

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIANA TAVARES RAMOS

Atividade Imuno-Endócrina em camundongos infectados pelo
Trypanosoma cruzi por via oral

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

Orientador (es): Prof. Dra. Juliana de Meis
Prof. Dr. Vinícius de Frias Carvalho

RIO DE JANEIRO
2017

Ramos, Mariana Tavares.

Atividade Imuno-Endócrina em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* por via oral / Mariana Tavares Ramos. - Rio de Janeiro, 2017.

57 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

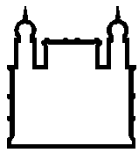
Orientadora: Juliana de Meis.

Co-orientador: Vinicius de Frias Carvalho.

Bibliografia: f. 51-57

1. doença de chagas. 2. eixo HPA. 3. glicocorticoides. 4. *T. cruzi*. 5. citocinas. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: MARIANA TAVARES RAMOS

**ATIVIDADE IMUNO-ENDÓCRINA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO
TRYPANOSOMA CRUZI POR VIA ORAL**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Juliana de Meis
Prof. Dr. Vinícius de Frias Carvalho

Aprovada em: 20 / 07 / 2017

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Mariana Caldas Waghabi - Presidente

Prof. Dra. Denise Pires Carvalho

Prof. Dra. Valéria de Mello Coelho

Prof. Dr. Eduardo Fonseca Pinto

Prof. Dr. Rubem F. S. Menna Barreto

Rio de Janeiro, 20 de julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

A elaboração desta dissertação é, não somente o resultado dos objetivos estipulados para o meu projeto, mas a finalização de um dos primeiros passos da minha vida acadêmica. Por essa conquista tenho a agradecer inúmeras pessoas que me ajudaram e apoiaram.

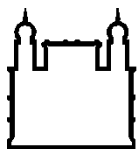
Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades que me concedeu e tantas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho. Agradeço a toda minha família pelo amor e paciência e principalmente aos meus pais Alcir e Celeste pelo apoio e confiança.

Aos meus orientadores Juliana de Meis e Vinicius de Frias Carvalho por toda a paciência, todo ensino e estímulo. A todo o Laboratório de Pesquisa Sobre o Timo, em especial ao Dr. Vinícius Cotta de Almeida e ao grupo de pesquisa em Doença de Chagas: Alessandro Marins dos Santos, Barbara Angélica dos Santos Mascarenhas de Souza, Danielle Silva dos Santos, Déa Maria Serra Villa-Verde, Dina de Jesus Antunes, Désio Aurélio Farias de Oliveira, Juliana Barreto de Albuquerque, Luiz Ricardo Berbert. Ao Laboratório de Inflamação, em especial a Ana Carolina Santos de Arantes, Andrey Junior Moreira Fernandes, Antônio Gabriel de Souza Silva, Joice Caroline Sá de Lima e Nathalia Magalhães. Ao Dr. Otacílio Moreira e suas alunas Natália e Carol do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas. A Dra. Ângela Junqueira e ao Dr. Carlos José do Laboratório de Doenças Parasitárias. Dr. Wilson Savino, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), a Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PGBCM), ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Epígrafe

“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o rio da vida - ninguém, exceto tu, só tu [...]”.

Friedrich Nietzsche



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

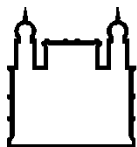
ATIVIDADE IMUNO-ENDÓCRINA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* POR VIA ORAL

