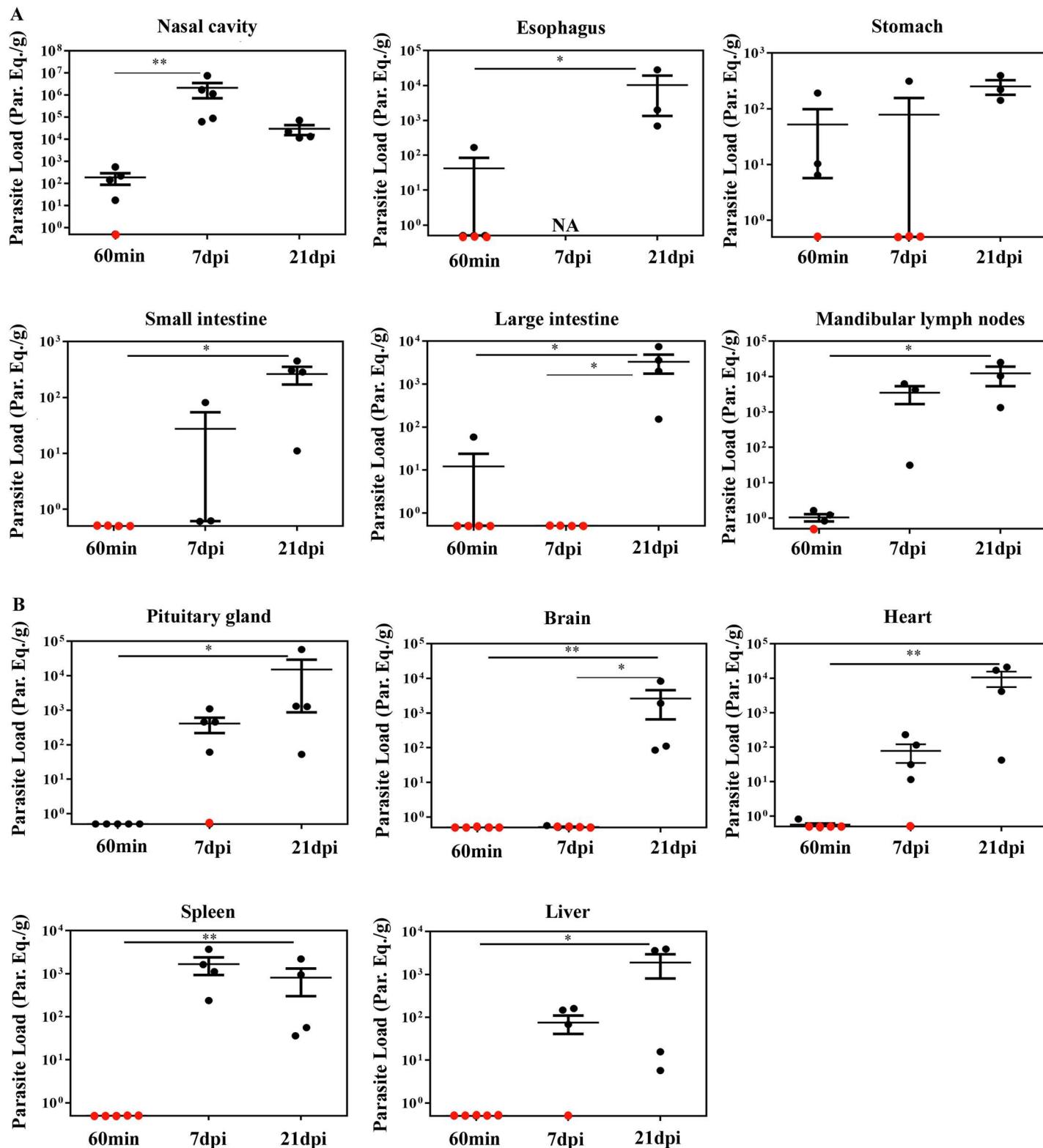


Fig 7. Quantification of tissue parasite loads in BALB/c mice orally infected with *T. cruzi* Dm28c-luc strain. Male BALB/c mice were infected in the oral cavity (OI) with 1×10^6 trypomastigotes forms of *T. cruzi* expressing luciferase (Dm28c-luc). Organs and tissues were harvested for qPCR analysis to determine the parasite load (parasite equivalent/g) at 60 min, 7 and 21 dpi. The qPCR was performed in multiplex, targeting *T. cruzi* nuclear satellite DNA (Sat DNA) and IAC, as a quality control. (A) Parasite load in the nasal cavity (n: 60 min and 7dpi = 5; 21 dpi = 4), esophagus (n: 60 min = 4; 21 dpi = 3),

stomach (n: 60 min and 7 dpi = 4; 21 dpi = 3), small intestine (n: 60 min = 5; 7 dpi = 3; 21 dpi = 4); large intestine (n: 60 min = 5; 7 and 21 dpi = 4) and mandibular lymph nodes (n: 60 min = 4; 7 and 21 dpi = 3). (B) Parasite load in the pituitary gland (n: 60 min and 7 dpi = 5; 21 dpi = 4), brain (n: 60 min and 7 dpi = 5; 21 dpi = 4), heart (n: 60 min and 7 dpi = 5; 21 dpi = 4), spleen (n: 60 min = 4; 7 and 21 dpi = 4) and liver (n: 60 min and 7 dpi = 5; 21 dpi = 4). Red dots: no parasite detection. Values present mean ± SEM. Kruskal-Wallis (Dunn's post-test) was used for group kinetics. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5. * p < 0.05, **p < 0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g007>

quantification in the nasal cavity suggested intense parasite growing in this tissue, in contrast with the stomach (Fig 8). Altogether, these data confirms that the nasal cavity is the

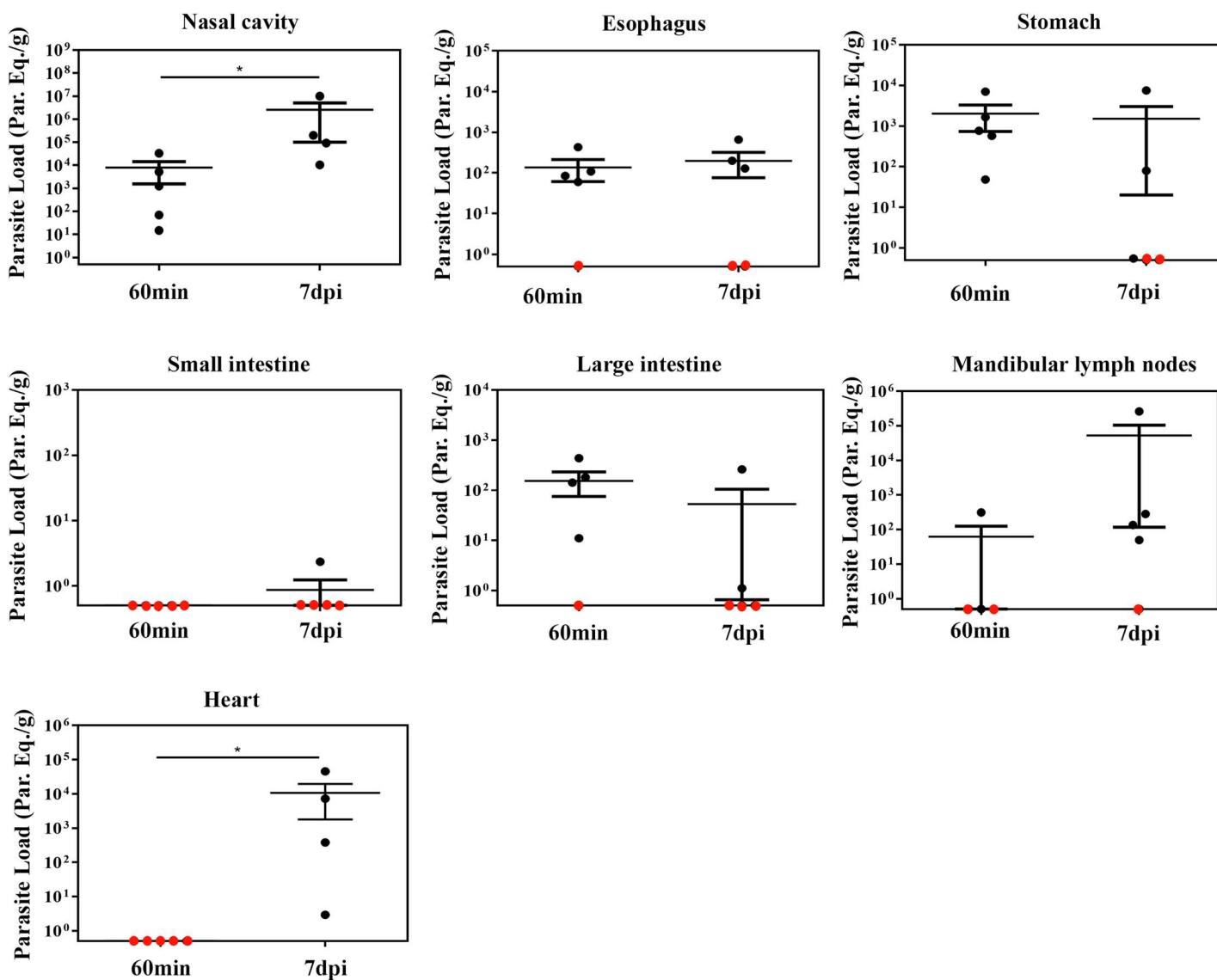


Fig 8. Quantification of tissue parasite loads in BALB/c mice orally infected with *T. cruzi* Tulahuén strain. Male BALB/c mice were infected in the oral cavity (OI) with 1×10^6 trypomastigotes forms of *T. cruzi* Tulahuén strain (DTU-TcVI). Organs and tissues were harvested for qPCR analysis to determine the parasite load (parasite equivalent/g) at 60 min and 7 dpi. The qPCR was performed in multiplex, targeting *T. cruzi* nuclear satellite DNA (Sat DNA) and IAC, as a quality control. Parasite load in the: nasal cavity (n: 60 min = 5; 7 dpi = 4), esophagus (n: 60 min and 7 dpi = 5), stomach (n: 60 min and 7 dpi = 5), small intestine (n: 60 min and 7 dpi = 5), large intestine (n: 60 min and 7 dpi = 5), mandibular lymph nodes (n: 60 min = 4 and 7 dpi = 5) and heart (n: 60 min = 4 and 7 dpi = 5). Red dots: no parasite detection. Values present mean ± SEM. One tailed Mann-Whitney test was used for group kinetics. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. * p < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g008>

preferential site *T. cruzi* infection and expansion in oral infection, regardless of DTU strain specificity (Fig 8).

Interestingly, the percentage of OI mice with blood parasitemia at 7 and 21 dpi was 25% and 56%, respectively. However, by assessing the percentage of infected mice in these same points of infection using bioluminescent imaging (evaluating the presence of the bioluminescence signal) and qPCR (evaluating *T. cruzi* SatDNA amplification in tissue), 100% of OI mice showed both bioluminescent signal and *T. cruzi* SatDNA amplification in tissues at 7 and 21 dpi. We conclude that the parasitemia is less sensitive to determine the percentage of infection in animals inoculated by the oral route in our model, since the bioluminescence techniques and qPCR showed signs of active infection in mice in these times.

Taken together, bioluminescence and qPCR data showed that at the first moments after OI, *T. cruzi* is able to infect nasal cavity, mandibular lymph nodes and stomach. However, nasal cavity is the major focus for parasite permanence and replication. These results show parasite distribution kinetics, thus suggesting that *T. cruzi* may disseminate to other organs (pituitary gland, brain, heart and liver) from the nasal cavity (Fig 9).

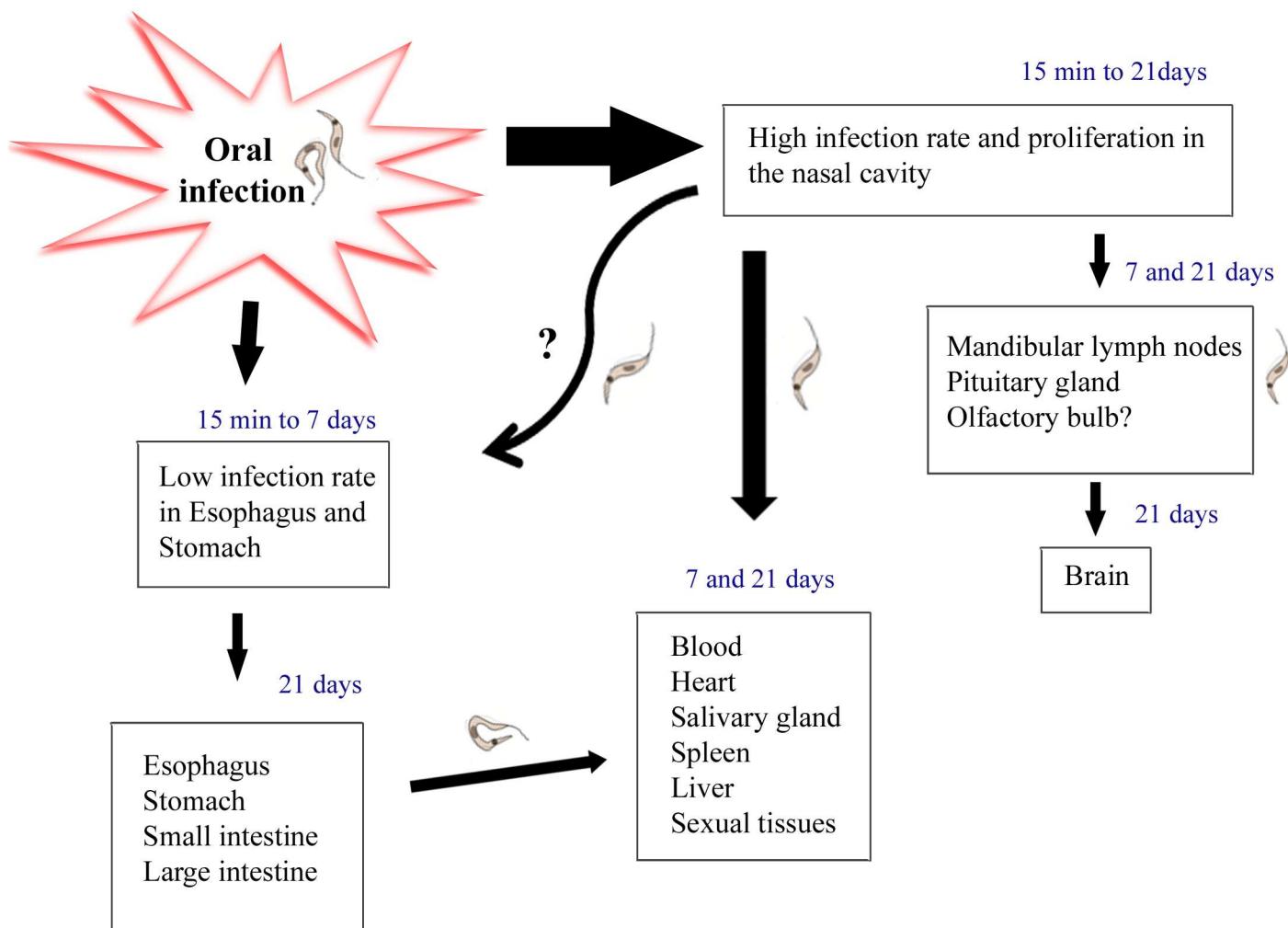


Fig 9. Hypothesis: Oral infection involves *Trypanosoma cruzi* infection through the mouth into the nasal cavity, the main source of parasite replication. Nasal cavity parasites might disseminate through the olfactory nerve to the brain and also by the lymphatic and/or blood circulation to distant tissues. Moreover, as previously described by others, a small amount of parasites migrates to the gastric mucosa in initial moments of infection. *T. cruzi* infection in the stomach may also be associated to parasite dissemination through the host.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507.g009>

Discussion

In the past years, the number of oral Chagas disease outbreaks in Brazil and other Latin America countries are increasing. Presently, the most common pathway of *T. cruzi* infection in the Brazilian Amazon is the oral route and, from 2000 to 2013, this pathway of infection was responsible for 70% of acute cases in Brazil [4, 6]. These outbreaks were associated with ingestion of contaminated food and beverage[11, 41]. Orally infected patients are frequently highly symptomatic, presenting long-lasting fever, headache, facial and bipalpebral edema, lower limb edema, myalgia, abdominal pain, meningoencephalitis and the classical cardiac involvement [6, 9, 42–44]. Analysis of distinct outbreaks demonstrated that the mortality rate of affected patients in the first two weeks of infection is estimated at 8–35%, considerably higher than the mortality rate from the classical vectorial transmission (< 5–10%). The higher mortality rate can be associated with elevated prevalence of cardiac pathology and absence of an earlier diagnosis [14, 43].

Despite being an important route of infection, there are few studies regarding *T. cruzi* oral transmission in the literature. Previous data, using histopathology studies, showed signs of a possible *T. cruzi* penetration in the oral, esophageal, gastric, and intestinal mucosa with a local reaction with eosinophilia, infiltrated lymphocytes and monocytes after oral infection in dog [45]. In contrast, some authors have demonstrated that orally *T. cruzi* infected mice involves gastric mucosal invasion for the systemic infection. It has been shown, by histological analysis, that *T. cruzi* infection is observed in the gastric mucosal epithelium. However, parasites were not detected in other areas throughout the gastrointestinal tract, like esophagus and oropharynx. These authors observed that *T. cruzi* initiates systemic parasite dissemination as a consequence of an oral infection by gastric mucosal invasion [27]. By using intragastric or intrapharyngeal challenge, another group observed that *T. cruzi* glycoproteins, such as gp82 and gp30, are important for gastric invasion. Prior to invasion, the parasite binds to gastric mucin using these glycoproteins that allow *T. cruzi* to invade and replicate in the stomach [29, 31, 46, 47]. We have previously shown that the site of inoculation, through the oral cavity (OI) or the stomach (by gavage-GI), differentially affects host immune response and mortality. OI developed a highly severe acute disease with higher parasitemia, TNF serum levels, hepatitis and mortality rates when compared to GI [15], suggesting that the inoculum site is a key factor in Chagas disease progression, possibly modulating local immune mechanisms that impacts in the systemic immunity. In addition, intraperitoneal (IP), intravenous and subcutaneous infection shows higher infection rates and mortality than mucosal ones (oral, intragastric, intrarectal, genitalia or conjunctival) [33, 48, 49].

Here, we searched for the site of parasite entry in the host in orally infected mice. It is well accepted that bioluminescence imaging is an innovative technique that helps the identification of parasite distribution in distinct tissues, allowing a panoramic comprehension of *T. cruzi* dissemination in the entire animal body [34]. By using bioluminescence technique, we demonstrated that, few minutes after OI, parasites are concentrated in the head region, specifically in the nasomaxillary region (upper oral cavity, nose and nasal cavity). In a lesser intensity, parasites were also detected in the thorax and at the abdominal region. In addition, *T. cruzi* was detected in the nasal cavity and draining lymph nodes at 60 min post-infection by qPCR, confirming that the nasal cavity has the highest parasite load among affected tissues, in contrast with the stomach and intestines. In the same way, two and seven days after inoculums, images revealed that the nasomaxillary region remains as the major focus of infection.

Interestingly, facial edema is a common feature in affected patients, being described in 57–100% of cases in Brazilian outbreaks of oral infection [6]. Nevertheless, a contaminated sugar cane juice outbreak of oral infection in Paraíba State (Brazil) revealed the presence of bilateral

palpebral edema in 92% of orally infected patients [44]. An outbreak with contaminated fresh guava juice in Venezuela showed that 40% of hospitalized patients had facial edema [50]. Moreover, another outbreak in Venezuela involving five members of the same family described that all patients showed edema in the face, mouth and cheek, and edema and paraesthesia of the tongue [51]. Furthermore, other clinical finding in the face region, such as gingivitis and dry cough has been attributed to the penetration of the parasite throughout the oral or pharyngeal cavity [6, 43]. Interestingly, *T. cruzi* infection and gingival inflammatory foci has been shown at the oral cavity from a chronic Chagas disease patient [52]. These findings might be associated to our present data, which describe for the first time the nasomaxillary region as the main target tissue following oral *T. cruzi* infection.

The mouth can be targeted by various infectious diseases, including viral, bacterial, and fungal. The oral cavity contains distinct mucosal surfaces composed of sophisticated structures and molecules, such as mucins, in which the microorganisms can bind and colonize the environmental cells [53]. It has been shown that the soft palate is an important site of infection and adaptation of influenza viruses. The soft palate infection may contribute to airborne transmission by providing a mucin-rich microenvironment and perhaps the initial region of infection. In fact, the expression of α 2,3 sialic acids and viral hemagglutinin ligand is detected on the soft palate in the regions of the oral surface, mainly at the basal cells, and the nasopharyngeal tissues from humans and ferret [54]. Interestingly, α 2,3 sialic acids are the main molecule involved in *T. cruzi* transialidase mediated binding. Transialidase has been considered as an important virulence factor of *T. cruzi*, due to its ability to reduce host cell immune response and mediate *T. cruzi* and host cells adhesion [55]. It has been shown that transialidase have adhesive capacity with host sialoglycans, generating “eat me” signals in epithelial cells, facilitating the parasite entry into non-phagocytic cells [56]. Based in these previous studies we can hypothesize that oral *T. cruzi* infection may occur on the palate, through the interaction of transialidase molecules in the parasite membrane with α 2,3 sialic acids residues present in the soft palate [54]. Other molecules may also be involved in *T. cruzi* adhesion with oral cavity cells, such as mucins and glycoproteins such as gp82, gp30, gp90 [57].

Seven days after infection reveals that nasal cavity, nasal septum region, palate, cheek muscles, mandible and mandibular lymph nodes are target tissues of the parasite. Surprisingly, the mean parasite load detected by qPCR in the nasal cavity of OI mice with Dm28c-luc (DTU-TcI), is 103 times higher than other tissues. This predominant *T. cruzi* detection in mouse nasal cavity is also observed in OI mice with other *T. cruzi* strain (Tulahuén strain, DTU-TcVI). Altogether this data suggesting that nasal cavity is the main site of *T. cruzi* maintenance and replication following oral infection.

In the line with our findings, Giddings and colleagues demonstrated that nasal cavity is the principal site of parasite infection and replication after conjunctival *T. cruzi* infection with Tulahuén strain (DTU-TcVI). The predominant invasion occurs through epithelia lining nasal cavity and nasolacrimal ducts. *T. cruzi* initially replicates within these sites and further spread to draining lymphoid organs with systemic dissemination. In the nasal cavity, parasites were detected in areas such as the submucosa of the epithelial lining the nasal septum, nasal mucosa-associated lymphoid tissue and bone marrow of the facial bones surrounding the nasal cavity [58]. Mice infected with the Tulahuén strain of *T. cruzi* by the intranasal route shows higher brain parasitism than mice infected by the subcutaneous pathway [49]. It was also observed that parasites gain access to the brain via olfactory nerve tissues. The authors proposed that, within the first moments, parasites invade nasal cavity cells, multiply and then migrate to the brain via the olfactory tissues [49]. Supporting this idea, we have observed that after infection and multiplication of parasites in the nasal cavity of orally infected mice, bioluminescence imaging of *T. cruzi* at 7 dpi were detected in the bulbous olfactory region of the

brain in orally infected mice. Interestingly, parasites were also detected by qPCR in the pituitary gland at 7 and 21 dpi, but not in the central region of the brain at 7 dpi, turning positive at 21 dpi. Thus, we propose that brain infection is subsequent to the nasal cavity and the olfactory nerve tissue commitment. Corroborating our results of *T. cruzi* detection in the pituitary gland and in the brain, a previous study detected the parasite kinetoplast DNA in the pituitary gland during the acute phase [59].

Despite bioluminescence imaging is able to identify small foci of infection in the tissues and in the whole animal, this technique has limitations and some aspects that should be considered [34, 37]. The detection sensitivity is dependent on several factors, such as the level of luciferase expression, type of tissues, depth of labeled cells within the body and sensitivity of the detection system. Thus, in some cases, bioluminescent signal can be under the detection limit [37, 58–60]. As we have observed in our model, the percentages of *T. cruzi*-positive analyzed samples by bioluminescence and qPCR are different in some tissue (Table 1). Indeed in both pituitary gland and the heart at 7 dpi the presence of *T. cruzi* was not detected by bioluminescence, however it was detected by qPCR. This can be explained by higher sensibility of the qPCR compared to bioluminescence, as the qPCR allows detection of at least 0.5 equivalents parasites [61] and bioluminescence does not.

T. cruzi infection has been associated to disturbances in immune-endocrine systems, leading to activation in the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis and high glucocorticoid production. The high glucocorticoid secretion seems to limit the excessive production of pro-inflammatory cytokines, protecting the host from tissue injury and metabolic alterations. Furthermore, the elevated glucocorticoid production in the acute phase is involved in thymus atrophy and immature T CD4⁺CD8⁺ cell apoptosis [60, 61].

In Fig 4 we observe that animals analyzed showed differences in bioluminescence signal. Some animals present less intensity of bioluminescence signal in the head, demonstrating that these animals have a lower parasitism in this region in that time point. Note that with 21dpi these same animals presented a larger signal in the region in the nasal cavity, which shows that they may have different evolution kinetics. This does not exclude the fact that they were infected and presented high intensity of signal at the same regions as the others, but not exactly at the same time. These differences between mice in *T. cruzi* infection can be observed also in parasitemia (Fig 1) or in parasitism load at different tissues (Figs 7 and 8). Interestingly, we can also see in Fig 7A a large difference in parasite load in the nasal cavity with 7 dpi between animals analyzed by qPCR, although not analyzed in the same animals bioluminescence.

Interestingly, with the development of the infection and spread of *T. cruzi*, we observed the presence of bioluminescence signal mainly in the male sexual organs (testicles, epididymal fat, preputial gland and epididymis). As described in previous studies, male sex organs are frequently infected in *T. cruzi* experimental infections, including testes, penis, epididymis ducts and accessory sex glands (prostate, preputial gland and seminal vesicle) of mice infected by IP route [62–65]. In humans some cases of orchitis due to gonadal parasitism during the acute phase of Chagas disease have been described. Furthermore, clinical manifestations of sexual dysfunction such as decreased of libido, erection and ejaculation were reported [66–69]. Although the possibility of sexual transmission of *T. cruzi* has been suggested, few studies have been published on this theme. In the acute phase of experimental infection, sexual transmission has been described, but with low transmission rates in uninfected and immunosuppressed females through males infected by IP route [70]. Ribeiro and colleagues evaluated the potential of sexually transmission of *T. cruzi* in the chronic phase with infected males to uninfected females and vice versa by using mice infected via IP route. After copulation, 100% of the animals, both males as females seroconverted (ELISA and IF) and presented *T. cruzi* DNA in the heart and skeletal muscle [71].

In the present work, we have identified the site of *T. cruzi* initial invasion and replication after infection through the oral route. Our results demonstrated that oral infection involves *T. cruzi* passage through the mouth into the nasal cavity, where parasite replication occurs. Then, nasal cavity parasites might disseminate through the olfactory nerve tissues and blood to distant tissues (Fig 9). Thus, the proper oral cavity operates as a potential source of infection, and places the regional innate and adaptive immune systems as central players in the disease progression. Therefore, the elucidation of the tissue/organs targets and the molecular components regulating the establishment of oral *T. cruzi* infection is critical to understanding the pathogenesis of this current form of Chagas' disease.

Supporting information

S1 Fig. Flowchart of the total number of mice used in each experiment. Male BALB/c mice, aged 6–8 weeks were used in all experiments and the number of animals used in each experiment performed on different time post-infection was demonstrated in the flowchart.

n = number of animals, BLI = Bioluminescence imaging, LN = lymph nodes.
(TIF)

S2 Fig. Black ink inoculation via oral or intranasal cavity. Oral and intranasal inoculations were performed using black ink suspension. Animals were analyzed after 5 min of inoculation, the nasomaxillary region; tongue and nasal cavity were removed. To evaluate the nasal cavity we removed the hard and soft palate exposing nasal septum and nasal cavity (n = 2).
(TIF)

S3 Fig. Bioluminescence of Dm28c-luc *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *In vitro* activity of luciferase of *Trypanosoma cruzi* Dm28c-luc strain. In a 24-well plate, 5×10^4 trypomastigotes were plated with D-luciferin (black circle) and negative control with medium RPMI with 10% FBS (white circle). 150 µg / ml of D-luciferin substrate was added to the well and after 5 min of incubation, image was acquired by IVIS Lumina system (Xenogen Corp., CA, USA). The scale bar for radiance (below) was correlated with the signal intensity, where red indicates higher signal and blue indicates a lower signal. Maximum and minimum signals are indicated at the top at the right and left of the scale bar, respectively.
(TIF)

S4 Fig. Ex vivo evaluation of dissected organs and tissues from non-infected mice by bioluminescence imaging. Organs and tissues were removed after 10 min of D-luciferin (150 mg/kg) IP administration from non-infected mice and images were acquired using IVIS Lumina II system.
(TIF)

S5 Fig. In vivo bioluminescence imaging from non-infected mice. Male BALB/c mice were inoculated with D-luciferin substrate, after 15 min of D-luciferin (150 mg/kg) IP administration images were acquired using IVIS Lumina II system. No background was visualized. The scale bar for radiance (below) was correlated with the signal intensity, where red indicates higher signal and blue indicates a lower signal. Maximum and minimum signals are indicated at the top at the right and left of the scale bar, respectively.
(TIF)

S6 Fig. Ex vivo tissues bioluminescence images from OI mice at 7 dpi. Male BALB/c mice were infected in the oral cavity (OI) with 1×10^6 trypomastigotes forms of *T. cruzi* expressing luciferase (Dm28c-luc). After 10 min of D-luciferin IP administration (150 mg/kg), organs were harvested and images were captured using an IVIS Lumina II system. *Ex vivo* tissues

bioluminescence imaging at 7 dpi of nasomaxillary region (n = 6), palate (n = 4), mandible (n = 6), tongue (n = 6), cheek muscle (n = 4), esophagus and stomach (n = 6), small intestine and large intestine (n = 6) male sex organs (n = 6), mandibular lymph nodes (n = 4), salivary gland (n = 6), brain (n = 6) and pituitary gland (n = 4), eyes (n = 6), spleen (n = 6), liver (n = 6), mesenteric fat and lymph nodes (n = 4), heart (n = 6) and lung (n = 6). In the male sex organ image, testicle and epididymal fat are located at the sides and the preputial gland in the bottom. Pituitary gland: inside white circle. The scale bar for radiance (right) was correlated with the signal intensity, where red indicates higher signal and blue indicates a lower signal. Maximum and minimum signals are indicated at the top and lower of scale bar, respectively. White arrows indicate the presence of bioluminescence.

(TIF)

S7 Fig. Ex vivo tissues bioluminescence images from OI mice at 21 dpi. Male BALB/c mice were infected in the oral cavity (OI) with 1×10^6 trypomastigotes forms of *T. cruzi* expressing luciferase (Dm28c-luc). After 10 min of D-luciferin IP administration (150 mg/kg), organs were harvested and images were captured using an IVIS Lumina II system. *Ex vivo* bioluminescence imaging at 21 dpi of nasomaxillary region (n = 6), palate (n = 4), mandible (n = 6), tongue (n = 6), cheek muscle (n = 4), esophagus and stomach (n = 6), small intestine and large intestine (n = 6) male sex organs (n = 6), mandibular lymph nodes (n = 4), salivary gland (n = 6), brain (n = 6) and pituitary gland (n = 4), eyes (n = 6), spleen (n = 6), liver (n = 6), mesenteric fat and lymph nodes (n = 4), heart (n = 6) and lung (n = 6). In the male sex organ image, testicle and epididymal fat are located at the sides and the preputial gland in the bottom. Pituitary gland: inside white circle. The scale bar for radiance (right) was correlated with the signal intensity, where red indicates higher signal and blue indicates a lower signal. Maximum and minimum signals are indicated at the top and lower scale bar, respectively. White arrows indicate the presence of bioluminescence.

(TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Christina Henriques and Mariana C. Waghabi from Oswaldo Cruz Foundation for *Trypanosoma cruzi* Dm28c-luciferase and Dm28c-GFP supply.

Author Contributions

Conceptualization: JdM.

Formal analysis: JdM DSdS.

Funding acquisition: JdM.

Investigation: DSdS JBdA BG OCM DMSVV BASM MTR LRB.

Methodology: JdM BG OCM.

Project administration: JdM.

Resources: LRG WS VCdA.

Supervision: JdM.

Validation: CB AM LRG.

Writing – original draft: DSdS JdM.

Writing – review & editing: JdM VCdA OCM CB.

References

1. Coura JR, Vinas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 465(7301):S6–7. <https://doi.org/10.1038/nature09221> PMID: 20571554
2. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010; 115(1–2):22–7. Epub 2009/08/04. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019> PMID: 19646412
3. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2010; 115(1–2):14–21. Epub 2009/11/26. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003> PMID: 19932071
4. Toso MA, Vial UF, Galanti N. [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Med Chil*. 2011; 139(2):258–66. Epub 2011/07/21. <https://doi.org/S0034-98872011000200017> PMID: 21773665
5. Sanchez LV, Ramirez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology*. 2013; 140(2):147–59. Epub 2012/09/27. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001394> PMID: 23010131
6. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(6):845–52. Epub 2012/01/13. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956> PMID: 22238161
7. Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W. [Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997; 30(2):139–44. Epub 1997/03/01. PMID: 9148337
8. Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol*. 2006; 112(1):132–3. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.11.087> PMID: 16600406
9. Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(3):296–300. Epub 2008/08/23. PMID: 18719812
10. Ferreira CS, Martinho PC, Amato Neto V, Cruz RR. Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001; 43(3):161–2. Epub 2001/07/14. PMID: 11452325
11. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas' disease as a food-borne illness. *J Food Prot*. 2009; 72(2):441–6. Epub 2009/04/09. PMID: 19350996
12. Barbosa-Ferreira JM, Guerra JA, Santana Filho FS, Magalhaes BM, Coelho LI, Barbosa M. [Cardiac involvement in Acute Chagas' Disease cases in the Amazon region]. *Arq Bras Cardiol*. 2010; 94(6):147–9. Epub 2010/07/14. PMID: 20625638
13. de Noya BA, Gonzalez ON. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop*. 151:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.004> PMID: 26066984
14. Rassi A Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375(9723):1388–402. Epub 2010/04/20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X) PMID: 20399979
15. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-Dos-Santos D, Perez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet E, Farias-de-Oliveira DA, 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*. 9(6):e0003849. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003849> PMID: 26090667
16. de Noya BA, Gonzalez ON. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop*.
17. Dias GB, Gruendling AP, Araujo SM, Gomes ML, Toledo MJ. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol*. 135(3):511–7. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.08.013> PMID: 23994765
18. Diaz-Bello Z, Thomas MC, Lopez MC, Zavala-Jaspe R, Noya O, BA DEN, et al. *Trypanosoma cruzi* genotyping supports a common source of infection in a school-related oral outbreak of acute Chagas disease in Venezuela. *Epidemiol Infect*. 142(1):156–62. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000757> PMID: 23544849
19. Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 60(1):25–32. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016> PMID: 17889480

20. Meza SK, Kaneshima EN, Silva Sde O, Gabriel M, de Araujo SM, Gomes ML, et al. Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Exp Parasitol.* 146:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.08.014> PMID: 25296157
21. Monteiro WM, Magalhaes LK, Santana Filho FS, Barborema M, Silveira H, Barbosa MD. *Trypanosoma cruzi* TcII / Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop Med Int Health.*
22. Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol.* 2009; 39(5):615–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.015> PMID: 19041313
23. Monteiro WM, Magalhaes LK, de Sa AR, Gomes ML, Toledo MJ, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One.* 7(7):e41284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041284> PMID: 22848457
24. Ramirez JD, Montilla M, Cucunuba ZM, Florez AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(2):e2041. <https://doi.org/10.1371/journal.ptnd.0002041> PMID: 23437405
25. Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhaes JB, Almeida MC, et al. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(8):948–56.
26. Kirchhoff LV, Hoft DF. Immunization and challenge of mice with insect-derived metacyclic tryptomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1990; 12(1):65–74. PMID: 2107500
27. Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun.* 1996; 64(9):3800–10. Epub 1996/09/01. PubMed Central PMCID: PMC174296. PMID: 8751932
28. Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotype in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002; 44(2):97–103. Epub 2002/06/06. PMID: 12048547
29. Cortez M, Neira I, Ferreira D, Luquetti AO, Rassi A, Atayde VD, 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. Epub 2003/10/24. PubMed Central PMCID: PMC219548. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6184-6191.2003> PMID: 14573635
30. Collins MH, Craft JM, Bustamante JM, Tarleton RL. Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8(+) T cell response and protection against heterotopic challenge. *Infect Immun.* 2011; 79(8):3397–406. Epub 2011/06/02. PubMed Central PMCID: PMC3147593. <https://doi.org/10.1128/IAI.01080-10> PMID: 21628516
31. 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. Epub 2007/07/21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.05.013> PMID: 17640647
32. de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential regional immune response in chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(7):e417. <https://doi.org/10.1371/journal.ptnd.0000417> PMID: 19582140
33. de Meis J, Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, 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. *Frontiers in Immunology.* 2013; 4(216):1–7. Epub 2013/07/26.
34. Hutchens M, Luker GD. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell Microbiol.* 2007; 9(10):2315–22. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00995.x> PMID: 17587328
35. Henriques C, Castro DP, Gomes LH, Garcia ES, de Souza W. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors.* 5:214. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-214> PMID: 23013827
36. Hyland KV, Asfaw SH, Olson CL, Daniels MD, Engman DM. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Parasitol.* 2008; 38(12):1391–400. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.04.002> PMID: 18511053
37. Henriques C, Henriques-Pons A, Meuser-Batista M, Ribeiro AS, de Souza W. In vivo imaging of mice infected with bioluminescent *Trypanosoma cruzi* unveils novel sites of infection. *Parasit Vectors.* 7:89. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-89> PMID: 24589192

38. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7):1051–4. PMID: 20027478
39. Ramirez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velazquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. J Mol Diagn. 2015; 17(5):605–15. PubMed Central PMCID: PMC4698797. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010> PMID: 26320872
40. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. Mol Biochem Parasitol. 1999; 100(2):163–72. Epub 1999/07/03. PMID: 10391378
41. Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, 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. PubMed Central PMCID: PMC2886048. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000711> PMID: 20559542
42. Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991; 33(5):351–7. PMID: 1844961
43. 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. <https://doi.org/10.1086/651608> PMID: 20307205
44. da Silva NN, Clausell DT, Nolibos H, de Mello AL, 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. PMID: 4178818
45. de Noya BAN O.; Robertson L. J. *Trypanosoma cruzi* as a foodborne pathogen: Springer 2015. 92 p.
46. Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 Suppl 1:101–7.
47. Staquicini DI, Martins RM, Macedo S, Sasso GR, Atayde VD, Juliano MA, 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. Epub 2010/03/09. PubMed Central PMCID: PMC2830468. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000613> PMID: 20209152
48. Marsden PD. *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. II. Infections induced by different routes. Ann Trop Med Parasitol. 1967; 61(1):62–7. Epub 1967/03/01. PMID: 6051540
49. Caradonna K, Pereiraperrin M. Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun. 2009; 77(4):1349–56. <https://doi.org/10.1128/IAI.01434-08> PMID: 19168740
50. 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.
51. Añez N, Crisante G, Rojas A, Dávila D. Acute Chagas disease outbreak of possible oral transmission in Merida, Venezuela. Boletín de malariología y salud ambiental. 2013; LIII(1):1–11.
52. Añez 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. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.12.010> PMID: 21215250
53. Wu RQ, Zhang DF, Tu E, Chen QM, 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. PubMed Central PMCID: PMC4170154. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.48> PMID: 25105816
54. Lakdawala SS, Jayaraman A, Halpin RA, Lamirande EW, Shih AR, Stockwell TB, et al. The soft palate is an important site of adaptation for transmissible influenza viruses. Nature. 2015; 526(7571):122–5. PubMed Central PMCID: PMC4592815. <https://doi.org/10.1038/nature15379> PMID: 26416728
55. Freire-de-Lima L, Fonseca LM, Oeltmann T, Mendonca-Previato L, Previato JO. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. Glycobiology. 2015; 25(11):1142–9. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv057> PMID: 26224786
56. Butler CE, de Carvalho TM, Grisard EC, Field RA, Tyler KM. Trans-sialidase stimulates eat me response from epithelial cells. Traffic. 2013; 14(7):853–69. PubMed Central PMCID: PMC3770925. <https://doi.org/10.1111/tra.12078> PMID: 23601193
57. Barrias ES, de Carvalho TM, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. Front Immunol. 2013; 4:186. PubMed Central PMCID: PMC3730053. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00186> PMID: 23914186