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Mariana Tavares Ramos

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e estima-se que a doença afete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo os países de maior incidência da doença os da América Latina. Atualmente a forma de transmissão mais frequente no Brasil é a transmissão por via oral, causada pelo consumo de comida ou bebida contaminada pelo *T. cruzi* ou extrato do triatomíneo infectado. A fase aguda da infecção por via oral é associada a um maior índice de mortalidade e a uma sintomatologia mais grave quando comparada com a forma vetorial clássica da infecção (contato com fezes/urina de triatomíneo infectado durante o seu repasto sanguíneo). A infecção aguda pelo *T. cruzi* estimula uma intensa resposta imunológica do hospedeiro, com a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, algumas das quais são capazes de ativar o eixo Hipotálamo-Hipófise- Adrenal (HPA), o que resulta em um aumento dos níveis circulantes de glicocorticoides, que atuam no controle da resposta imunológica do hospedeiro. Neste trabalho, nós estudamos a produção de citocinas e a atividade do eixo HPA durante a fase aguda em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* por via oral. Para tal, camundongos BALB/c machos com idade de 6 a 8 semanas foram infectados com 5×10^4 formas tripomastigotas da cepa *Tulahuén*. A parasitemia dos animais infectados tratados e não tratados foi avaliada utilizando-se o método Pizzi-Brener, a presença de parasitas no tecido por histologia e do DNA do parasito por qPCR. A hipertrofia das células fasciculares por histologia e a expressão dos moduladores moleculares por RTqPCR. Os níveis das citocinas IL-6, TNF- α e INF- γ foram analisados por citometria de fluxo com o kit CBA (BD) e os níveis de corticosterona por RIA. Nossos resultados confirmaram que a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* promove um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas e de corticosterona, ambas atingindo o pico em 21dpi. Os altos níveis de citocinas e corticoides produzidos em 21 dpi correlacionam com o período de altos níveis de parasitemia e com a presença do DNA do parasita nas glândulas hipotálamo, hipófise e adrenal, além do aumento do peso das adrenais e hipertrofia da zona fasciculada da mesma. Também observamos um importante aumento da expressão gênica do receptor de TNF na hipófise e hipotálamo de camundongos infectados no mesmo ponto de infecção, além do aumento do receptor de ACTH nas adrenais. Porém, quando realizados bloqueios da citocina TNF e de glicocorticoides não foram observadas diferenças na parasitemia dos grupos tratado e não tratados. Esses resultados evidenciam que durante a infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* há um aumento da parasitemia, o aumento do peso e das células da zona fasciculada das glândulas adrenais, e um aumento nos níveis circulantes de citocinas inflamatórias, a presença do parasita nas glândulas que constituem o eixo HPA concomitantemente com o aumento nos níveis de corticosterona, o que pode sugerir que tanto as citocinas quanto o próprio *T. cruzi* podem estar ativando o eixo HPA.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMMUNE-ENDOCRINE ACTIVITY IN *TRYPANOSOMA CRUZI* ORALLY INFECTED MICE