58. Giddings OK, Eickhoff CS, Smith TJ, Bryant LA, Hoft DF. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. *Infect Immun.* 2006; 74(10):5549–60. PubMed Central PMCID: PMC1594886. <https://doi.org/10.1128/IAI.00319-06> PMID: 16988230
59. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.08.015> PMID: 16494952
60. Roggero E, Perez AR, Bottasso OA, Besedovsky HO, Del Rey A. Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1153:264–71. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03982.x> PMID: 19236349
61. Roggero E, Perez AR, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Besedovsky HO, et al. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol.* 2006; 190(2):495–503. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06642> PMID: 16899582
62. Carvalho LO, Abreu-Silva AL, Hardoim Dde J, Tedesco RC, Mendes VG, da Costa SC, 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. PubMed Central PMCID: PMC2669618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00592.x> PMID: 19200251
63. Carvalho TL, Ribeiro RD, Lopes RA. 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. PMID: 1906405
64. Lenzi HL, Castelo-Branco MT, Pelajo-Machado M, Oliveira DN, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. *Acta Trop.* 1998; 71(2):117–29. PMID: 9821461
65. Lenzi HL, Oliveira DN, Lima MT, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp Parasitol.* 1996; 84(1):16–27. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0086> PMID: 8888730
66. Lamano Carvalho TL, Ferreira AL, Sahao MA. [Changes in the human testis in Chagas' disease. II. Morphometric study of the interstitial tissue]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1982; 24(4):214–21. PMID: 6818666
67. Lamano Carvalho TL, Ferreira AL, Sahao MA. [Changes in the human testis in Chagas' disease. I. Evaluation of the kinetics of the spermatogenesis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1982; 24(4):205–13. PMID: 6818665
68. Haddad J, Raia A. [Sexual changes after surgical treatment of congenital acquired megacolon]. *AMB Rev Assoc Med Bras.* 1969; 15(12):509–12. PMID: 4984967
69. Hartz PH, Toledano D. Specific orchitis in Chagas's disease. *Doc Med Geogr Trop.* 1954; 6(2):124–30. PMID: 13182980
70. Martin DL, Lowe KR, McNeill T, Thiele EA, Roellig DM, Zajdowicz J, et al. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop.* 2015; 149:15–8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.002> PMID: 25982870
71. Ribeiro M, Nitz N, Santana C, Moraes A, Hagstrom L, Andrade R, et al. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol.* 2016; 162:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.12.017> PMID: 26724377

RESEARCH ARTICLE

Trypanosoma cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?

Juliana Barreto-de-Albuquerque¹, Danielle Silva-dos-Santos¹, Ana Rosa Pérez², Luiz Ricardo Berbert¹, Eliane de Santana-van-Vliet¹, Désio Aurélio Farias-de-Oliveira¹, Otacilio C. Moreira³, Eduardo Roggero², Carla Eponina de Carvalho-Pinto⁴, José Jurberg⁵, Vinícius Cotta-de-Almeida¹, Oscar Bottasso², Wilson Savino¹, Juliana de Meis^{1*}

1 Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Immunology Institute, Faculty of Medical Science, National University of Rosario, Rosario, Argentina, **3** Laboratory on Molecular Biology and Endemic Diseases, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Laboratory on Experimental Pathology, Immunobiology Department, Federal Fluminense University, Niteroi, Brazil, **5** National and International Laboratory on Triatomine Taxonomy, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

* jdeimeis@ioc.fiocruz.br



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet Ed, Farias-de-Oliveira DA, et al. (2015) *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? PLoS Negl Trop Dis 9(6): e0003849. doi:10.1371/journal.pntd.0003849

Editor: Helton da Costa Santiago, Universidade Federal de Minas Gerais, BRAZIL

Received: February 2, 2015

Accepted: May 26, 2015

Published: June 19, 2015

Copyright: © 2015 Barreto-de-Albuquerque et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ-Grant E-26/103.249/2011) and Brazilian National Research Council (CNPq-Grant 479431/2011-6) to JdM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Oral transmission of Chagas disease has been documented in Latin American countries. Nevertheless, significant studies on the pathophysiology of this form of infection are largely lacking. The few studies investigating oral route infection disregard that inoculation in the oral cavity (Oral infection, **OI**) or by gavage (Gastrointestinal infection, **GI**) represent different infection routes, yet both show clear-cut parasitemia and heart parasitism during the acute infection. Herein, BALB/c mice were subjected to acute **OI** or **GI** infection using 5×10^4 culture-derived *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **OI** mice displayed higher parasitemia and mortality rates than their **GI** counterparts. Heart histopathology showed larger areas of infiltration in the **GI** mice, whereas liver lesions were more severe in the **OI** animals, accompanied by higher Alanine Transaminase and Aspartate Transaminase serum contents. A differential cytokine pattern was also observed because **OI** mice presented higher pro-inflammatory cytokine (IFN-γ, TNF) serum levels than **GI** animals. Real-time PCR confirmed a higher TNF, IFN-γ, as well as IL-10 expression in the cardiac tissue from the **OI** group compared with **GI**. Conversely, TGF-β and IL-17 serum levels were greater in the **GI** animals. Immunolabeling revealed macrophages as the main tissue source of TNF in infected mice. The high mortality rate observed in the **OI** mice paralleled the TNF serum rise, with its inhibition by an anti-TNF treatment. Moreover, differences in susceptibility between **GI** versus **OI** mice were more clearly related to the host response than to the effect of gastric pH on parasites, since infection in magnesium hydroxide-treated mice showed similar results. Overall, the present study provides conclusive evidence that the initial site of parasite entrance critically affects host immune response and disease outcome. In light of the occurrence of oral Chagas disease outbreaks, our results raise important implications in terms of the current view of the natural disease course and host-parasite relationship.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

Chagas disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* is endemic in Latin America and a neglected tropical disease, which affects 6–7 million people worldwide. Currently, oral transmission is the most frequent pathway of infection in Brazil but also occurs in other endemic countries. This important infection route is underestimated and understudied. Here, we demonstrate that the site of parasite entrance, in the oral cavity (OI), as observed in natural infection, or directly to the gastrointestinal tract (GI), differentially affects the host-immune response and mortality. OI promotes a severe acute disease, elevated parasitemia and TNF mediated mortality. OI showed intense hepatitis and mild heart damage. Interestingly, GI mice presented mild disease, along with less circulating TNF and higher TGF- β and IL-17 serum contents. GI animals showed mild liver damage and intense heart inflammation. Our study is a pioneer work that analyzes the features of two distinct routes of oral infection. In addition, it provides new clues for Chagas pathology and stimulates background for the elucidation of disease features in orally exposed populations.

Introduction

Chagas disease (American trypanosomiasis), caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects 6–7 million people worldwide, with an annual incidence of 28 thousand cases in the Americas [WHO, 2015]. Chagas disease is endemic in 21 countries in Latin America and was previously confined to this region. However, it has spread to other continents due to the migration of infected people [1]. Transmission to humans occurs through excreta deposition after biting of contaminated insect vectors belonging to the *Reduviidae* family, blood transfusion, organ transplantation, laboratory accident as well as congenitally and orally [2,3].

The first case of *T. cruzi* oral transmission in Brazil was reported in 1965 in Teotonia, Rio Grande do Sul [4]. Since then, outbreaks of orally transmitted Chagas disease have occurred in several Brazilian states, such as Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Pará, Paraíba, Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Although underestimated, oral transmission of Chagas disease was responsible for more than 739 cases in the Pará State in legal Amazônia, Brazil (1986–2012); 369 cases in Venezuela (2007–2009); 45 cases in Colombia (2008–2010); 14 cases in Bolivia (2010), and orally transmitted Chagas disease was reported in Argentina and Ecuador [5,6,7,8,9,10,11]. All of these outbreaks were associated with food/beverages consumption like: wild infected animal meat, vegetables, sugar cane extract, açaí pulp, goiaba juice, bacaba, babaçu and vino de palma [5,12,13,14]. Interestingly, oral transmission of Chagas disease is currently the most important transmission pathway in the Brazilian Amazon after the pan-American Health Organization declared the interruption of vectorial transmission in this area [6]. In past years, the proportion of orally infected patients has increased. From 1968 to 2000, 50% of acute cases in the Amazon region were attributed to oral transmission,[9] and between 2000–2010, the rate reached 70% [7]. Furthermore, wild strains of the parasite in oral transmission lead to cardiac involvement in patients in the Amazon region [14,15,16,17]. Mortality rates in these orally infected patients are higher (8–35%) when compared with the classical vectorial transmission through triatomine excreta deposition after biting (<5–10%) [18]. Despite this, there are controversies about mortality rates, because oral transmission gained more attention after outbreaks over the years. Previous studies suggested that metacyclic trypomastigotes are more infective by oral than cutaneous challenge, emphasizing the higher severity of oral infection [19].

The common immunological knowledge of experimental *T. cruzi* infection comes from studies with intraperitoneal/ subcutaneous infected mice [20,21]. Although relevant, there are

few reports regarding *T. cruzi* oral transmission in the literature. Some authors have demonstrated parasite-mucosa interaction and few aspects of immune response and disease outcome after intragastric, pharyngeal or oral cavity parasite challenge. These models of oral *T. cruzi* infections result in parasitemia and heart parasitism, which indicates systemic infection [22,23,24,25,26]. In addition, *T. cruzi* glycoproteins (e.g., gp82) seem to bind gastric mucin, promoting invasion and replication in epithelial cells from the gastric mucosa [27]. This initial invasion is related to the establishment of a progressive gastritis and allowing further systemic dissemination of the parasite. Nonetheless, the short replication period at this mucosal site induces specific immunity, as protection was observed after a secondary mucosal challenge, involving the production of IgA and IgG antibodies [23]. Interestingly, humoral and cellular responses are also protective after parasite inoculation in the conjunctival mucosa, a natural portal of entry for *T. cruzi* that leads to nasal infection with subsequent systemic spreading [28]. In orally infected mice, inflammatory infiltrates are observed in several tissues, such as the pancreas, spleen, liver, bone marrow, heart, duodenum, adrenal glands, brain and skeletal muscle [23]. Moreover, it was suggested that intraepithelial and lamina propria lymphocytes are involved in IFN- γ , but not IL-4 production, in orally infected hosts [23]. Interestingly, this infection route does not affect CD8 $^{+}$ T cell response [26]. Following disease outbreaks caused by food contamination with *T. cruzi*, a clear increase in the severity of clinical manifestations was observed in these infected patients compared with other types of transmission routes [9,18]. These observations raise important questions concerning the particular features of *T. cruzi* entry via the mucosa, including the possible modulation of local immune mechanisms and the impact on regional and systemic immunity [20,21]. Herein, we demonstrate that the site of parasite entrance, through the oral cavity (as observed in natural infection- **OI**) or directly into the stomach (**GI**), differentially affects host immune response and mortality. In this study, we demonstrate that a highly severe acute disease follows in mice subjected to **OI**, compared with **GI**. They presented elevated parasitemia, high TNF serum levels, hepatitis and mild carditis, as well as a high mortality rate, which were partly reverted by anti-TNF therapy. This pioneer study approaches two distinct routes of oral infection that not only provides new clues for understanding Chagas pathology but also stimulates background for the elucidation of disease features in orally exposed populations.

Results

OI-infected mice present higher parasitemia and mortality compared with GI infection

BALB/c mice were infected with the highly virulent *T. cruzi* Tulahuén strain (DTU- TcVI). In order to assess whether the route of infection interferes in the course of infection, infectivity, mortality and parasitemia were analyzed in intragastrically (**GI**), oral cavity/orally (**OI**) or intraperitoneally (**IP**) infected mice (Fig 1A and 1B and S1 Fig). IP infection, with 5×10^4 trypomastigotes promoted elevated infectivity, parasitemia and mortality (Figs 1 and S1). Regarding the mucosal pathway of infection, **OI** mice were more susceptible to *T. cruzi* infection than **GI** mice, with higher parasitemia, mortality (Fig 1A and 1B) and infectivity (97.5% and 49.3%, respectively) (S1 Fig).

Differences in the infectivity rate may be associated with the low stomach pH, affecting parasite burden or its molecules. In our model of infection, mice were kept without water and food for 4 hours, and at that moment, the gastric pH was 3 and the oral cavity pH was 5. Treatment with the antacid Magnesium Hydroxide ($Mg(OH)_2$ Phillips—19.4 mg/Kg) immediately neutralized the stomach pH to 7 and maintained the gastric pH at 5 for 30 minutes. In our study, differences in parasitemia observed between **GI** and **OI** could not be attributed to the acidic

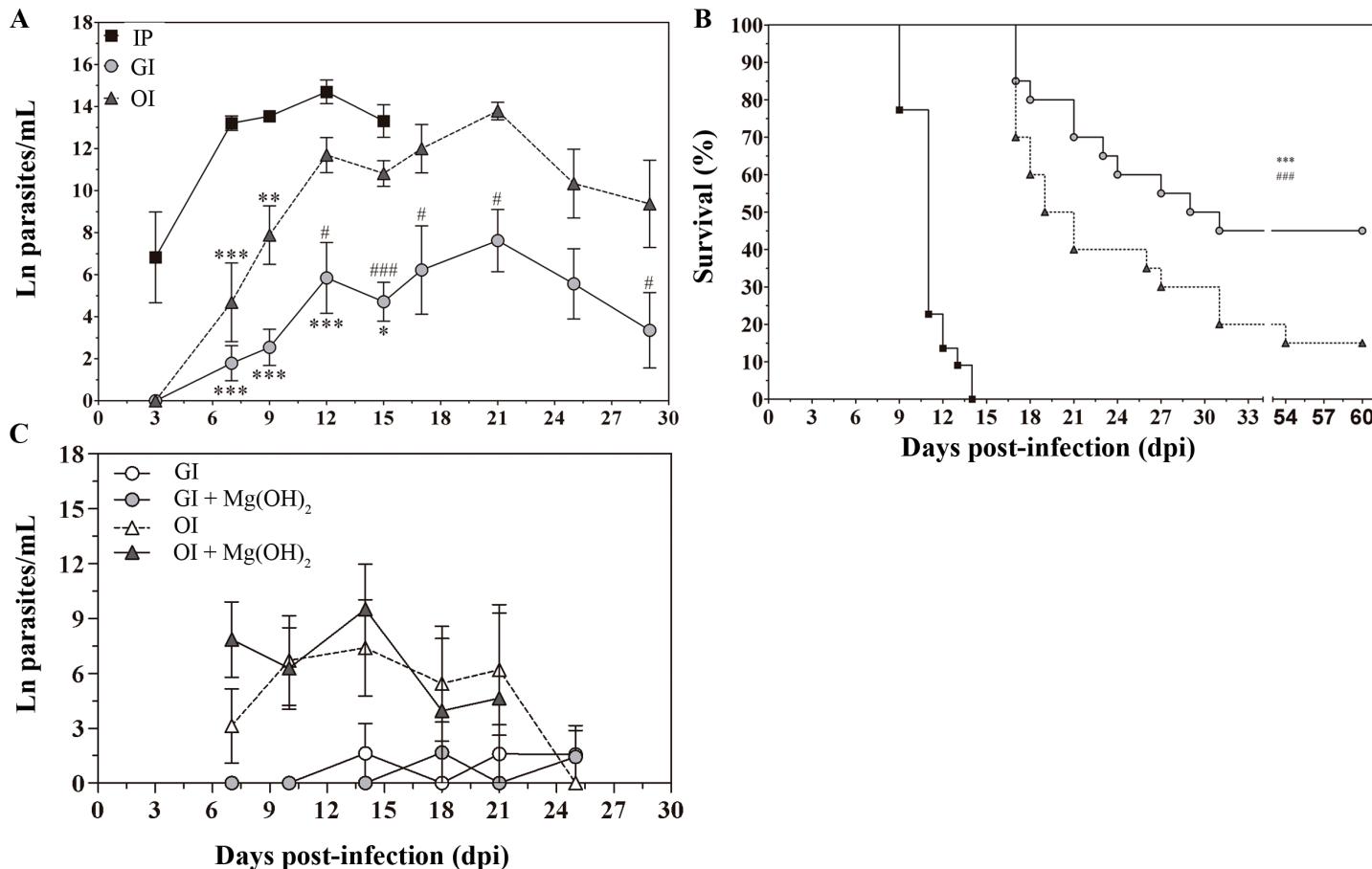


Fig 1. Severity of acute *T. cruzi* infection is higher in orally infected mice. A/B) Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Tulahuen strain) through gavage (GI) or oral cavity (OI). C) GI and OI *T. cruzi* inoculation was performed with antacid (Magnesium Hydroxide suspension, 19.4 mg/Kg) or medium. A/C) Parasitemia (mean and SEM) was assessed during the acute phase and expressed as ln parasites per milliliter for statistical analysis. Parasites were counted by light microscopy, and parasitemia calculated by the Brener method. Parasitemia comparisons were performed at different days post-infection (dpi), Kruskal-Wallis, Dunn's post-test (until 15 dpi) and one-tailed Mann-Whitney (after 15 dpi) tests were used. A) n: IP, 3 dpi = 3, 7 dpi = 17, 9 dpi = 10, 12 dpi = 5, 15 dpi = 3; GI, 3 dpi = 7; 7 dpi = 22; 9 dpi = 29; 12 dpi = 17; 15 dpi = 10; 17 dpi = 21; 21 dpi = 24; 25 dpi = 16; 29 dpi = 11 and OI, 3 dpi = 4; 7 dpi = 9; 9 dpi = 14; 12 dpi = 22; 15 dpi = 40; 17 dpi = 12; 21 dpi = 14; 25 dpi = 8; 29 dpi = 6. Lower numbers represent early stages, when parasitemia was still undetectable and final stages, when mortality rates were too high. The total number was obtained from different experiments. * represent differences in comparison to IP and #, differences between GI and OI. C) GI = 7 and OI = 7 from Mg(OH)₂ treated mice and controls. B) Mortality was followed and survival was analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) (*) and Gehan-Breslow-Wilcoxon (#) tests. n = 20 mice (equivalent to 100%). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. * p = 0.05; ** p = 0.01; *** p = 0.001.

doi:10.1371/journal.pntd.0003849.g001

gastric pH in the mucosa because the Mg(OH)₂ suspension addition at the time of inoculation (pH = 7) in both experimental groups did not interfere with blood-parasite burden (Fig 1C). Antacid treatment five minutes before infection showed similar results.

Taken together, our data clearly demonstrate that *T. cruzi* trypomastigote exposure in the oral cavity leads to a highly severe acute disease in mice. Moreover, although GI and OI are considered similar mucosal infection routes, their pattern of host response is not the same.

GI-infected mice present more extensive cardiac tissue compromise, whereas OI infection leads to significant hepatic lesions

The myocardium is one of the most affected tissues during *T. cruzi* infection in patients [18]. As we observed that different inoculation routes could distinctly affect acute phase severity, a

histopathological analysis of heart sections was performed in 3, 9, 15, 21 and 25 dpi (days post-infection). At initial stages of infection (3–9 dpi), scarce infiltration is observed in the pericardium of both GI and OI groups ([S3 Table](#)). Nevertheless, inflammatory infiltration was significantly higher in the GI-infected mice than in OI after 15 dpi, affecting both the pericardium and the myocardium (Fig 2A and 2B and [S3 Fig](#)). Mild collagen deposition was observed in both groups when compared with uninfected mice ([S3 Fig](#)).

In conformity with previous studies in these experimental models, IP-infected mice showed extensive inflammatory infiltration in the heart throughout the course of the acute phase [[29](#)]. As observed in [Fig 2](#), both groups showed a similar profile of infiltrating cells (CD4 and CD8 cells, F4/80⁺ macrophages and Ly6G⁺ neutrophils).

Orally administered drugs/antigens are usually absorbed by the gastro-intestinal tract and transported to the lymphatic or hepatic portal system [[30](#)]. Moreover, the liver is known to be a target tissue for the parasite and plays a role in clearance of blood trypomastigotes [[31](#)]. As such, the liver may be involved with acute phase development in an orally infected host. To test this hypothesis, a comparative analysis of hepatic sections between GI and OI infected mice was necessary. As judged by liver histopathological analysis in 3, 9, 15–17, 25 dpi, OI promoted severe hepatitis. During the initial stages of infection (3–9 dpi), hepatic infiltrates showed mild intensity mainly around the small and medium size vessels and it was higher in OI than GI. As the infection develops (15–17 dpi), infiltration notably increased also affecting the parenchyma in both OI and GI mice ([Fig 3A](#) and [S4 Table](#)). Amastigote nests were rarely detected in the liver. Moreover, it was evident that medium vessels with blood stasis and suggestive formation of thrombotic masses occurred mainly in the OI-infected mice ([S4 Table](#)). Picrossirius Red staining revealed progressive deposits of collagen in blood vessel walls, mainly in OI infected mice ([S4 Table](#)). Immunofluorescence analysis from two different lobes showed that the inflammation was mainly composed by F4/80⁺ macrophages. However, CD4⁺ cells, CD8⁺ cells and Ly6G⁺ neutrophils were also observed ([Fig 3B](#)). Furthermore, the OI group presented hepatic damage given the increased ALT and AST serum levels (17 dpi). Apoptotic (TUNEL⁺) cells were also detected in the inflammatory infiltrate and at the parenchyma at 16 dpi (Figs 3C and [S4](#)).

The pattern of cytokine secretion is distinct between OI and GI infected mice

In immune response to infection, Th1, Th2, Th17 and regulatory cytokines play an important role in the control of parasite and disease development [[32](#)]. To investigate the impact of the route of infection on systemic cytokine levels, a thorough multiplex analysis was performed. As demonstrated in [Fig 4](#), OI mice showed higher type 1 cytokines levels, i.e., IFN- γ (3 dpi) and TNF (12, 17 dpi) but also IL-10 (17 dpi), than GI mice. Conversely, IL-17 (3 dpi) and the regulatory cytokine TGF- β (12 dpi) was increased in GI mice ([Fig 4](#)). Elevated levels of pro-inflammatory cytokines are also associated with cardiac tissue damage [[32](#)]. In order to analyze cytokine presence in the cardiac tissue of infected mice, real time PCR was performed for IFN- γ , TNF, IL-10 and TGF- β cytokines. Interestingly, IFN- γ , TNF, and IL-10 gene expression was increased in the OI group ([Fig 4](#)). Moreover, TNF increase was evident in OI mice, but not GI mice ([Fig 4B](#)).

TNF production in the heart and liver

Immunofluorescent staining from heart and liver samples of 16 dpi mice showed the presence of TNF in these tissues. TNF labeling was evident in inflammatory cells, mainly in macrophages (Figs 5 and [S2](#)). OI hepatic sections presented a higher number of macrophages than

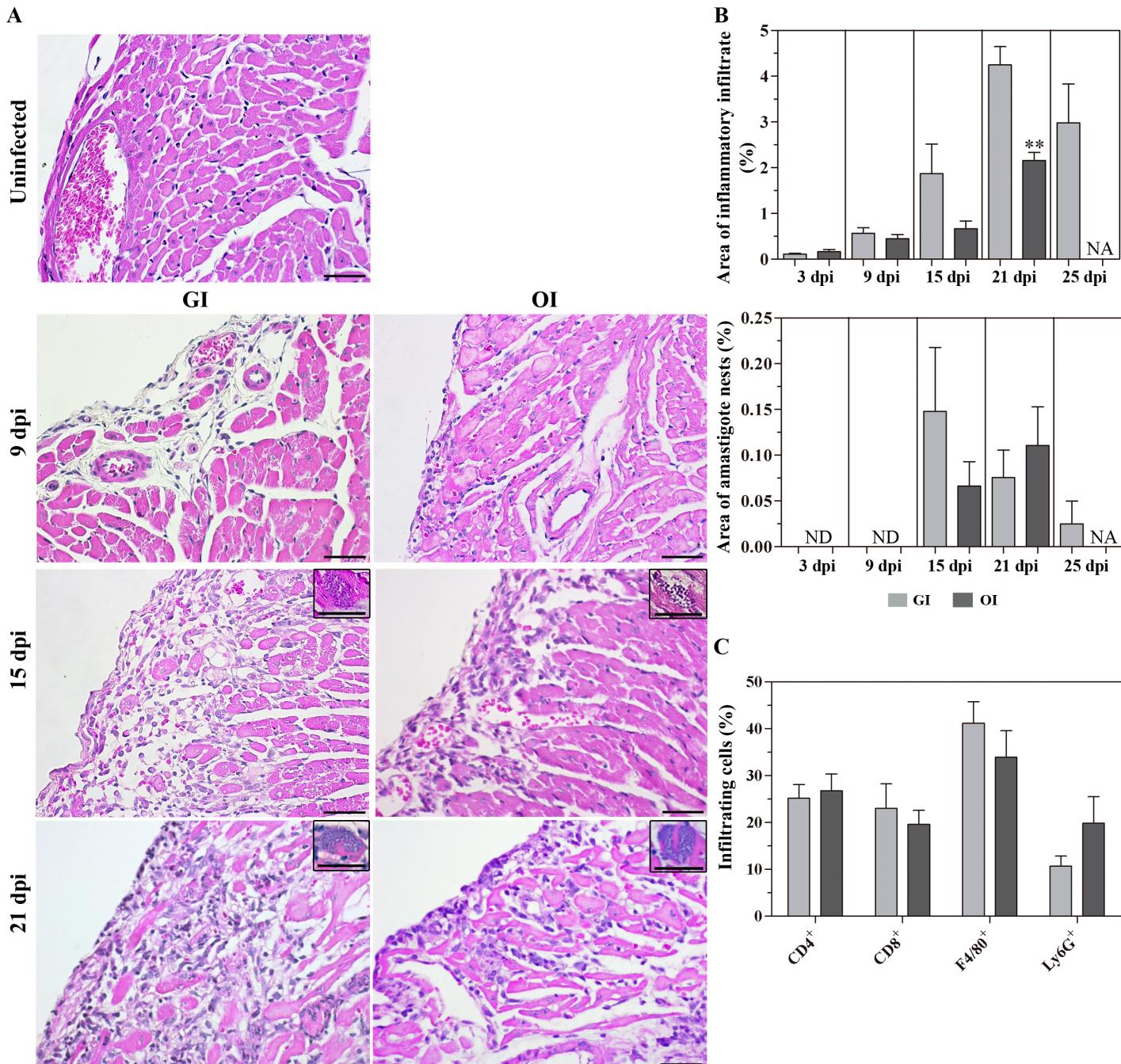


Fig 2. Hearts of GI infected mice are more inflamed than the OI infected mice. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Tulahuen strain) through gavage (GI) or oral cavity (OI). Hearts were harvested at different days post-infection (dpi), fixed and embedded in paraffin. A) Histological longitudinal sections were stained by Hematoxylin-Eosin. For the quantification of inflammatory infiltrate and amastigote nests in heart tissue, a relative area of infiltrate/or amastigote nests from 50 fields (400X) was analyzed. Pictures represents cells-rich infiltrated areas. B) Values are the mean \pm SEM. n = 4–5 mice/dpi/group. *GI versus OI. C) Immunofluorescence analyses demonstrating the percentage of each subset present within the tissue after 16/17 dpi, CD4⁺, CD8⁺, F4/80⁺ and Ly6G⁺ cells. Numbers represent mean \pm SEM. n = 3 mice/group (two different sections from each mouse). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. Comparison between GI and OI groups was performed by using one-tailed Mann-Whitney test. * p = 0.05; **p = 0.01; ***p = 0.001. dpi, days post-infection. UI, uninfected. N.A., not analyzed. Bars represent 20 μ m. Insets show amastigote nests.

doi:10.1371/journal.pntd.0003849.g002

A

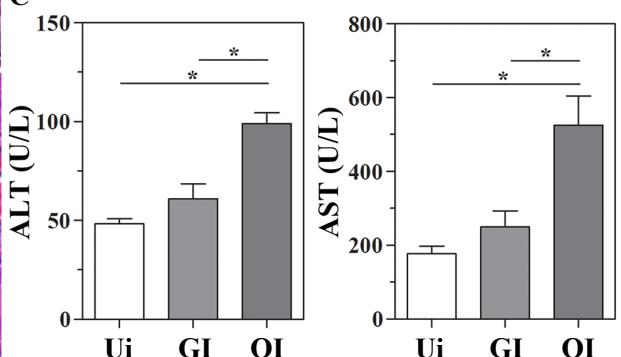
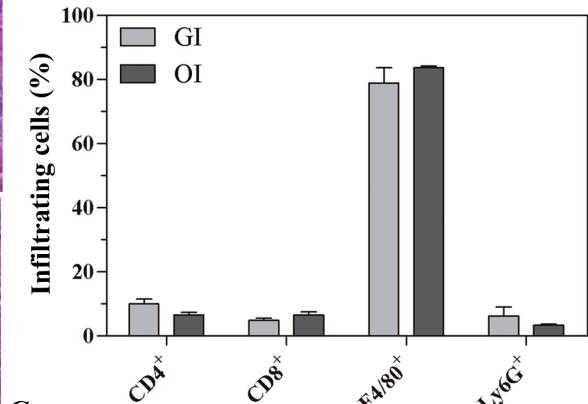
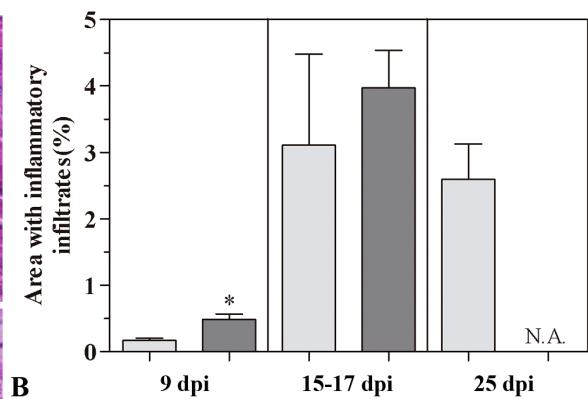
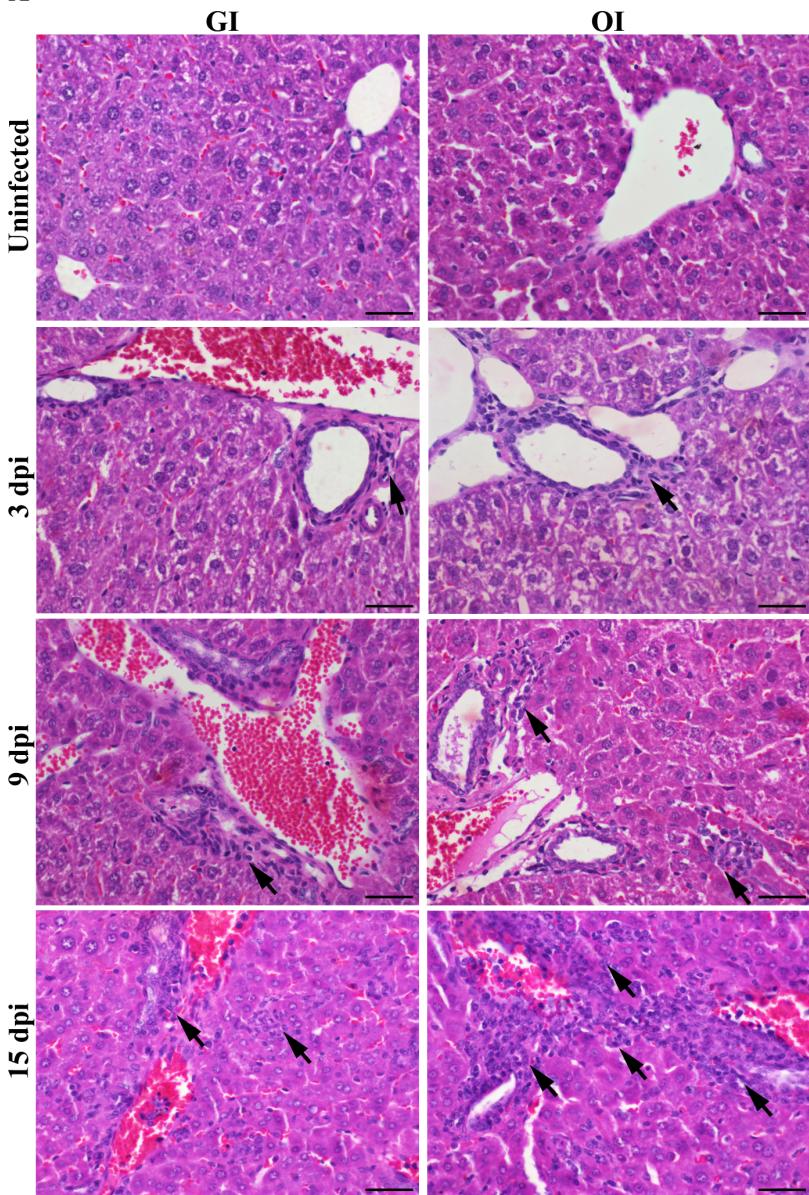
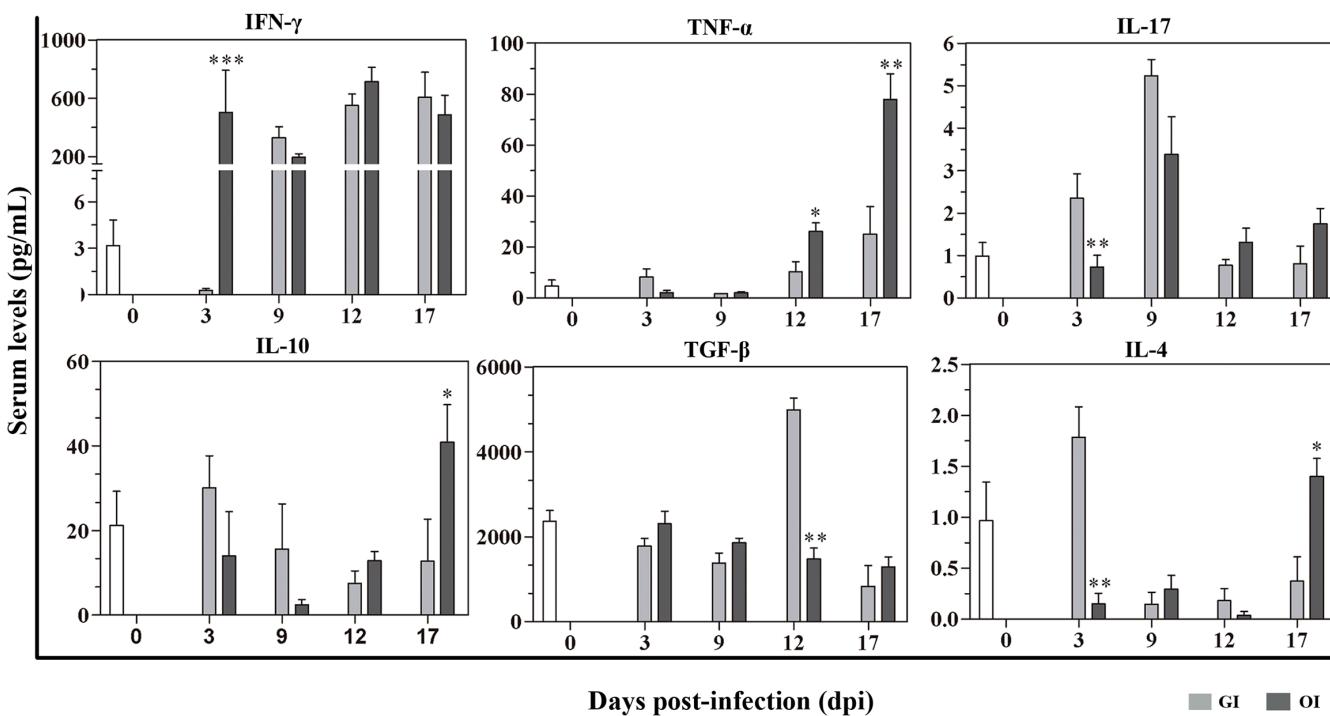


Fig 3. Liver histology during acute *Trypanosoma cruzi* infection after GI and OI inoculation. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Tulahuén strain) through gavage (GI) or within oral cavity (OI). A) Hematoxylin and Eosin stained sections demonstrating liver histological lesions in terms of inflammatory foci. For the quantification of inflammatory infiltrate, the relative area of infiltration from 25 fields (200X) was analyzed. Pictures represent cells-rich infiltrated areas. n: GI, 9 dpi = 4, 15–17 dpi = 4, 25 dpi = 5; OI, 9 dpi = 4, 15–17 dpi = 9. B) Immunofluorescence analyses demonstrating the percentage of each subset present within the tissue after 16/17 dpi, CD4⁺, CD8⁺, F4/80⁺ and Ly6G⁺ cells. Numbers represent mean \pm SEM. n = 3 mice/group (two different section from each mouse). C) ALT and AST activity (17 dpi) in sera. All statistical analyses were performed using one-tailed Mann-Whitney test, GraphPad Prism 5. Comparison between GI and OI groups, and each one of them with uninfected mice. *, p = 0.05; **, p = 0.01; ***, p = 0.001. Bars represent 20 μ m. Arrows show inflammatory infiltrates.

doi:10.1371/journal.pntd.0003849.g003

A



B

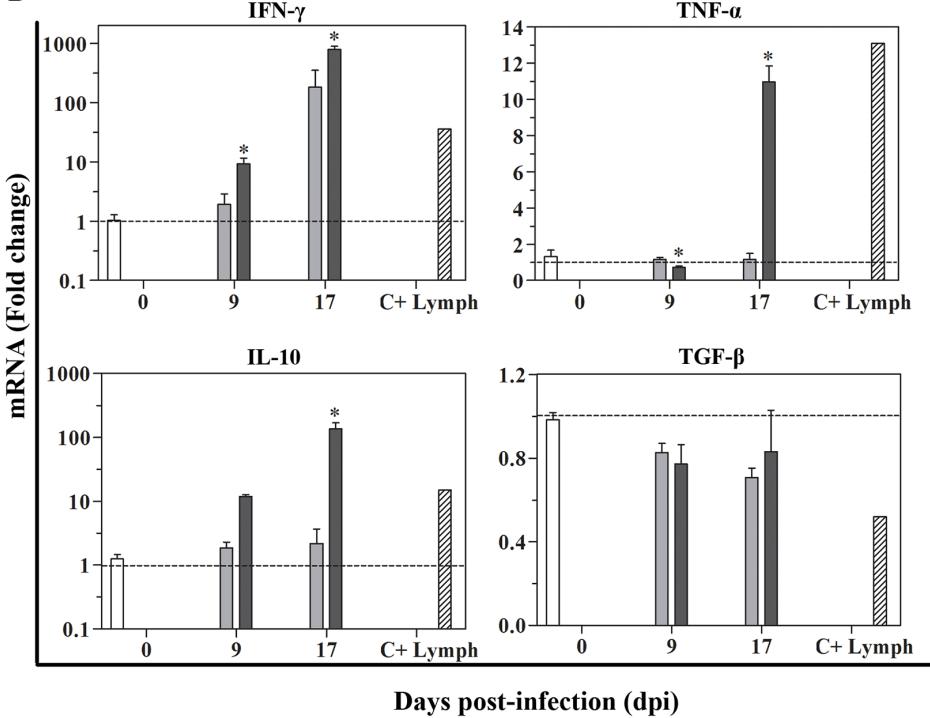


Fig 4. Cytokine production in GI and OI infected mice. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Tulahuén strain) through gavage (GI) or within oral cavity (OI). A) In the course of acute infection, serum was isolated and levels of cytokines (IFN- γ , TNF, IL-17, IL-10 and TGF- β) were quantified in uninfected control and infected mice by a multiplex analysis. The results are expressed as the mean values (\pm SEM) for each group/day post-infection. n: IFN- γ , uninfected (0) = 12; 3 dpi GI = 11, OI = 5; 9 dpi GI = 8, OI = 5; 12 dpi GI = 9, OI = 4; 17 dpi GI = 4, OI = 6. TNF, uninfected (0) = 11; 3 dpi GI = 10, OI = 10; 9, 12 dpi, GI = 3, OI = 3; 17 dpi, GI = 6, OI = 11. IL-17, uninfected (0) = 12; 3 dpi, GI = 10, OI = 10; 9 dpi, GI = 3, OI = 3; 12 dpi, GI = 5, OI = 5; 17 dpi, GI = 6, OI = 14. TGF- β , uninfected (0) = 6; 3 dpi, GI = 4, OI = 4; 9 dpi, GI = 5, OI = 5; 12 dpi, GI = 5, OI = 4; 17 dpi, GI = 2,