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariana Tavares Ramos

Chagas' disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and is estimated to infect around 6 to 7 million people around the world, being countries with the highest incidence of the disease in Latin America. Currently, the most frequent form of transmission in Brazil is oral transmission, caused by the consumption of food or drink contaminated by *T. cruzi* or extract of infected triatomine. The acute phase of oral infection is associated with a higher mortality rate and more severe symptomatology compared to the classical vector form of infection (contact with feces / urine of infected triatomine during its blood repellent). Acute infection by *T. cruzi* stimulates an intense host immune response with the production of high levels of pro-inflammatory cytokines, some of which are capable to activate the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, resulting in increased circulating levels of glucocorticoids, which act to control the immune response of the host. In this work, we studied the cytokine production and HPA axis activity during the acute phase of Chagas disease in mice infected orally with *Trypanosoma cruzi*. For this, male BALB/c mice aged 6 to 8 weeks were infected with 5×10^4 trypomastigote forms of the Tulahuén strain. The parasitemia of treated and untreated infected animals was evaluated using the Pizzi-Brener method and the presence of parasites in the tissue by histology and qPCR. The hypertrophy of fascicular cells was quantified by histology and the expression of molecular modulators of HPA axis by qPCR. Cytokine and corticosterone levels were analyzed by flow cytometry with the CBA kit (BD) and RIA, respectively. Our results showed that the acute phase of *T. cruzi* infection promotes an increase in the plasmatic production of pro-inflammatory IL-6, TNF- α and IFN- γ cytokines and corticosterone, both peaking at 21dpi. The high levels of cytokines and corticosteroids produced in 21 dpi are correlated with the period of high levels of parasitemia and the presence of parasite DNA in the hypothalamus, pituitary and adrenal glands. The increase of weight and fasciculate zone hypertrophy of the adrenal gland also occurs at 21 dpi. Furthermore, we observed a significant increase in the TNF and glucocorticoid receptors gene expression in the pituitary and hypothalamus of infected mice at the same point of infection, in addition to the increase of the ACTH receptor (MC2R) in the adrenals. However, when TNF- α and glucocorticoid were blocked, no differences were observed in the parasitemia of the treated and untreated groups. These results showed that during the oral infection by *T. cruzi*, there is an increase in parasitemia, the presence of the parasite in the tissues that compose the HPA axis, the increase of the weight and the cells area of the zona fasciculata of the adrenal glands, and a rise in circulating levels of pro-inflammatory cytokines and corticosterone levels, concomitantly with the presence of the parasite in the glands that constitute the HPA axis, which may suggest that both cytokines and *T. cruzi* itself may be activating the HPA axis.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas.....	Erro! Indicador não definido.
1.1.1. Epidemiologia.....	1
1.1.2. Transmissão.....	3
1.1.2.1. Transmissão oral	3
1.1.3. Manifestações clínicas.....	6
1.1.4. Fase Aguda	7
1.2. Sistema Imune na Doença de Chagas	8
1.3. Eixo HPA.....	10
1.3.1. Eixo HPA e sistema imune.....	12
1.3.2. O eixo HPA na Doença de Chagas	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. METODOLOGIA	17
3.1. Animais	17
3.2. Parasitas e infecção	17
3.3. Tratamentos	17
3.4. Análise histológica do eixo HPA.....	18
3.6. Avaliação da carga parasitária no eixo HPA	19
3.7. Análise do perfil de citocinas plasmáticas	19
3.8. Quantificação de corticosterona.....	20
3.9. Expressão gênica dos mecanismos de regulação molecular do eixo HPA	20
3.10. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Parasitemia de camundongos infectados por via oral com <i>T. cruzi</i>	22
4.2. Análise da presença do <i>T. cruzi</i> nas glândulas hipotálamo, hipófise e adrenal de camundongos infectados por via oral.....	23
4.3. Análise da hipertrofia das glândulas adrenais de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> por via oral.....	26
4.4. Análise do perfil de citocinas e quantificação de corticosterona em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> por via oral.....	27
4.5. Correlação entre a produção de citocinas e a atividade do eixo HPA em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> por via oral.....	28
4.6. Análise da expressão gênica dos moduladores moleculares do eixo HPA em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> por via oral.....	29
4.7. Efeito do bloqueio de TNF- α ou de do receptor de corticosterona sobre a parasitemia de animais infectados com <i>T. cruzi</i> por via oral.....	30
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	37
7. PERSPECTIVAS	38
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação geográfica de áreas com indivíduos infectados com <i>T. cruzi</i> :.....	2
Figura 2: O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal:.....	11
Figura 3 Análise do parasitismo em regiões da cabeça de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> por via oral.	15
Figura 4: Análise da parasitemia de camundongos infectados por via oral.	22
Figura 5: Avaliação histológica das glândulas que constituem o eixo HPA de camundongos infectados por via oral.	24
Figura 6: Avaliação histológica da hipertrofia das células da zona fasciculada de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> por via oral.	25
Figura 7: Avaliação da presença de DNA de parasitas nos órgãos que constituem o eixo HPA de camundongos infectados por via oral.	25
Figura 8: Análise da hipertrofia das glândulas adrenais de camundongos infectados pela via oral.	26
Figura 9: Análise do perfil de citocinas de camundongos infectados por via oral com <i>T. cruzi</i>.	27
Figura 10 Avaliação da produção de corticosterona por camundongos infectados via oral com <i>T. cruzi</i>.	28
Figura 11: Correlação entre sistema imune e produção de glicocorticoides em camundongos infectados via oral com <i>T. cruzi</i>.	29
Figura 12: Quantificação da expressão gênica dos moduladores moleculares do eixo HPA.	29
Figura 13: Análise do impacto de citocinas e glicocorticoides no desenvolvimento da parasitemia na doença de chagas.	31

INDICE DE QUADROS

Quadro 1.1 Relação de países da América Latina e surtos de doença de Chagas ocasionados por transmissão oral.....	4
Quadro 1.2: Quadro representativo dos sintomas característicos nas fases agudas de duas vias de transmissão vetorial: clássica e oral.....	7
Quadro 3: Relação de primers dos receptores de hormônios e citocinas, do DNA de <i>T. cruzi</i> , e dos genes constitutivos utilizados para reações de amplificação, e seus respectivos dados..	21