OI = 5. IL-10 and IL-4, uninfected (0) = 6; 3, 9, 12 dpi, GI = 6, OI = 6; 17 dpi, GI = 3, OI = 8. B) Cytokine gene expression levels were performed by RT-qPCR. Total RNA was isolated from the heart at different days post-infection, and the reaction was performed using SYBR Green Master Mix. HPRT and β -actin were used as housekeeping genes. RT-qPCR data were normalized to the housekeeping genes, and fold changes were determined compared with uninfected controls, using the Expression Suite software. Lymphocytes from subcutaneous lymph nodes of infected mice were stimulated with anti-CD3 and used as positive control of cytokines production (C+ Lymph). Statistical analysis was performed using ΔCt values. n: uninfected (0) = 5–9; 9 dpi GI = 3, OI = 2–3; 17 dpi GI = 2–3, OI = 2–3. Both sets of data were analyzed using one-tailed Mann-Whitney test, GraphPad Prism 5. *, p = 0.05; **, p = 0.01; ***, p = 0.001. *GI versus OI. Kruskal-Wallis (Dunn's post-test) for group kinetics: A) IFN- γ , TNF and IL-10 increased in both groups compared with uninfected. IL-17 presented a non-significant increase followed by decrease. TGF- β was only elevated in GI group at 12 dpi in sera. B) IFN- γ increased in both groups compared with uninfected. TNF and IL-10 increased in OI whereas TGF- β decreased in GI.

doi:10.1371/journal.pntd.0003849.g004

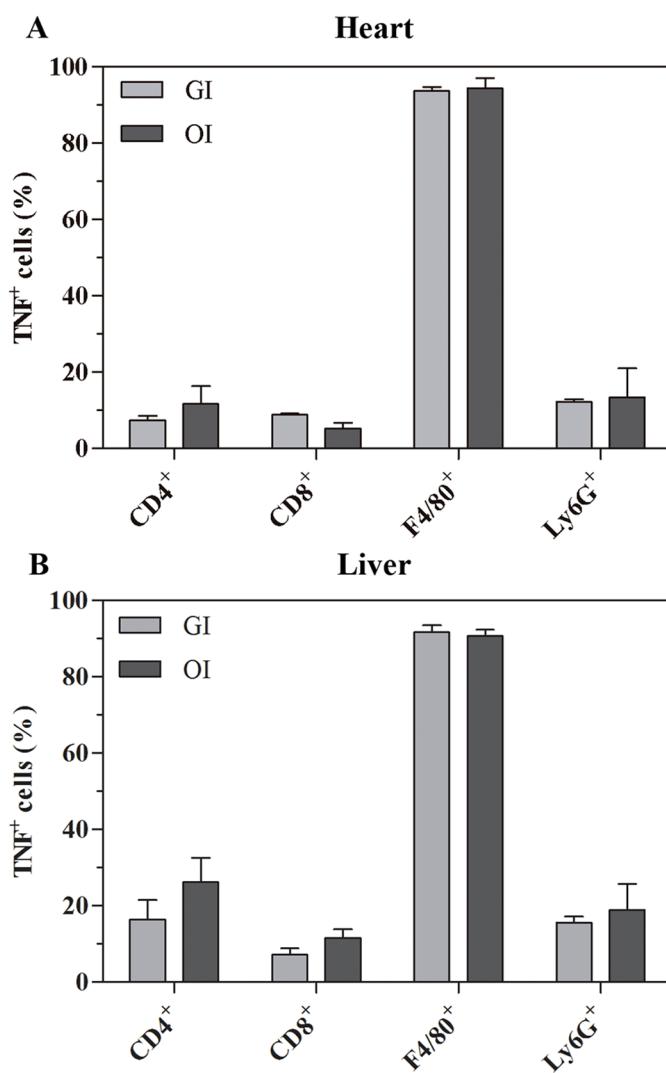


Fig 5. F4/80⁺ cells are the major TNF-producing cells. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Tulahuén strain) through gavage (GI) or within oral cavity (OI). Immunofluorescence analyses demonstrated the percentage of TNF-producing cells among each subset present within the tissue after 16/17 dpi, CD4⁺, CD8⁺, F4/80⁺ and Ly6G⁺ cells. A) heart and B) liver. Numbers represent mean \pm SEM. n = 3 mice/group (two different sections from each mouse).

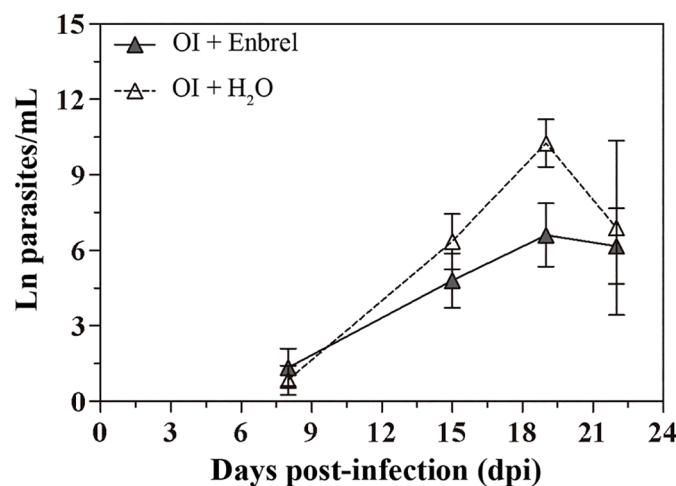
doi:10.1371/journal.pntd.0003849.g005

GI (mean \pm SEM, standard error of the mean: 1200 ± 18.68 versus 963 ± 43.15 , respectively) analyzed in 14 fields from two different liver lobes.

Elevated TNF production is involved in orally infected mice mortality

To evaluate the impact of elevated TNF serum levels in host resistance, OI mice were treated with the anti-TNF, etanercept (Enbrel). Enbrel treatment in OI mice started at 14 dpi. As demonstrated in Fig 6, our protocol of TNF blockade did not affect blood trypomastigotes number, but treated mice presented a longer survival than non-treated ones (Fig 6).

A



B

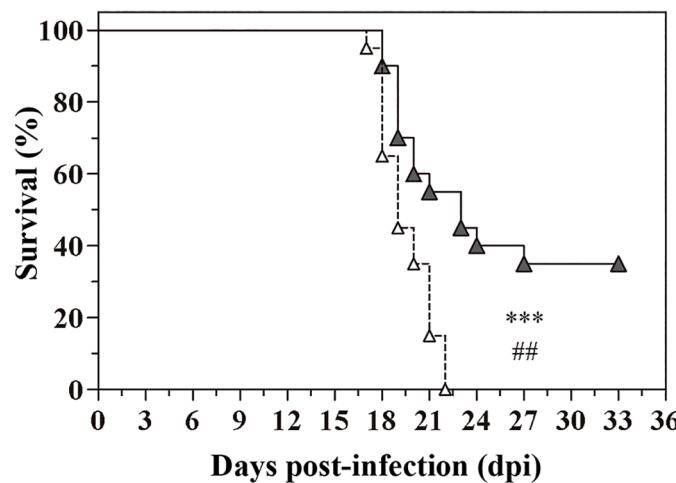


Fig 6. Anti-TNF therapy improves the survival of orally infected mice. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Tulahuén strain) within oral cavity (OI). Anti-TNF treatment with etanercept began after 14 dpi and was performed weekly. A) Parasitemia (mean and SEM of ln parasite/mL) and B) mortality were followed during the acute phase and subjected to statistical analysis. Parasites were counted by light microscopy, and parasitemia calculated by Brener method. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. For parasitemia comparisons on days 8, 15, 19 and 22 dpi, one-tailed Mann-Whitney test was used. n: OI+enbrel = 14–23, OI+H₂O = 3–23. Survival was analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) (****) and Gehan-Breslow-Wilcoxon (##) tests. n = 20 mice (equivalent to 100%). * p = 0.05; ** p = 0.01; *** p = 0.001.

doi:10.1371/journal.pntd.0003849.g006

Discussion

Currently, oral transmission of Chagas disease is the most important route of transmission in Brazil (70–80% of cases) [7]. Venezuela, Colombia, Bolivia, Argentina and Ecuador have also reported to have acute cases of Chagas disease associated with food/beverage consumption, but a significant study in the region is lacking [5]. These orally infected patients progress with a highly symptomatic disease (fever, facial edema, exanthema, hemorrhage, meningoencephalitis, abdominal pain, others), beyond the classical cardiac involvement. Additionally, increased mortality rate is marked in the first 2 weeks (8–35%), surpassing the calculated mortality produced by the disease resulting from the biting of infected insect vectors (5–10%) [18].

It has been well accepted that the route of parasite entry into the host is a key factor in Chagas pathogenesis [21]. Previous reports demonstrated that systemic *versus* mucosal infection promotes a distinct disease pattern. It has been shown that CFI mice infected with the Peruvian strain (TcII) of *T. cruzi* through systemic routes IP, intravenous, or subcutaneous (s.c) have higher infection rates (67–100%) and mortality than mucosal routes [OI, GI, intrarectal, genitalia, or conjunctival] (17–67%) [33]. Moreover, Caradonna and Pereiraperrin [34] infected BALB/c and C57BL/6 mice with the Tulahuén strain (TcVI) of *T. cruzi* via s.c. and intranasal routes (i.n.), and found higher mortality in the s.c. group. Furthermore, mice infected via the i.n. route developed a higher brain parasitism and lower parasitemia than animals infected via the s.c. route, suggesting a preferential homing of the parasite to the brain after intranasal administration [34]. Interestingly, when mice are infected with the same strain simulating natural infection, by oral (oropharynx) or cutaneous (over a puncture wound) challenge, insect-derived trypomastigotes are more infective through oral inoculation [19]. Regardless of DTU (TcI or TcII strains), infection through gavage (intragastrically) presents less infectivity, parasitemia and mortality than intraperitoneal injection [35], as we have also observed with the Tulahuén strain (TcVI). Here, we demonstrated that OI infected mice induced a higher infective rate when compared with GI infected mice (S1 Fig). As well as the inoculation route, certain factors, such as the inoculum size, DTU and *T. cruzi* developmental stage, may be involved in the disease outcome. Previous studies demonstrated that the Y strain (TcII) with 5×10^4 blood trypomastigotes infection by gavage (GI) showed higher parasitemia than the Colombian (TcI) strain [35]. In addition, IP infection with blood trypomastigotes shows higher infectivity than insect-derived trypomastigotes [36].

Gp82 and gp30 are involved in gastric invasion and can be differently expressed among distinct strains and developmental stages. Culture-derived metacyclic trypomastigotes from the Tulahuén strain (TcVI) was already described as expressing gp82 and CL strain, from the same DTU, presented high expression of gp82 and gp30, similarly to human isolates. These strains induce high parasitemia [25,27,37,38]. Another glycoprotein, gp90 (impairs cell invasion), is less expressed in CL (TcVI) parasites, when compared with the SC strain (isolated from a patient who ingested contaminated sugar cane). However, the SC strain is highly infective because its gp90 is susceptible to gastric juice [27].

Cortez and colleagues identified the mucin-ligand sequence present in gp82 from metacyclic Y strain (TcII) and its counterparts Tc85-11, involved in cell invasion by tissue culture-derived trypomastigotes (TCT) [39]. In our study, both TCT and insect derived trypomastigotes were able to promote mice infection trough the GI route. Moreover, it has been shown that both insect-derived metacyclic trypomastigotes (triatomine insects that were crushed along with fruits) and blood/ cell-derived trypomastigotes (consumption of infected wild *T. cruzi* reservoir hosts- mar-supials, bats and others) are associated with human outbreaks of oral Chagas disease [5,40,41].

The primary site of parasite entry in oral infection is still unknown. Previous data proved that in orally infected mice, parasites are not detected within the oropharynx and esophagus, instead, amastigote nests are present in the stomach [23]. In line with these findings, another

group suggested that parasite glycoproteins, such as gp82 and gp30, are involved in gastric invasion following intragastric/intrapharyngeal inoculation [27,37,42,43]. Altogether, these reports name intragastric, intrapharyngeal and oral cavity parasite delivery as “oral” infection. Here, we demonstrate that BALB/c mice infected through the oral cavity (**OI**) experienced a higher infective rate when compared with **GI** infected mice. To our knowledge, this constitutes the first report addressing the potential differences in disease outcome according to **OI** or **GI** route. After reaching systemic circulation, *T. cruzi* can multiply inside several cell types, such as macrophages, fibroblasts, skeletal and cardiac muscle, neurons and epithelial cells. Notably, the parasite presents tropism for cardiac tissue, where it forms amastigote nests and triggers immune cell recruitment [32]. Here, we demonstrated that in spite of the lower parasitemia and mortality, **GI**- mice developed a more severe myocarditis than **OI** mice, suggesting that cardiac involvement might not be related to the elevated mortality of the **OI** group. Tulahuén (TcVI) is not described as myotropic strain, but, this reticulotropic strain still affects the heart of infected mice. Moreover, in our study, this strain induced differences in inflammatory infiltration in the heart and damages in the liver between **OI** and **GI** groups. In addition, the intragastric infection with Colombiana (TcI) myotropic strain induces inflammation and amastigote nests formation in the heart [24].

It has been shown that *T. cruzi* is able to infect the reticuloendothelial system, including bone marrow, spleen and liver. Moreover, IP infection leads to apoptosis of hepatic cells and liver inflammation due to TNF production. In this regard, it was previously shown that the Tulahuén strain of *T. cruzi* induces TNF- production and death of hepatocytes by apoptosis, involving tBid and Bax proteins and influencing organ function [44]. **OI** and **GI** infection also promote apoptosis in the liver and in the heart of acute infected mice (S4 Fig). Interestingly, hepatic damage in **OI** is severe, as judged by histopathology and elevated ALT and AST serum levels. It has been shown that hepatocytes are not commonly infected *in vivo*, but amastigote nests may be observed in sinusoidal and Kupffer cells [45]. Here, we have hardly detected amastigote in hepatic tissue, most likely in Kupffer cells. This scarcity of *T. cruzi* amastigotes in hepatic cells is assumed to occur because of efficient control of the parasite clearance within this organ [46]. Additionally, the liver is described as the first line of protection against pathogens and in tolerogenic responses to antigens coming from the gut through the portal system [46,47,48,49]. Our results demonstrated that macrophages in the liver are TNF⁺ cells (Fig 5). Activated macrophages producing TNF in the liver may be involved with *T. cruzi* killing in the tissue. Nevertheless, considering the role of TNF in cell death, apoptotic bodies were also evident in TNF-rich regions (S4 Fig).

Paralleling parasitological and histological differences, **GI**- and **OI**- mice presented elevated IFN- γ levels in the serum, whereas higher levels of TNF were only observed in **OI** mice. Cellular adaptive immune response during infection is essential for parasitism control [50]. Cytokines play important roles in regulating *T. cruzi* replication and the immune response of infected animals. Th1 cytokines, such as IFN- γ and TNF, are involved in parasite control and host resistance whereas Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-5, are associated with host susceptibility [32]. In the initial stage of infection, parasite DNA and surface glycoconjugates are able to trigger innate immune response through TLR-2, -4 and -9 in macrophages and dendritic cells, enhancing their endocytic capacity and killing by oxidative burst. Pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ , favors inflammatory cell activation that migrate to control parasite burden [50]. Elevated TNF levels, as observed in **OI**, may be associated with cardiac, spleen, hepatic damage, and toxic shock in mice, as reported in other studies [51,52]. Reinforcing this view, **OI** mice showed a peak in TNF serum levels at 17 dpi, the time when they started to die. **GI** mortality also started at this time point, but the rate was lower than in **OI** mice. In the same sense, TNF detection by RT-PCR was higher in cardiac cells from **OI** than **GI** mice. Extending these findings, we have also shown that both **GI** and **OI** mice presented a high serum

concentration of IL-10 and IL-4 (17 dpi). Meanwhile, the **OI** group had lesser amounts of the TGF- β regulatory cytokine. Both cytokines were proven to inhibit macrophage microbicidal function and protect the host from tissue damage [52,53]. It has been shown that IL-17 producing cells contribute to the formation of the gastrointestinal barrier [54]. Our results demonstrated that, as expected, parasite inoculation into mucosal routes (**GI** and **OI**) triggered IL-17-producing cell activation, given its high serum levels.

Studies addressing different routes of infection are relevant as they seem to lead different immune responses and disease outcome. Infection with bacteria, such as *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* and *Francisella tularensis* through mucosal sites (intranasal or oral) promotes Th17 response with the systemic route (intravenous/s.c.) triggering a Th1 response. Antigens delivered into mucosal tissues stimulate these IL-17 producing cells [55], which was also observed in *T. cruzi* infection.

In **OI** animals, elevated circulating levels of TNF after 17 dpi were strongly associated with hepatic damage and death. Similar results were observed in mice deficient of IL-10, which display enhanced hepatic cell destruction and toxic shock by increased TNF. To corroborate that TNF is involved in the death of **OI** mice, we blocked this molecule. Because TNF is critical to control parasitemia [32,48], etanercept administration started at 14 days post-infection, at the time that parasitemia could also be controlled by humoral response. Etanercept treatment statistically delayed mortality without altering the levels of parasitemia, revealing the critical role of TNF in the course of **OI** infection, (Fig 6). Strikingly, similar results were also observed by Rodriguez-Angulo [56].

In fact, there is a clear association between peaked 17 dpi TNF circulating levels and liver alterations in terms of inflammatory infiltrates, which may impact organ functionality.

For several years, the **IP** route of *T. cruzi* infection has been chosen as the main pathway of parasite challenge in experimentally infected hosts in attempting to reproduce the vectorial route. We and others have already demonstrated that the route of parasite challenge is a major issue in terms of infection outcome and hence, worth considering in the human counterpart, mainly because oral transmission is becoming more epidemiologically relevant. Here, we clearly demonstrate that the host response differs when parasites are delivered into the mouth or by gavage. If compared with patients, oral outbreaks are related to contaminated food ingestion [5] and interestingly, the appearance of facial edema is frequent in these patients [57]. Parasite/antigens can be captured in the oral mucosa by tolerogenic dendritic cells that produce IL-10 and IL-12 (regulatory and inflammatory profile), or in the gastrointestinal tract from where they are drained to the liver by the portal system [49,58]. Even considering oral infection, it should not be assumed that the infectious processes are the same when parasites are delivered into the oral cavity or by gavage (intrapharyngeal /gastrointestinal).

On a theoretical basis, our studies also raise a series of questions worth exploring. For instance, the immunopathological and parasitological consequences of oral and systemic infection in the same host at different times are of interest. Whether there is a favorable influence of oral or systemic infection depending on which comes first is also interesting. From a translational standpoint, the finding that the route of parasite contact is involved in a differential pathophysiology and disease morbidity provides information that sounds suitable for clinical management and disease control strategies.