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
- Ca⁺: Cálcio
- CBA: Ensaio citométrico de beads (*cytometric beads array*)
- CCL: Quimiocina, Família CC (dupla cisteína)
- CRH: hormônio liberador de corticotrofina
- CXCL: Quimiocina, Família CXC (cisteína separada por aminoácido)
- DNA: Ácido desoxiribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- dpi: Dias pós infecção
- GAPDH: gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
- GC: glicocorticoide
- gp: Glicoproteína
- GR: receptor de glicocorticoide
- HE: Hematoxilina e Eosina
- HPA: hipotálamo, hipófise, adrenal.
- HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
- i.g: Infecção intragástrica
- i.n: infecção intranasal
- i.o: infecção oral
- i.p: infecção intraperitoneal
- i.v: infecção intravenosa
- Ig: Imunoglobulina
- IL: Interleucinas
- INF- γ : Interferon - gama
- Ln: Logarítimo natural
- Mc2R: receptor d ACTH
- mRNA: RNA mensageiro
- NK: Célula assassina natural (*natural killer*)
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- PCR: reação de polimerase em cadeia
- PVN: núcleo paraventricular
- qPCR: PCR quantitativo em tempo real
- RIA: Radio Imuno Ensaio (*Radio Immune Assay*)

- RNA: Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- RPMI: Meio de cultura (*Roswell Park Memorial Institute*)
- s.c: infecção subcutânea
- SBF: Soro bovino fetal (*serum blocking factor*)
- SNC: sistema nervoso central
- *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*
- TGF- β : Fator de transformação do crescimento (*Transforming growth factor*) - beta
- TLR: Receptor tipo Toll (*Toll-Like Receptor*)
- TNF- α : Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*) – alfa

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A Tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descoberto em abril de 1909 por Carlos Justiniano Chagas. Os *Trypanosomas* são parasitas intracelulares obrigatórios cujas formas celulares se alteram durante o ciclo biológico tanto no hospedeiro definitivo, mamífero, quanto no inseto vetor, o triatomíneo (comumente conhecido como barbeiro)(1). Quando presente no hospedeiro invertebrado, o parasita passa por uma série de transformações morfológicas específicas de porções particulares do intestino do inseto. No intestino médio do vetor, os parasitas ingeridos durante o repasto sanguíneo na forma tripomastigota, se diferenciam em epimastigotas (não infectantes) e se multiplicam. Na porção mais distal do intestino, acontece uma nova mudança morfológica aonde os parasitas assumem a forma infectante tripomastigota metacíclica, que é eliminada nas fezes do vetor durante seu repasto sanguíneo. Uma vez que o parasita entra em contato com as células do hospedeiro, nesse estágio evolutivo, consegue infectá-las, assumindo então seu formato não flagelado, amastigota, que é o estágio de multiplicação no hospedeiro vertebrado. Após a multiplicação, o parasita assume novamente a sua forma flagelada circulante (tripomastigota) e rompe as células do hospedeiro. Uma vez nesse estágio evolutivo, e presente no sistema circulatório, o parasita poderá ser ingerido pelo inseto vetor durante seu repasto sanguíneo, fechando o ciclo biológico (2–5).

1.1.1. Epidemiologia

Após mais de 100 anos de sua descoberta, a doença de Chagas permanece um grande problema para a saúde pública em 21 países da América, além de ser atualmente reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas (6). Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi* e que mais de 10.000 pessoas morrem todo ano devido a manifestações clínicas da doença. Além disso, cerca de 25 milhões de pessoas apresentam-se sob risco de contrair a doença (OMS, 2017).

Mais de 130 espécies de triatomíneos já foram descritas como potenciais vetores da Doença de Chagas, e dessas, 52 espécies foram descritas como presentes no Brasil, sendo 5 de maior importância epidemiológica por serem encontradas em áreas domiciliares (7). Programas governamentais para o controle e diminuição dos vetores da doença de Chagas na América Latina começaram a surgir no início de 1960, tendo em vista o crescente número de casos da doença na época. Dentre eles, destacou-se a Iniciativa Cone Sul, formada em

novembro de 1991 pelos governos da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Tal programa tinha como principal objetivo conter a transmissão do parasita através da eliminação do principal vetor domiciliar, o *Triatoma infestans*, e da redução e erradicação da transmissão por transfusão sanguínea (8,9). Um progresso significativo foi atingido no Cone Sul devido a essas medidas de controle, e algumas áreas foram consideradas livres de vetores como os estados Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, São Paulo, Rio de Janeiro, porém, a posterior repopulação dos insetos nessas áreas, e a possível propagação para regiões vizinhas de vetores infectados pelo *T. cruzi* culminou em casos recentes da forma aguda da doença de Chagas (8–10).