Materials and Methods

Animals and infection

Male BALB/c mice were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation animal facilities (Brazil). Mice (6–8 weeks old) were infected by gavage as a gastrointestinal attempt (**GI**) or in the oral

cavity (**OI**) with 5×10^4 *T. cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes forms (Tulahuén strain, TcVI [59]). Parasites were obtained from infected cultures of a highly susceptible lineage of monkey kidney epithelial cell line (Vero cells) [60]. Oral Chagas disease outbreaks are related to the consumption of contaminated food with infected triatomine excreta (metacyclic trypomastigotes) or consumption of wild *T. cruzi* reservoir hosts (blood and cell-derived trypomastigotes). The purpose of this study was to analyze the immune response of infected mice. As components from excreta could interfere in this response, some experiments were performed with trypomastigotes mixed with or without non-infected *Triatoma infestans* excreta. In these infections, uninfected mice were stimulated with saline. For both **GI** and **OI**, mice were maintained starving 4 hours before and at least 15 minutes after inoculation (100 µL of parasites suspension). **GI** was performed using a gavage canule and **OI**, by pipeting the volume into the mouth.

As **GI** infection is the less effective route of infection, 5×10^4 , 10^5 or 10^6 inocula size were tested by gavage. In this study, the lower (5×10^4) inoculum capable of infecting mice **GI** was chosen.

For comparative purposes, in some experiments, intraperitoneally infected mice were also analyzed.

In other series of experimental rounds, mice were also infected concomitantly with an inoculation of antacid (19.4 mg/Kg of Magnesium Hydroxide [Mg(OH)₂] suspension, Phillips-Brazil), and trypomastigotes.

Ethics statement

This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation and the Federal Law 11.794 (10/2008). The Institutional Ethics Committee for Animal Research of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA-FIOCRUZ, License: LW-23/12) approved all of the procedures used in this study.

Parasitemia and survival

Parasitemia was detected at different days post-infection (dpi) by counting trypomastigotes in 5 µL of tail blood, and parasite number was calculated using the Brener method. Mortality and survival were followed until 60 days post-infection.

Parasitemia and survival rates were evaluated with all inoculated animals. Due to differences in infectivity from **OI** and **GI** mice, in the other figures throughout this paper were included infected mice with patent parasitemia.

Heart and liver histopathological analyses

Hearts and livers from infected or uninfected mice were fixed in buffered 5% formalin. Heart samples were sliced longitudinally in two parts, and the liver, in several fragments from different lobes. Paraffin-embedded 5 µm sections were mounted on glass slides and stained with the Hematoxylin-Eosin and Picrossirius Red technique to evaluate infiltrating cells and collagen fibers. Photos were taken using the Leica DM 2500 microscope and then analyzed using Image J software. In the heart, the percentage area with inflammatory infiltrates or amastigote nests was calculated by analyzing 50 fields/section/mouse. In addition to the area of inflammation, the degree of pericarditis and myocarditis was classified according to the extension of infiltrating area: +, very mild (similar with uninfected); ++, mild (small areas of infiltrates); +++, moderate (moderate areas of infiltrates); +++, severe (extensive areas of infiltrates); +++++, very severe (very extensive areas of infiltrates).

In hepatic tissue, the percentage area with inflammatory infiltrates was calculated by analyzing 25 fields/mouse (two different sections from each mouse). The inflammatory infiltrates were scored as:-, without infiltrates (without alterations); +, mild lesions areas (small focal infiltrates mainly around the vessels, parenchyma not infiltrated); ++, moderate areas of infiltrates (infiltrates with intermediate size, around the vessels, but few diffuse and microgranulomas also within the parenchyma and thrombus formation in some vessels); +++, severe areas of infiltrates (areas of infiltrates with microgranulomatous structure, diffuse infiltrates within the parenchyma and more vessels with thrombus formation), ++++ very severe (extensive areas of infiltrates with microgranulomatous structure and diffuse infiltrates within the parenchyma).

Serum cytokine analysis

Mice were bled by cardiac puncture at 3, 9, 12, 15, 17, 21, 25 and 27 days post-infection. Serum was stored frozen at -70°C until used. Serum levels of IL-4, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF and TGF- β were measured in a Multiplex analysis, Milliplex MAP—mouse cytokine / chemokine magnetic bead panel kit and TGF β 1 single plex kit (Merk Millipore, USA). The assay was performed by the Gênes Institute of Clinical Analyses, São Paulo/SP, Brazil. Cytometric beads assay (CBA), using the Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit (BD Biosciences, USA) was also performed for serum cytokine analysis according to the manufacturer's instructions. Samples were immediately acquired using FACSCanto II (Becton and Dickinson, USA) equipped with FACSDiva software (Becton and Dickinson, USA). Data were analyzed using FCAP Array software (Becton and Dickinson, USA).

Cytokine gene expression in the heart

For real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR), the total RNA from one-half of the heart (longitudinal section; average weight: 87.9 mg) samples was extracted using Trizol Reagent (Ambion, Life Technologies) associated with the RNeasy Mini kit assay (Qiagen), from the phenol-chloroform aqueous phase, following the manufacturer's instructions. Reverse transcriptase reactions were performed on 3.5 μ g RNA using Super Script II kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR assays were performed on StepOnePlus (Applied Biosystems, USA) using Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), and the primers for cytokines, IFN- γ , TNF, TGF- β , IL-10 and IL-17, purchased from IDT (Integrated DNA Technologies) ([S2 Table](#)). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and β -actin genes were used as endogenous housekeeping controls ([S2 Table](#)). cDNA were diluted 1:10 and reactions were performed in duplicate using 2 μ L per reaction, in a total volume of 20 μ L. After amplification, dissociation curves were performed, revealing only one melting peak for each amplified fragments. Relative quantifications of target gene levels were performed using $\Delta\Delta Ct$ method [[61](#)]. RT-qPCR data were normalized to the housekeeping genes, and fold changes were determined compared with uninfected control samples using the Expression Suite software (Life Technologies, USA). Statistical analysis was performed from ΔCt values.

ALT and AST measurement

Blood samples obtained from mice of all groups were allowed to coagulate, and the serum was then isolated. Serum ALT (alanine transaminase) and AST (aspartate transaminase) activities were measured with the Reflotron (Roche, Germany) apparatus according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence analysis

Hearts and livers from infected or uninfected mice were included in tissue tek (OCT, Sakura, USA). Heart samples were sliced longitudinally in two parts, and the liver, in several fragments. To evaluate TNF-producing cells, double immunofluorescences were performed. Cryosections with 3 µm were fixed in acetone for 5 minutes at 4°C. After two washes in cold PBS, a blocking solution of 10% normal serum goat and 1% BSA was applied to the sections for 1 hour at room temperature. Samples were incubated overnight at 4°C with primary antibodies and washed three times in PBS and subjected to the appropriate secondary antibodies for 45 minutes at room temperature, Alexa-488 goat anti-rat for anti-CD4, -CD8, -F4/80 and -Ly6G, and Alexa-546 goat anti-rabbit for anti-TNF. The characteristics of the antibodies used in immunostaining are listed in [S1 Table](#). After three washes in PBS, the slides were mounted in ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Molecular Probes, USA).

To evaluate apoptosis, the ApopTag *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Merk Millipore, USA) was used following the manufacturer instructions. Counterstaining/mounting was performed using ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Molecular Probes, USA).

All images were visualized using the Zeiss microscope (Germany) and digitalized using AxioCam HRm and AxioVision Rel 4.8 software.

The subsets (CD4⁺, CD8⁺, F4/80⁺ and Ly6G⁺) present in the infiltration were counted in 10 and 14 fields/photos for the heart and liver, respectively, and TNF⁺ cells were quantified. Two sections from the heart and two from different liver lobes from each mouse were analyzed. The percentage of CD4, CD8, macrophages and neutrophils was calculated over the sum of all subsets from different sections.

Anti-TNF treatment

Orally infected BALB/c mice were treated intraperitoneally with a quimeric anti-TNF protein (Etanercept Enbrel, Wyeth Pharmaceuticals, 0.83 mg/Kg). The treatment began at the 14th day post-infection with weekly subsequent doses. Parasitemia and mortality were analyzed throughout the course of infection.

Statistical analysis

Kruskal-Wallis (Dunn's post-test) or Mann-Whitney tests were used for the statistical analyses. Survival was analyzed by Log-rank (Mantel-Cox Test) and Gehan-Breslow-Wilcoxon test. P values < 0.05 were considered statistically significant. Tests were performed using GraphPad Prism 5.

Accession number for the genes and proteins mentioned

Genes: IFN-γ (NM_008337.3), TGF-β (gb_M13177.1), TNF (NM_013693.3), IL-17A (NM_010552.3), IL-10 (NM_010548.2), HPRT (gb_J00423.1), β-actin (NM_007393.3). Proteins: IFN-γ (gb_EDL24379.1), TGF-β1 (NP_035707.1), TNF (gb_AAC82484.1), IL-17A (NP_034682.1), IL-10 (NP_034678.1), gp82 (gb_ABR19835.1), gp30 (gb_AEF13371.1), gp90 (gb_AAM47176.1|AF426132_1), mucin (gb AAA39755.1), IL-4 (NP_067258.1), TLR-2 (gb_AAD49335.1|AF165189_1), TLR-4 (NP_067272.1), TLR-9 (NP_112455.2).

Supporting Information

S1 Fig. *Trypanosoma cruzi* infection presents differences in infectivity according to the inoculation route. Male BALB/c mice were infected with 5x10⁴ tissue culture-derived trypomastigotes through intraperitoneal (IP), gavage (GI) or oral (OI) inoculation. Infectivity was

obtained from the percentage of mice presenting parasitemia over the total number of mice inoculated with parasites. Kruskal-Wallis (Dunn's post-test) was performed and symbols represent comparison to IP or OI, * and #, respectively. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5. **/## p = 0.01 (TIF)

S2 Fig. F4/80⁺ macrophages are the main TNF producer cells. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes through gavage (GI) or oral (OI) inoculation. A, heart and B, liver tissue cryosections were submitted to double immunostaining for F4/80 (green) and TNF (red). n = 3 mice/group (two sections from each). Bars represent 100 μm. (TIF)

S3 Fig. Mild collagen production in heart and liver from infected mice. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes through gavage (GI) or oral (OI) inoculation. Paraffin-embedded sections were stained with Picrossirius to reveal collagen production. A, heart, counterstained with Hematoxylin and B, liver. n = 3–5 mice/group/dpi. Bars represent 50 μm. (TIF)

S4 Fig. Apoptosis in heart and liver. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes through gavage (GI) or oral (OI) inoculation. TUNEL technique was applied to A, heart and B, liver cryosections for apoptosis detection. C, TNF staining (red) associated with structures that were also related to TUNEL staining (red) within the liver from infected mice. n = 3 mice/group (two sections from each). Bars represent 100 μm. (TIF)

S1 Table. Antibodies applied in immunofluorescence. Abbreviations: Ig, immunoglobulin; mAb, monoclonal antibody. (DOCX)

S2 Table. Primers sequences for target mRNAs. Sequences of each primer, manufacture and used concentration are indicated. Holding stages were at 95°C for 10 minutes for all primers, and cycling stages (40x) varied depending on the target. For IL-10, IFN-γ, TGF-β cycling stage was at 95°C for 15 seconds and at 63°C for 1 minute. For TNF, at 95°C for 15 seconds and 64°C for 30 seconds. HPRT and β-actin cycles were performed in the same conditions of each target. (DOC)

S3 Table. Heart histopathological analysis. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Tulahuén strain) through gavage (GI) or oral cavity (OI). Hearts were harvested at different days post-infection (dpi), fixed and embedded in paraffin. Histological longitudinal sections were stained by Hematoxylin-Eosin and Picrossirius Red. The table represents degree of pericarditis and myocarditis was classified as: +, very mild; ++, mild; +++, moderate; +++, severe; +++++, very severe. Amastigotes nests were observed inside or next infiltrating areas. Infected mice presented a mild collagen deposition, but no important difference between groups was observed in Picrossirius Red staining. n = 4–6 mice/dpi/group. Abbreviations: dpi, days post-infection; GI, gastrointestinal infection; OI, oral infection, N.A., not analyzed. n = 5 mice/dpi/group. (DOCX)

S4 Table. Liver histopathological analysis. Male BALB/c mice were infected with 5×10^4 tissue culture-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* (Tulahuén strain) through gavage (GI) or

oral cavity (OI). Livers were harvested at different days post-infection (dpi), fixed and embedded in paraffin. Histological sections were stained by Hematoxylin-Eosin and Picrossirius Red. The table represents degree of inflammation in hepatic tissue. *U.i.*, uninfected. In hepatic tissue, the inflammatory infiltrates were scored as:-, without infiltrates; +, mild lesions areas; ++, moderate areas of infiltrates; +++, severe areas of infiltrates, ++++ very severe. Thickening of blood vessels walls observed in Hematoxylin-Eosin staining and was corroborated with Picrossirius red technique. n = 3–6 mice/dpi/group. Abbreviations: dpi, days post-infection; GI, gastrointestinal infection; OI, oral infection, N.A., not analyzed. n = 5 mice/dpi/group. (DOCX)

Acknowledgments

We would like to acknowledge Vanda Cunha, Sérgio Verly and Airton Jarbas Pereira from the National and International Laboratory on Triatomine Taxonomy for their technical assistance with maintenance of triatomines.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JBdA JdM. Performed the experiments: JBdA DSdS LRB DAFdO ARP EdSvV JdM. Analyzed the data: JBdA ER OB WS VCdA OCM JdM. Contributed reagents/materials/analysis tools: OCM CEdCP JJ. Wrote the paper: JBdA ARP OB WS VCdA JdM.

References

1. Coura JR, Vinas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465: S6–7. doi: [10.1038/nature09221](https://doi.org/10.1038/nature09221) PMID: [20571554](#)
2. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ (2010) Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 115: 22–27. doi: [10.1016/j.actatropica.2009.07.019](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019) PMID: [19646412](#)
3. Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 115: 14–21. doi: [10.1016/j.actatropica.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003) PMID: [19932071](#)
4. da Silva NN, Clausell DT, Nolibos H, de Mello AL, Ossanai J, et al. (1968) [Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 10: 265–276. PMID: [4178818](#)
5. Toso MA, Vial UF, Galanti N (2011) [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Med Chil* 139: 258–266. doi: [/S0034-98872011000200017](https://doi.org/10.4032/rmc.2011000200017) PMID: [21773665](#)
6. Sanchez LV, Ramirez JD (2013) Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology* 140: 147–159. doi: [10.1017/S0031182012001394](https://doi.org/10.1017/S0031182012001394) PMID: [23010131](#)
7. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB (2012) Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* 54: 845–852. doi: [10.1093/cid/cir956](https://doi.org/10.1093/cid/cir956) PMID: [22238161](#)
8. Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W (1997) [Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation]. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 139–144. PMID: [9148337](#)
9. Benchimol Barbosa PR (2006) The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol* 112: 132–133. PMID: [16600406](#)
10. Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, et al. (2008) Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 296–300. PMID: [18719812](#)
11. Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, et al. (2009) Trypanosoma cruzi in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol* 39: 615–623. doi: [10.1016/j.ijpara.2008.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.015) PMID: [19041313](#)
12. Ferreira CS, Martinho PC, Amato Neto V, Cruz RR (2001) Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43: 161–162. PMID: [11452325](#)

13. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, et al. (2009) Chagas' disease as a food-borne illness. *J Food Prot* 72: 441–446. PMID: [19350996](#)
14. Barbosa-Ferreira JM, Guerra JA, Santana Filho FS, Magalhaes BM, Coelho LI, et al. (2010) [Cardiac involvement in Acute Chagas' Disease cases in the Amazon region]. *Arq Bras Cardiol* 94: 147–149. PMID: [20625638](#)
15. Pinto AY, Harada GS, Valente V, Abud JE, Gomes F, et al. (2001) [Cardiac attacks in patients with acute Chagas disease in a family micro-outbreak, in Abaetetuba, Brazilian Amazon]. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 413–419. PMID: [11600906](#)
16. Ianni BM, Mady C (2005) [The sugarcane juice was delicious, but. . .]. *Arq Bras Cardiol* 85: 379–381. PMID: [16429196](#)
17. Vinas Albajar P, Laredo SV, Terrazas MB, Coura JR (2003) [Dilated cardiomyopathy in patients with chronic chagasic infection: report of two fatal autochthonous cases from Rio Negro, State of Amazonas, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 401–407. PMID: [12908042](#)
18. Rassi A Jr., Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402. doi: [10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](#) PMID: [20399979](#)
19. Eickhoff CS, Dunn BA, Sullivan NL, Hoft DF (2013) Comparison of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 508–511. doi: [10.1590/S0074-02762013000400018](#) PMID: [23828001](#)
20. de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W (2009) Differential regional immune response in chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e417. doi: [10.1371/journal.pntd.0000417](#) PMID: [19582140](#)
21. de Meis J, Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, et al. (2013) *Trypanosoma cruzi* entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in mice. *Frontiers in Immunology* 4: 1–7. doi: [10.3389/fimmu.2013.00001](#) PMID: [23355837](#)
22. Kirchhoff LV, Hoft DF (1990) Immunization and challenge of mice with insect-derived metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 12: 65–74. PMID: [2107500](#)
23. Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D (1996) Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun* 64: 3800–3810. PMID: [8751932](#)
24. Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG (2002) Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44: 97–103. PMID: [12048547](#)
25. Cortez M, Neira I, Ferreira D, Luquetti AO, Rassi A, et al. (2003) Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infect Immun* 71: 6184–6191. PMID: [14573635](#)
26. Collins MH, Craft JM, Bustamante JM, Tarleton RL (2011) Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8(+) T cell response and protection against heterotopic challenge. *Infect Immun* 79: 3397–3406. doi: [10.1128/IAI.01080-10](#) PMID: [21628516](#)
27. Covarrubias C, Cortez M, Ferreira D, Yoshida N (2007) Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int J Parasitol* 37: 1609–1616. PMID: [17640647](#)
28. Giddings OK, Eickhoff CS, Smith TJ, Bryant LA, Hoft DF (2006) Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. *Infect Immun* 74: 5549–5560. PMID: [16988230](#)
29. Andrade ZA, Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ (1994) Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol* 144: 1403–1411. PMID: [8203476](#)
30. Nauli AM, Nauli SM (2013) Intestinal transport as a potential determinant of drug bioavailability. *Curr Clin Pharmacol* 8: 247–255. PMID: [23343017](#)
31. Sardinha LR, Mosca T, Elias RM, do Nascimento RS, Goncalves LA, et al. (2010) The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e578. doi: [10.1371/journal.pntd.0000578](#) PMID: [20052269](#)
32. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS (2009) The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 31: 673–685. doi: [10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x](#) PMID: [19825107](#)
33. Marsden PD (1967) *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. II. Infections induced by different routes. *Ann Trop Med Parasitol* 61: 62–67. PMID: [6051540](#)
34. Caradonna K, Pereiraperrin M (2009) Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 77: 1349–1356. doi: [10.1128/IAI.01434-08](#) PMID: [19168740](#)