Embora considerada originalmente uma doença Latino Americana, novos casos da doença podem ser encontrados em outros continentes, devido a migrações cada vez mais frequentes e numerosas de indivíduos infectados e através de outros mecanismos de transmissão que não a vetorial, como por exemplo, a transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (11,12). Estima-se hoje que mais de 300.000 indivíduos estejam infectados pelo *T. cruzi* nos Estados Unidos, 5.500 no Canadá, 80.000 na Europa e na região oeste do Pacífico, 3.000 no Japão e 1.500 na Austrália (13). A doença de Chagas é classificada, do ponto de vista mundial, a terceira parasitose mais prevalente depois da malária e esquistossomose (14).

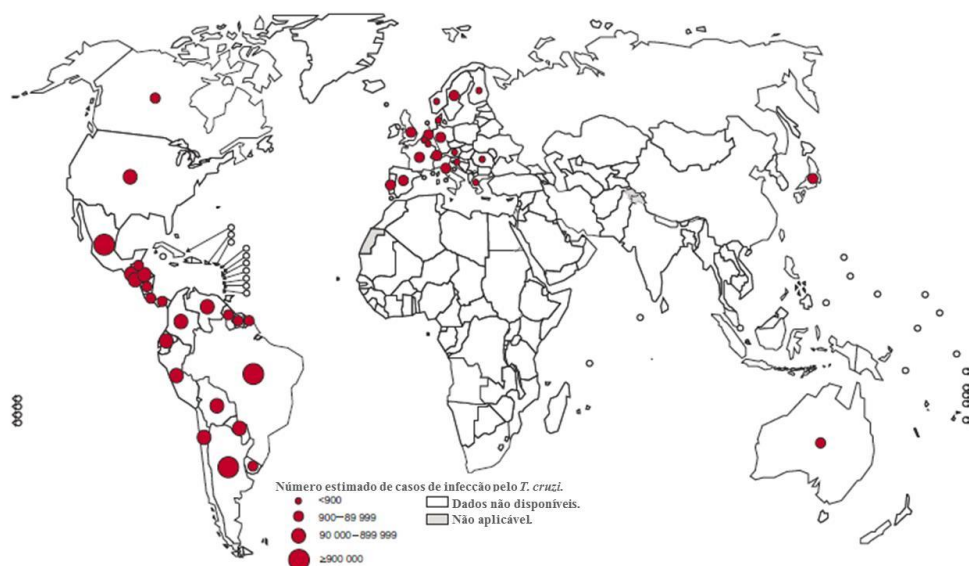


Figura 1: Representação geográfica de áreas com indivíduos infectados com *T. cruzi*. A migração populacional de áreas endêmicas para não endêmicas tornou a doença de Chagas emergente em países da América do Norte, Europa e Ásia, nos quais as principais formas de transmissão são as não vetoriais. Porém, o foco da doença permanece em países das Américas Central e Sul (Fonte: <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-disease-background/>).

1.1.2. Transmissão

Classicamente o parasita causador da doença de Chagas é transmitido durante o repasto sanguíneo do triatomíneo infectado, sendo *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis* as principais espécies de vetores da doença na América latina (15,16). Após se alimentar, o triatomíneo infectado defeca, e em suas fezes, estão presentes parasitas na forma infectante tripomastigota metacíclica. A picada do vetor causa uma sensação de prurido ao hospedeiro, que coça o local da picada, promovendo de forma mecânica a inserção do parasita na ferida. As diferentes formas evolutivas do parasita, epimastigotas, e tripomastigotas, são capazes de interagir com as células do hospedeiro definitivo, porém, a forma clássica de infecção ocorre pela penetração de tripomastigotas metacíclicos em macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais no sítio da infecção (3).

A doença de Chagas também apresenta outras formas de transmissão que não por via vetorial clássica, como a via oral, a via congênita – de mãe para filho, a transmissão por transfusão sanguínea de doador infectado, por transplante de órgãos, por acidentes de trabalho e a via sexual (ainda não comprovada em humanos) (7,12,13,17–19).