35. Dias GB, Gruendling AP, Araujo SM, Gomes ML, Toledo MJ (2013) Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol* 135: 511–517. doi: [10.1016/j.exppara.2013.08.013](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.08.013) PMID: [23994765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23994765/)
36. McHardy N, Neal RA (1979) A comparison of challenge with *Trypanosoma cruzi* blood-stream trypomastigotes and metacyclic trypomastigotes from *Rhodnius prolixus* in mice immunized with killed antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 409–414. PMID: [122124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/122124/)
37. Cortez M, Silva MR, Neira I, Ferreira D, Sasso GR, et al. (2006) *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect* 8: 36–44. PMID: [16153873](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16153873/)
38. Teixeira MM, Yoshida N (1986) Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 18: 271–282. PMID: [3515178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3515178/)
39. Cortez C, Yoshida N, Bahia D, Sobreira TJ (2012) Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. *PLoS One* 7: e42153. doi: [10.1371/journal.pone.0042153](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042153) PMID: [22860068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22860068/)
40. Coura JR (2006) [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 Suppl 3: 113–117. PMID: [17605219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17605219/)
41. Pereira KS, Schmidt FL, Barbosa RL, Guaraldo AM, Franco RM, et al. (2010) Transmission of chagas disease (American trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr Res* 59: 63–85. doi: [10.1016/S1043-4526\(10\)59003-X](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)59003-X) PMID: [20610174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20610174/)
42. Yoshida N (2009) Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 101–107. PMID: [19753464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19753464/)
43. Staquicini DI, Martins RM, Macedo S, Sasso GR, Atayde VD, et al. (2010) Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e613. doi: [10.1371/journal.pntd.0000613](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000613) PMID: [20209152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20209152/)
44. Ronco MT, Frances DE, Ingaramo PI, Quiroga AD, Alvarez ML, et al. (2010) Tumor necrosis factor alpha induced by *Trypanosoma cruzi* infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice. *Cytokine* 49: 64–72. doi: [10.1016/j.cyto.2009.09.012](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.09.012) PMID: [19892564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19892564/)
45. Bouzahzah B, Nagajyothi F, Desrusseaux MS, Krishnamachary M, Factor SM, et al. (2006) Cell cycle regulatory proteins in the liver in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Cycle* 5: 2396–2400. PMID: [17102609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17102609/)
46. Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, et al. (2006) Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 74: 2031–2042. PMID: [16552032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16552032/)
47. Watanabe T, Katsukura H, Shirai Y, Yamori M, Nishi T, et al. (2003) A liver tolerates a portal antigen by generating CD11c+ cells, which select Fas ligand+ Th2 cells via apoptosis. *Hepatology* 38: 403–412. PMID: [12883484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12883484/)
48. Limmer A, Ohl J, Wingender G, Berg M, Jungerkes F, et al. (2005) Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* 35: 2970–2981. PMID: [16163670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16163670/)
49. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H (2011) Oral tolerance. *Immunol Rev* 241: 241–259. doi: [10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x) PMID: [21488901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21488901/)
50. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, et al. (2009) Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 252–258. PMID: [19753481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19753481/)
51. Andrade SG, Magalhaes Ldos A, Pessina DH (2008) Importance of TNF-alpha in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 21–26. PMID: [18345460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18345460/)
52. Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, et al. (2000) Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun* 68: 4075–4083. PMID: [10858224](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10858224/)
53. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, et al. (1994) IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 153: 3135–3140. PMID: [8089491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8089491/)
54. Blaschitz C, Raffatellu M (2010) Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J Clin Immunol* 30: 196–203. doi: [10.1007/s10875-010-9368-7](https://doi.org/10.1007/s10875-010-9368-7) PMID: [20127275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20127275/)
55. Hu W, Pasare C (2013) Location, location, location: tissue-specific regulation of immune responses. *J Leukoc Biol* 94: 409–421. doi: [10.1189/jlb.0413207](https://doi.org/10.1189/jlb.0413207) PMID: [23825388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23825388/)

56. Rodriguez-Angulo H, Thomas LE, Castillo E, Cardenas E, Mogollon F, et al. (2013) Role of TNF in sickness behavior and allodynia during the acute phase of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 134: 422–429. doi: [10.1016/j.exppara.2013.05.006](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.006) PMID: [23684908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23684908/)
57. Pinto AY, Ferreira AG Jr., Valente Vda C, Harada GS, Valente SA (2009) Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica* 25: 77–83. PMID: [19341528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19341528/)
58. Moingeon P, Mascarell L (2012) Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clin Dev Immunol* 2012: 623474. doi: [10.1155/2012/623474](https://doi.org/10.1155/2012/623474) PMID: [22110534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22110534/)
59. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, et al. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051–1054. PMID: [20027478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20027478/)
60. Liebhaber H, Riordan JT, Horstmann DM (1967) Replication of rubella virus in a continuous line of African green monkey kidney cells (Vero). *Proc Soc Exp Biol Med* 125: 636–643. PMID: [4961494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4961494/)
61. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408. PMID: [11846609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/)



Trypanosoma cruzi entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in mice

Juliana de Meis*, **Juliana Barreto de Albuquerque**, **Danielle Silva dos Santos**,
Désio Aurélio Farias-de-Oliveira, **Luiz Ricardo Berbert**, **Vinícius Cotta-de-Almeida** and **Wilson Savino**

Laboratory of Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Edited by:

Susan Swain, University of Massachusetts Medical School, USA

Reviewed by:

Linda Cauley, University of Connecticut Health Center, USA
Craig Michael Walsh, University of California Irvine, USA

***Correspondence:**

Juliana de Meis, Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Avenue Brasil 4365, Manguinhos, 21045-360 Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: jdemeis@ioc.fiocruz.br

Acute Chagas disease is characterized by a systemic infection that leads to the strong activation of the adaptive immune response. Outbreaks of oral contamination by the infective protozoan *Trypanosoma cruzi* are frequent in Brazil and other Latin American countries, and an increased severity of clinical manifestations and mortality is observed in infected patients. These findings have elicited questions about the specific responses triggered after *T. cruzi* entry via mucosal sites, possibly modulating local immune mechanisms, and further impacting regional and systemic immunity. Here, we provide evidence for the existence of differential lymphoid organ responses in experimental models of acute *T. cruzi* infection.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, lymph nodes, spleen, cytokine, T cell activation

Chagas disease (American *Trypanosomiasis*) is a neglected tropical illness caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. This infection is considered a world-wide health problem with a lack of treatment options due to the absence of a vaccine and global spreading (1, 2). *Trypanosoma cruzi* infection was initially endemic in rural areas of Latin America and, transmitted by contaminated insect vectors of the *Reduviidae* family. Insects become vectors after biting *T. cruzi*-infected animals or humans. The parasite can also be directly transmitted by blood transfusion and organ transplantation as well as orally and congenitally (3, 4). The incubation period (the time between *T. cruzi* exposure and development of symptoms) varies according to the infection route; for example, transmission by vector has an incubation time of 4–15 days. In cases of transfusion the incubation time ranges from 8 to 120 days, whereas in congenital transmission it varies from 3 to 22 days; roughly the same for oral transmission (5, 6). Today, the oral infection is the most common transmission route in the Brazilian Amazon region after the Pan-American Health Organization declared the abrogation of vectorial transmission in the area (5). Interestingly, oral transmission has been associated with high mortality and morbidity due to an increased prevalence and severity of cardiac pathology (myocarditis) (7–10).

TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION TARGETS SEVERAL TISSUES IN THE HOST

During the acute phase of the disease, the parasites highly replicate in tissues (under amastigote form), and infective trypomastigote forms are numerous in the blood. Throughout this phase, *T. cruzi* is able to infect many host tissues, including skeletal muscle, lymphoid and nervous tissues, endocrine glands, and mucose (Table 1).

In immunocompetent hosts, the high parasitemia observed in the acute phase is quickly controlled through immune effector mechanisms. As a result, *T. cruzi* numbers in the blood and tissues drop drastically to almost undetectable levels as the infected individual enters the chronic phase. Nevertheless, *in situ* PCR (Polymerase Chain Reaction) and confocal analyses have shown that even in the chronic phase, tissues are not parasite-free (11–18). Several tissues, including the heart and the nervous system, as well as adipocytes, retain amastigote forms that perpetuate the chronic infection (19–21). Additionally, Chagas disease may be reactivated during periods of immunosuppression, such as in patients with HIV/AIDS or undergoing immunosuppressive drug therapy (22, 23).

Although controlled, *T. cruzi* persistence in tissues appears to be associated with inflammatory lesions and disease severity in the chronic phase (12, 13, 18, 24–28). Using two models of chronic infection, Zhang and Tarleton (18) demonstrated that parasite clearance from tissues resulted in the disappearance of associated inflammatory lesions and resolution of disease. Taken together, these studies clearly demonstrate that Chagas disease is a systemic infection and that the immune response is important in containing *T. cruzi* replication in the acute phase which impacts disease severity during the chronic phase of the infection.

SYSTEMIC OR MUCOSAL ROUTES OF *T. CRUZI* INFECTION DIFFERENTIALLY AFFECT PARASITE LOAD AND MORTALITY IN MICE

Experimental models of *T. cruzi* infection have been widely used to study various aspects of the pathogenesis and pathophysiology of Chagas disease. In fact, the vast majority of our knowledge on the biology of *T. cruzi* infection was initially obtained

Table 1 | Tissue infectivity of *Trypanosoma cruzi* in mammals.

Target tissue	Human		Animals	
	Acute	Chronic	Acute (4–50 dpi)	Chronic (60–730 dpi)
Adipose tissue	ND	Ferreira et al. (21)	Andrade and Silva (76), Buckner et al. (77), Guarner et al. (78), Combs et al. (20)	Guarner et al. (78), Combs et al. (20)
Adrenal gland	ND	ND	Buckner et al. (77), Correa-de-Santana et al. (79)	ND
Blood	Qvarnstrom et al. (80)	Moreira et al. (11), Qvarnstrom et al. (80)	Hoft et al. (69), Buckner et al. (77), Cortez et al. (81), Guillermo et al. (55), Silva et al. (57), Veloso et al. (82), Castro-Sesquen et al. (83)	Veloso et al. (82), Castro-Sesquen et al. (83)
Bone	ND	ND	Morocoima et al. (84)	ND
Bone marrow	Baena Teran et al. (85)	ND	Morocoima et al. (84)	ND
Cartilage	ND	ND	Da Costa et al. (86), Morocoima et al. (84)	ND
Central Nervous System	Mortara et al. (19)	Mortara et al. (19)	Andrade et al. (87), Buckner et al. (77), Guarner et al. (78), Rachid et al. (88)	Andrade et al. (87), Guarner et al. (78)
Gastro Intestinal Tract	Mortara et al. (19)	ND	Andrade et al. (87), Buckner et al. (77), Guarner et al. (78)	Andrade et al. (87), Guarner et al. (78)
Heart	Mortara et al. (19)	Mortara et al. (19), Vago et al. (89), Schijman et al. (90)	Andrade et al. (87), Buckner et al. (77), Guarner et al. (78), Combs et al. (20), Castro-Sesquen et al. (83)	Guarner et al. (78), Combs et al. (20), Castro-Sesquen et al. (83)
Liver	ND	ND	Hoft et al. (69), Buckner et al. (77), Guarner et al. (78)	ND
Lung	Mortara et al. (19)	ND	Guarner et al. (78)	Guarner et al. (78)
Lymph nodes	ND	ND	Hoft et al. (69), Guarner et al. (78), Giddings et al. (74)	Guarner et al. (78)
Muscle	ND	ND	Buckner et al. (77), Guarner et al. (78)	Buckner et al. (77), Guarner et al. (78)
Pancreas	ND	ND	Guarner et al. (78)	Guarner et al. (78)
Peritoneal cells	ND	ND	Silva et al. (57)	ND
Skin	(19)	Mortara et al. (19)	ND	ND
Spleen	ND	ND	Hoft et al. (69), Buckner et al. (77), Guarner et al. (78), Combs et al. (20), Giddings et al. (74)	Guarner et al. (78), Combs et al. (20)
Stomach/esophagus	ND	Vago et al. (91)	Hoft et al. (69), Guarner et al. (78), Cortez et al. (81), Staquicini et al. (92)	Guarner et al. (78)
Thymus	ND	ND	Da Costa et al. (86)	ND
kidney	(19)	ND	Buckner et al. (77), Guarner et al. (78), Castro-Sesquen et al. (83)	Guarner et al. (78), Castro-Sesquen et al. (83)
nasal cavity	ND	ND	Giddings et al. (74)	ND
Bladder	ND	ND	Buckner et al. (77)	Buckner et al. (77)

ND – not detected.

using experimental mouse models. It is well established that the immune response and immunopathologic manifestations following *T. cruzi* infection are dependent on genetically heterogeneous host populations, parasite strain, inoculum size, and route of infection. Moreover, the anatomical route of pathogen invasion may directly impact upon the host immune response and host resistance (**Box 1**). In this way, several studies compared mucosal and systemic *T. cruzi* infection and mortality in mice.

In 1967, Marsden showed that CFI mice infected with the *Peruvian* strain of *T. cruzi* by systemic routes [*intraperitoneal* (*i.p.*), *intravenous* (*i.v.*), or *subcutaneous* (*s.c.*)] showed higher infection rates (67–100%) and mortality than mucosal routes [*oral* (*o.i.*), *intragastric* (*i.g.*), *intrarectal* (*i.r.*), *genitalia* (*gen.*), or *conjunctival* (*cnj.*)] (17–67%) (29). Similar results were observed in a study by Camandaroba et al. (30) in which *i.p.* and *i.g.* inoculation with the *Peruvian* and *Colombian* strains of *T. cruzi* were compared in Swiss mice. Caradonna and Pereiraperrin (31) infected BALB/c and C57BL/6 mice with the *Tulahuén* strain of *T. cruzi* via *s.c.* and intranasal (*i.n.*) routes and observed higher mortality in the *s.c.* group. Interestingly, mice infected via the *i.n.* route developed higher brain parasitism and lower blood parasitemia than animals infected via the *s.c.* route, suggesting a preferential homing of the parasite to the brain after *i.n.* administration (31).

Taken together, these observations suggest that the route of parasite entry into the host is a key factor in Chagas pathogenesis. It is logical to think that following parasite entry, the initial target tissues/cells in the circulation (**Table 2**) may contribute to the development of an immune response able to control infection.

SYSTEMIC *TRYPANOSOMA CRUZI* ENTRY INDUCES A DIFFERENTIAL RESPONSE IN SECONDARY LYMPHOID ORGANS OF INFECTED MICE

Acute and chronic *T. cruzi* infections promote significant increases in the size and numbers of cells in the subcutaneous lymph nodes (SCLN) and spleen (SP), likely due to persistent T and B cell poly-clonal activation in these tissues (32, 33). Parasite-derived proteins, such as trans-sialidase and racemase, as well as *T. cruzi*-derived DNA have been shown to contribute to lymphocyte proliferation in Chagas disease (34–36). Interestingly, the majority of poly-clonal lymphocytes activated during early *T. cruzi* infection do not appear to be parasite-specific (37–45). However, the relative role of T and B cells in controlling *T. cruzi* infection remains controversial. Although there are data showing that T and B cell activation is necessary for limiting *T. cruzi* expansion, the poly-clonal activation also appears to contribute to the pathological alterations observed in Chagas disease (44, 46, 47). Similarly to splenocytes, SCLN-derived effector T cells from infected mice secrete high amounts of IL-2, IL-4, IL-10, and IFN- γ , suggesting the existence of a mixed type-1 and type-2 profiles of cytokine secretion (48, 49).

The process of expansion and contraction by the lymphocyte population in the secondary lymphoid organs can be regarded as a regional response to systemic *T. cruzi* infection. Gut-associated lymphoid tissues are specialized for draining antigens present in the gastrointestinal tract and are also involved in the tolerogenic immune response. In this respect, gut-associated lymphoid tissues may be involved in the progressive damage of the digestive

Box 1 | T cell differentiation into effector cells following bacterial infections may be differentially programmed depending on the route of pathogen presentation (96, 97).

Accordingly, intravenous infection generates IFN- γ -producing T cells, whereas the mucosal routes of infection (e.g., intranasal or intragastric) generate IL-17-producing T cells. These results are in keeping with the observation that spleen-derived antigen-presenting (APC) cells are prone to producing IL-12, a cytokine involved in Th1 differentiation, whereas mucosal APC rather produce IL-6 and TGF- β , cytokines that selectively drive the Th17 differentiation program (98). In addition, it is interesting to note that these route-driven programs of T cell differentiation may be involved in the fine tuning of innate receptors for bacterial molecules (96) and influence the ability to generate an efficient memory pool of effector cells (97).

Table 2 | Primary distribution of *T. cruzi* in infected mice.

Route of infection	First target tissues/cells	Reference
Intravenous	Blood, liver, spleen, lungs, and kidneys/macrophages	Kuhn et al. (93)
Intraperitoneal	Peritoneal macrophages	Nogueira et al. (94)
Oral	Stomach (epithelial cells), drainage lymph node	Hoft et al. (69), Yoshida (95)
Conjunctival	Nasolacrimal ducts and nasal cavities (epithelial cells), parotid, and submandibular lymph node	Giddings et al. (74)

system (megacolon and megaesophagus) that is a consequence of chronic *T. cruzi* infection (50–52). For these reasons, the mesenteric lymph nodes (MLN) and Peyer's Patches (PP) are also studied in systemic infections, since they may be involved in the gut pathological changes that are observed in infected patients. In contrast to the hyperplasia of the SP and SCLN observed in infected mice, there is a reduction in the size and cell number of the MLN and PP, possibly due to the increased depletion of T and B lymphocytes (49, 53, 54).

As a consequence of cell activation, T lymphocyte apoptosis is also observed in lymphoid tissues (**Box 2**). In fact, the Fas molecule is one candidate to regulate T and B lymphocyte responses in both the SP and SCLN during the acute infection (33, 54, 55). For example, it has been shown that Fas selectively kills activated IgG⁺ B lymphocytes with specificities for parasite antigens (56). Moreover, SP-derived CD4⁺ and CD8⁺ T cells respond to Fas-induced apoptosis, as they demonstrate increased Fas/FasL expression and caspase-8 activation during acute infection (48, 55). In agreement with these data, it has been shown that the *in vivo* injection of anti-FasL and a general caspase inhibitor (zVAD-fmk) into acutely infected mice impairs T and B lymphocyte death and improves the host immune response to infection in both SCLN and SP (55, 57). Blockade of activated CD8⁺ T cell death increases IFN- γ secretion by splenocytes in the initial stages of infection, and IL-4 and IL-10 are induced at later stages (55, 58).

Box 2 | T cell apoptosis can be stimulated in secondary lymphoid organs by features such as activation-induced cell death (AICD), granzymes, or growth factor withdrawal (59, 60).

The abundance of antigens and cytokine production (IL-2) in the microenvironment is essential to trigger the cell death pathway (60). In the presence of a given antigen, IL-2 prompt T cells to die by AICD, through activation of death receptor molecules (Fas or TNF-R and caspase-8 activation) (61–63). The absence of antigen, deprivation of cytokines or cytotoxic factors (such as oxidative stress and glucocorticoids) initiates the intrinsic apoptotic pathway, regulated by anti-apoptotic BCL-2 family members that can be divided into three subgroups of proteins: (1) the pro-survival members (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, A1/Bfl-1, and Bcl-w); (2) the pro-apoptotic BH3-only proteins (Bim, Bid, Puma, Bad, Bmf, Hrk, Bik, and Noxa) activated transcriptionally, post-transcriptionally, or post-translationally by cytotoxic factors; and (3) multi-BH domain pro-apoptotic protein (Bak and Bax) (64–67). The intrinsic pathway of death involves mitochondrial membrane permeabilization, cytochrome c release into the cytoplasm, activation of caspase-9, and downstream effector caspases (61). Interestingly, regulatory T cells deprives the effector T cells of growth factors (such as IL-2), which causes either proliferation arrest and apoptosis mediated by growth factor withdrawal (59, 68).

Diminished numbers of MLN and PP lymphocytes from *T. cruzi*-infected mice appear to be associated with differences in lymphocyte activation, proliferation, and apoptosis. MLN-derived cells from infected mice show reduced numbers of proliferating lymphocytes *in vivo* and decreased cytokine production (IL-2, IL-4, IL-10) *in vitro* by activated T cells, which have been demonstrated to produce mainly type-1 cytokines (33, 49). In addition to Fas, TNFR1/p55-mediated signaling and IL-4 deprivation through caspase-9 activation are involved in T cell death and consequent MLN atrophy seen in the course of acute infection (33, 49). These data suggest that distinct mechanisms are involved in lymphocyte contraction events.

These studies demonstrated that lymphocyte apoptosis in secondary lymphoid organs represents an important feature of the immune response to a given pathogen. In agreement, the *in vivo* administration of zVAD-fmk reduces lymphocyte apoptosis in secondary lymphoid tissues and increases host resistance to *T. cruzi* infection (49). Moreover, SP or MLN cells are involved in the host immune response, as splenectomy or MLN excision prior to *T. cruzi* infection in mice increases susceptibility to infection with elevated blood parasitemia (49, 54). In this context, further studies are necessary to approach apoptosis-associated molecules that might be operating as a consequence of regional response following T cell activation and regulation in the course of *T. cruzi* infection (Box 2).

DOES A DISTINCT ROUTE OF INFECTION INTERFERE WITH SECONDARY LYMPHOID ORGAN DYNAMICS?

Previous data have revealed that oral *T. cruzi* inoculation results in blood parasitemia and heart tissue parasitism, thereby clearly indicating a systemic infection (30, 69, 70). A primary infection with insect-derived infective forms delivered orally resulted in parasite replication within epithelial cells of the gastric mucosa (69).

This initial invasion is related to establishment of a progressive gastritis and allows further systemic dissemination of the parasite. Nonetheless, the short replication period at this mucosal site induces specific immunity, as protection was observed after a secondary mucosal challenge. Such protection apparently involves the specific production of IgA and IgG (69) and possibly employs CCR5-CCL5 signaling (71).

Protection may also be due to IFN- γ -producing lymphocytes as indicated by their increased frequency in the gastric mucosa and draining lymph nodes of orally infected mice (69). Moreover, a mucosal vaccination approach leading to polarized type-1 or type-2 responses (72) as well as the mucosal challenge of genetically deficient mice (73) reinforced the central role for a type-1 response in providing protection following mucosal infection. Interestingly, these humoral and cellular responses are also protective after parasite inoculation in the conjunctival mucosa, a natural portal of entry for *T. cruzi* that leads to nasal infection with subsequent systemic spreading (74).

Following outbreaks of oral contamination by *T. cruzi*, a clear increase in the severity of clinical manifestations was observed in infected patients compared with other types of transmission routes (7, 75). These observations raise important questions concerning the particular features of *T. cruzi* entry via the mucosa, including the possible modulation of local immune mechanisms and the impact on regional and systemic immunity. In fact, we have previously shown that mice infected via both the *i.p.* and *s.c.* routes show similar parasitemia and induce SCLN expansion as well as MLN atrophy (33). Interestingly, the *s.c.* route induced higher SCLN cell expansion and similar MLN atrophy at the peak of parasitemia when compared with the *i.p.* route. These data suggest that unlike SCLN cells, MLN lymphocytes are similarly affected upon infection using both inoculation routes (33).

One can argue that an oral or intragastric infection might impact more severely on the mucosal associated lymphoid organs than the SCLN and SP. We still lack information regarding SCLN behavior in oral infection, but hyperplasia of the lymphoid follicles in the SP has been reported (30). Additionally, Hoft et al. (69) showed that after oral *T. cruzi* infection, BALB/c mice had an increase in gastric lymph node size. In this study, the analysis of cytokine production by gastric lymph node cells and splenocytes showed that IFN- γ and IL-4 were produced in these tissues. These data indicate that in both systemic and mucosal infections splenocytes exhibit a mixed type-1 and type-2 profile of cytokine secretion (48, 49, 69). Regarding the MLN response upon oral infection, no data have been reported in the literature. Therefore, a comparative analysis of oral infections versus other infection routes should be critically performed to better understand the immune mechanisms that are involved in the response to mucosal *T. cruzi* infection.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Chagas disease is characterized by both protective and immunopathogenic responses. An antigenic challenge in the host elicits a complex protective immune response that includes both inflammatory and regulatory networks. These networks are observed after *T. cruzi* infection and are induced due to

systemic infection. However, different routes of parasite entry may impact these immune circuits, define particular regional immune responses, and perhaps change the existing view of how the host mounts a protective immune response. Thus, the current micro-epidemic of the oral transmission of Chagas disease prompts revisiting previous findings (99). More importantly, new studies

investigating the influence of a primary infection with the parasite through mucose should be performed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded with grants from Fiocruz, CNPq, and Faperj (Brazil).

REFERENCES

- Hotez PJ, Molyneux DH, Stillwaggon E, Bentwich Z, Kumaresan J. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. *Lancet* (2006) **368**:1865–6. doi:10.1016/S0140-6736(06)69765-1
- Savino W, Villa-Verde DM, Mendes-Da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki Mdel P, et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev* (2007) **18**:107–24. doi:10.1016/j.cytofr.2007.01.010
- Dorn P, Buekens P, Hanford E. Whac-a-mole: future trends in Chagas transmission and the importance of a global perspective on disease control. *Future Microbiol* (2007) **2**:365–7. doi:10.2217/17460913.2.4.365
- Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gurtler RE. The challenges of Chagas disease – grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med* (2007) **4**:e332. doi:10.1371/journal.pmed.0040332
- Sanchez LV, Ramirez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology* (2012) **140**:147–59. doi:10.1017/S0031182012001394
- Bisio M, Seidenstein ME, Burgos JM, Ballering G, Risso M, Pontoriero R, et al. Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2011) **105**:543–9. doi:10.1016/j.trstmh.2011.07.003
- Barbosa-Ferreira JM, Guerra JA, Santana Filho FS, Magalhaes BM, Coelho LI, Barbosa MG. Cardiac involvement in Acute Chagas disease cases in the Amazon region. *Arq Bras Cardiol* (2010) **94**:147–9. doi:10.1590/S0066-782X2010000600023
- Pinto AY, Harada GS, Valente V, Abud JE, Gomes F, Souza GC, et al. Cardiac attacks in patients with acute Chagas disease in a family micro-outbreak, in Abaetetuba, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* (2001) **34**:413–9.
- Vinas Albajar P, Laredo SV, Terrazas MB, Coura JR. Dilated cardiomyopathy in patients with chronic Chagasic infection: report of two fatal autochthonous cases from Rio Negro, State of Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* (2003) **36**:401–7.
- Ianni BM, Mady C. The sugarcane juice was delicious, but. *Arq Bras Cardiol* (2005) **85**:379–81.
- Moreira OC, Ramirez JD, Velazquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop* (2013) **125**:23–31. doi:10.1016/j.actatropica.2012.08.020
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human Chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* (1993) **48**:348–57.
- Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, Beldjord C, et al. Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. *Lancet* (1995) **346**:1370–1. doi:10.1016/S0140-6736(95)92388-8
- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Correa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* (1996) **348**:891–2. doi:10.1016/S0140-6736(05)64761-7
- Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LM, et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* (1996) **149**:2153–9.
- Lane JE, Olivares-Villagomez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, Carter CE. Detection of *Trypanosoma cruzi* with the polymerase chain reaction and in situ hybridization in infected murine cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg* (1997) **56**:588–95.
- Olivares-Villagomez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human Chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg* (1998) **59**:563–70.
- Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis* (1999) **180**:480–6. doi:10.1086/314889
- Mortara RA, Da Silva S, Patrício FR, Higuchi ML, Lopes ER, Gabai AA, et al. Imaging *Trypanosoma cruzi* within tissues from Chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. *Parasitol Res* (1999) **85**:800–8. doi:10.1007/s004360050636
- Combs TP, Nagayoshi F, Mukherjee S, De Almeida CJ, Jelicks LA, Schubert W, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem* (2005) **280**:24085–94. doi:10.1074/jbc.M412802200
- Ferreira AV, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, De Oliveira Andrade L, et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect* (2011) **13**:1002–5. doi:10.1016/j.micinf.2011.06.002
- Sartori AM, Ibrahim KY, Nunes Westphalen EV, Braz LM, Oliveira OC Jr, Gakiya E, et al. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Ann Trop Med Parasitol* (2007) **101**:31–50. doi:10.1179/136485907X154629
- Fiorelli AI, Santos RH, Oliveira JL Jr, Lourenco-Filho DD, Dias RR, Oliveira AS, et al. Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. *Transplant Proc* (2011) **43**:220–4. doi:10.1016/j.transproceed.2010.12.046
- Ben Younes-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Tricotot V, Eisen H, Reynes M, Said G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1988) **82**:77–83. doi:10.1016/0035-9203(88)90269-6
- Higuchi M, Brito T, Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto A, et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial infiltrate in human chronic Chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol* (1993) **2**:101–6. doi:10.1016/1054-8807(93)90021-S
- Bellotti G, Bocchi EA, De Moraes AV, Higuchi ML, Barbero-Marcial M, Sosa E, et al. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J* (1996) **131**:301–7. doi:10.1016/S0002-8703(96)90358-0
- Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human Chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* (1997) **83**:165–72. doi:10.1006/clim.1997.4335
- Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. “Autoimmune rejection” of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**:3932–7. doi:10.1073/pnas.94.8.3932
- Marsden PD. *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. II. Infections induced by different routes. *Ann Trop Med Parasitol* (1967) **61**:62–7.
- Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biobeme in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* (2002) **44**:97–103. doi:10.1590/S0036-46652002000200008
- Caradonna K, Pereiraperrin M. Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* (2009) **77**:1349–56. doi:10.1128/IAI.01434-08

32. Minoprio PM, Coutinho A, Joskowicz M, D'Imperio Lima MR, Eisen H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol* (1986) **24**:669–79. doi:10.1111/j.1365-3083.1986.tb02186.x
33. de Meis J, Mendes-Da-Cruz DA, Farias-De-Oliveira DA, Correa-De-Santana E, Pinto-Mariz F, Cotta-De-Almeida V, et al. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. *Microbes Infect* (2006) **8**:221–31. doi:10.1016/j.micinf.2005.06.027
34. Bryan MA, Norris KA. Genetic immunization converts the *Trypanosoma cruzi* B-Cell mitogen proline racemase to an effective immunogen. *Infect Immun* (2010) **78**:810–22. doi:10.1128/IAI.00926-09
35. Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med* (2000) **6**:890–7. doi:10.1038/78651
36. Buschiazzo A, Goytia M, Schaeffer F, Degraeve W, Shepard W, Gregoire C, et al. Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**:1705–10. doi:10.1073/pnas.0509010103
37. Rodriguez AM, Santoro F, Afchain D, Bazin H, Capron A. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect Immun* (1981) **31**:524–9.
38. Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guillet B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol* (1988) **28**:553–61. doi:10.1111/j.1365-3083.1988.tb01487.x
39. Minoprio P, Coutinho A, Spinella S, Hontebeyrie-Joskowicz M. Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *Int Immunol* (1991) **3**:427–33. doi:10.1093/intimm/3.5.427
40. Yoshida N, Araya JE, Da Silveira JF, Giorgio S. *Trypanosoma cruzi*: antibody production and T cell response induced by stage-specific surface glycoproteins purified from metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol* (1993) **77**:405–13. doi:10.1006/expr.1993.1100
41. Freire-de-Lima C, Pecanha LM, Dos Reis GA. Chronic experimental Chagas' disease: functional syngeneic T-B-cell cooperation in vitro in the absence of an exogenous stimulus. *Infect Immun* (1996) **64**:2861–6. (2008) **38**:139–46. doi:10.1002/eji.200737582
42. De Arruda Hinds LB, Alexandre-Moreira MS, Decote-Ricardo D, Nunes MP, Pecanha LM. Increased immunoglobulin secretion by B lymphocytes from *Trypanosoma cruzi* infected mice after B lymphocytes-natural killer cell interaction. *Parasite Immunol* (2001) **23**:581–6. doi:10.1046/j.1365-3024.2001.00418.x
43. Girones N, Rodriguez CI, Carrasco-Marin E, Hernaez RF, De Rego JL, Fresno M. Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J Clin Invest* (2001) **107**:985–93. doi:10.1172/JCI10734
44. Gao W, Wortis HH, Pereira MA. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int Immunol* (2002) **14**:299–308. doi:10.1093/intimm/14.3.299
45. Acosta Rodriguez EV, Zuniga EI, Montes CL, Merino MC, Bermejo DA, Amezcuia Vesely MC, et al. *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first? *Scand J Immunol* (2007) **66**:137–42. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01968.x
46. Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol* (1996) **8**:13–22. doi:10.1093/intimm/8.1.13
47. Millar AE, Kahn SJ. The SA85-1.1 protein of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen. *Infect Immun* (2000) **68**:3574–80. doi:10.1128/IAI.68.6.3574-3580.2000
48. Silva EM, Guillermo LV, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Pereira RM, Wu Z, et al. Caspase-8 activity prevents type 2 cytokine responses and is required for protective T cell-mediated immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* (2005) **174**:6314–21.
49. de Meis J, Ferreira LM, Guillermo LV, Silva EM, Dosreis GA, Lopes MF. Apoptosis differentially regulates mesenteric and subcutaneous lymph node immune responses to *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol* (2008) **38**:139–46. doi:10.1002/eji.200737582
50. Florez O, Esper J, Higuera S, Barraza MF, Cabrera HB, Mantilla JC, et al. Chagasic megacolon associated with *Trypanosoma cruzi* I in a Colombian patient. *Parasitol Res* (2010) **107**:439–42. doi:10.1007/s00436-010-1874-2
51. Teixeira AR, Nitz N, Guimaraes MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J* (2006) **82**:788–98. doi:10.1136/pgmj.2006.047357
52. da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol* (2007) **38**:1256–64. doi:10.1016/j.humpath.2007.01.020
53. Antunez MI, Feinstein RE, Cardoni RL, Gronvik KO. *Trypanosoma cruzi*: T cell subpopulations in the Peyer's patches of BALB/c infected mice. *Exp Parasitol* (1997) **87**:58–64. doi:10.1006/expr.1997.4171
54. de Meis J, Morrot A, Farias-De-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* (2009) **3**:e417. doi:10.1371/journal.pntd.0000417
55. Guillermo LV, Silva EM, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Pereira WF, Yagita H, et al. The Fas death pathway controls coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol* (2007) **81**:942–51. doi:10.1189/jlb.1006643
56. Zuniga E, Motran CC, Montes CL, Yagita H, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. *J Immunol* (2002) **168**:3965–73.
57. Silva EM, Guillermo LV, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Nunes MP, Senra JF, et al. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol* (2007) **37**:738–46. doi:10.1002/eji.200636790
58. Lopes MF, Guillermo LV, Silva EM. Decoding caspase signaling in host immunity to the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Trends Immunol* (2007) **28**:366–72. doi:10.1016/j.it.2007.06.004
59. Pandiyan P, Zheng L, Lenardo MJ. The molecular mechanisms of regulatory T cell immunosuppression. *Front Immunol* (2011) **2**:60. doi:10.3389/fimmu.2011.00060
60. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, et al. Mature T lymphocyte apoptosis – immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* (1999) **17**:221–53. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.221
61. Zheng L, Trageser CL, Willerford DM, Lenardo MJ. T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *J Immunol* (1998) **160**:763–9.
62. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* (2003) **193**:70–81. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00051.x
63. Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* (2004) **1**:186–92.
64. Ke F, Voss A, Kerr JB, O'Reilly LA, Tai L, Echeverry N, et al. BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell Death Differ* (2012) **19**:915–25. doi:10.1038/cdd.2011.210
65. Mason KD, Lin A, Robb L, Josefsson EC, Henley KJ, Gray DH, et al. Proapoptotic Bak and Bax guard against fatal systemic and organ-specific autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) **110**:2599–604. doi:10.1073/pnas.1215097110
66. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, Van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* (2007) **315**:856–9. doi:10.1126/science.1133289
67. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* (2008) **18**:157–64. doi:10.1016/j.tcb.2008.01.007
68. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* (2007) **8**:1353–62. doi:10.1038/ni1536
69. Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun* (1996) **64**:3800–10.
70. Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Hidalgo C, Vidal T, Fachado A, et al. Specific cellular and humoral immune response in Balb/c mice immunised with an expression

- genomic library of *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* (1998) **16**:608–12. doi:10.1016/S0264-410X(97)00228-4
71. Sullivan NL, Eickhoff CS, Zhang X, Giddings OK, Lane TE, Hoft DF. Importance of the CCR5-CCL5 axis for mucosal *Trypanosoma cruzi* protection and B cell activation. *J Immunol* (2011) **187**(3):1358–68. doi:10.4049/jimmunol.1100033
72. Hoft DF, Eickhoff CS. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun* (2002) **70**:6715–25. doi:10.1128/IAI.70.12.6715-6725.2002
73. Hoft DF, Eickhoff CS. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. *Infect Immun* (2005) **73**:4934–40. doi:10.1128/IAI.73.8.4934-4940.2005
74. Giddings OK, Eickhoff CS, Smith TJ, Bryant LA, Hoft DF. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. *Infect Immun* (2006) **74**:5549–60. doi:10.1128/IAI.00319-06
75. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* (2012) **54**:845–52. doi:10.1093/cid/cir956
76. Andrade ZA, and Silva HR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1995) **90**:521–2. doi:10.1590/S0074-02761995000400018
77. Buckner FS, Wilson AJ, Van Voorhis WC. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase. *Infect Immun* (1999) **67**:403–9.
78. Guarner J, Bartlett J, Zaki SR, Colley DG, Grijalva MJ, Powell MR. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am J Trop Med Hyg* (2001) **65**:152–8.
79. Correa-de-Santana E, Paez-Pereira 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**:12–22.
- doi:10.1016/j.jneuroim.2005.08.015
80. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, Da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) **6**:e1689. doi:10.1371/journal.pntd.0001689
81. Cortez M, Silva MR, Neira I, Ferreira D, Sasso GR, Luquetti AO, et al. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect* **8**:36–44. doi:10.1016/j.micinf.2005.05.016
82. Veloso VM, Guedes PM, Andrade IM, Caldas IS, Martins HR, Carneiro CM, et al. *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2008) **103**:528–34. doi:10.1590/S0074-02762008000600003
83. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, 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**:e58480. doi:10.1371/journal.pone.0058480
84. Morocoima A, Rodriguez M, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism of bone and cartilage. *Parasitol Res* (2006) **99**:663–8. doi:10.1007/s00436-006-0211-2
85. Baena Teran R, Arancibia A, Basquiera AL, De La Fuente JL, Ricchi B, De Diller AB. *Trypanosoma cruzi* in the bone marrow. *Br J Haematol* (2012) **157**:1. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09049.x
86. Da Costa SC, Calabrese KS, Bauer PG, Savino W, Lagrange PH. Studies of the thymus in Chagas' disease: III. Colonization of the thymus and other lymphoid organs of adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathol Biol (Paris)* (1991) **39**:91–7.
87. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* (1999) **100**:163–72. doi:10.1016/S0166-6851(99)90035-X
88. Rachid MA, Teixeira AL, Barcelos LS, Machado CR, Chiari E, Tanowitz HB, et al. Role of endothelin receptors in the control of central nervous system parasitism in *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *J Neuroimmunol* (2010) **220**:64–8. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.01.008
89. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, D'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* (2000) **156**:1805–9.
90. Schijman AG, Vigliano CA, Viotti RJ, Burgos JM, Branderiz S, Lococo BE, 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**:210–20.
91. Vago AR, Silva DM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Avila Reis D. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaoesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2003) **97**:308–9. doi:10.1016/S0035-9203(03)90155-6
92. Staquicini DI, Martins RM, Macedo S, Sasso GR, Atayde VD, Juliano MA, et al. (2010). Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* **4**:e613. doi:10.1371/journal.pntd.0000613
93. Kuhn RE, Vaughn RT, Iannuzzi NP. The *in vivo* distribution of 51Cr-labeled *Trypanosoma cruzi* in mice. *Int J Parasitol* (1974) **4**:585–8. doi:10.1016/0020-7519(74)90022-8
94. Nogueira N, Gordon S, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. *J Exp Med* (1977) **146**:157–71. doi:10.1084/jem.146.1.157
95. Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int* (2008) **57**:105–9. doi:10.1016/j.parint.2007.12.008
96. DePaolo RW, Kamdar K, Khakpour S, Sugира Y, Wang W, Jabri B. A specific role for TLR1 in protective T(H)17 immunity during mucosal infection. *J Exp Med* (2012) **209**:1437–44. doi:10.1084/jem.20112339
97. Pepper M, Linehan JL, Pagan AJ, Zell T, Dileepan T, Cleary PP, et al. Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nat Immunol* (2010) **11**:83–9. doi:10.1038/ni.1826
98. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* (1999) **401**:708–12. doi:10.1038/44385
99. Barbosa-Ferreira JM, Nobre AF, Maldonado JG, Borges-Pereira J, Zauza PL, Coura JR. Stroke in a chronic autochthonous Chagas disease patient from the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* (2010) **43**:751–3. doi:10.1590/S0037-86822010000600034

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 15 April 2013; accepted: 13 July 2013; published online: 26 July 2013.

Citation: de Meis J, Barreto de Albuquerque J, Silva dos Santos D, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, Cotta-de-Almeida V and Savino W (2013) *Trypanosoma cruzi* entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in mice. *Front. Immunol.* **4**:216. doi:10.3389/fimmu.2013.00216

This article was submitted to Frontiers in Immunological Memory, a specialty of Frontiers in Immunology.

Copyright © 2013 de Meis, Barreto de Albuquerque, Silva dos Santos, Farias-de-Oliveira, Berbert, Cotta-de-Almeida and Savino. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.