1.1.2.1. Transmissão oral

A infecção oral é caracterizada pelo consumo de alimentos e bebidas contaminados com as fezes do triatomíneo contendo o *T. cruzi*, e/ou o mesmo macerado juntamente aos alimentos. Também pode acontecer pelo consumo de carne crua ou mal cozida de animais reservatórios infectados com o parasita(20).

Embora a maioria dos relatos de doença de Chagas transmitida por via oral seja atribuída ao Brasil, outros países da América Latina, como a Colômbia, Argentina, Guiana-Francesa, Bolívia, Venezuela e Equador também apresentaram casos da doença relacionados a essa via de transmissão(21,22).

País	Número de pacientes acometidos	Data
BOLÍVIA	14	2010
BRASIL	366	1968 - 2015
COLOMBIA	101	1999 - 2014
GUIANA FRANCESA	8	2005
VENEZUELA	247	2007 - 2012

Quadro 1.1 Relação de países da América Latina e surtos de doença de Chagas ocasionados por transmissão oral (Adaptado de Noya *et al*,2015).

Entre os anos de 1933 e 1950, a via oral já era considerada um possível mecanismo de transmissão entre animais silvestres através da ingestão da excreta de triatomíneos e, posteriormente, constatou-se que essa era também uma possível forma de contágio para o ser humano (23). O primeiro surto devido à transmissão por via oral foi relatado em 1965, no município de Teutônia, Rio Grande do Sul. Nesse surto foram registrados 17 pacientes com a forma aguda da Doença de Chagas, dos quais 6 morreram. Presume-se que a transmissão tenha ocorrido pelo consumo de vegetais contaminados com secreções de marsupiais infectados (24). Atualmente, acredita-se que esta via de transmissão seja a mais frequente no Brasil, principalmente em áreas endêmicas, como o norte e nordeste (2).

Entre 1965 e 2009, 7 a 8 surtos (112 casos agudos) aconteceram em áreas fora da Amazônia onde havia controle de triatomíneos. Dentre esses, 24 casos agudos foram notificados no ano de 2005, tendo sido causados pelo consumo de cana de açúcar, em Santa Catarina (2,21).

No Brasil, relatos de surtos de doença de Chagas apresentam-se predominantes na região Amazônica, e mais de 50% dos casos agudos registrados entre 1968 e 2000 eram atribuíveis a microepidemias da infecção transmitida por via oral (25). Posteriormente, entre 2000 e 2010, um aumento desse percentual foi notado. Mais de 1.000 casos agudos foram notificados principalmente na Bacia Amazônica, desses 71% (776) foram atribuídos à ingestão de alimentos como açaí, caldo-de-cana e suco de frutas contaminados com o triaominio infectado, ou com excretas de triatomíneos/animais reservatórios infectados (2). Nos últimos 10 anos (de 2006 a 2016), somente no estado do Pará, foram notificados mais de

1500 novos casos de Doença de Chagas, sendo desses aproximadamente 70% devidos à transmissão por via oral (SESPA/MS).

Em modelo experimental de infecção oral, foi descrito que as formas tripomastigotas metacíclicas são ingeridas, podendo penetrar o epitélio da mucosa gástrica e, uma vez no meio intracelular, se multiplicar após diferenciação na forma amastigota (10). O processo de invasão das células hospedeiras pelo *T. cruzi* envolve vários componentes provenientes tanto do parasita quanto da célula a ser infectada. A principal marca da invasão celular do parasita é a ativação de cascatas de sinalização que levam ao aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) (10).

Dados experimentais mostram que, após inoculação por gavagem em camundongos, o parasita alcança o lúmen estomacal, onde a glicoproteína de superfície gp82, expressa em sua forma metacíclica, se liga à mucina gástrica. Após a ligação inicial do parasita a célula da mucosa gástrica do hospedeiro, o processo de invasão celular é iniciado no momento em que a adesão da molécula gp82 induz um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} . Esse aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} promove o rompimento do citoesqueleto de actina, o que facilita a mobilização de lisossomos para a periferia celular onde sua fusão com a membrana plasmática contribui para a biogênese do vacúolo parasitóforo. A inibição desse evento resulta no comprometimento da internalização do parasita. Após a invasão das células do hospedeiro, formas metacíclicas se diferenciam para a forma amastigota, e iniciam ciclos de replicação (10,26).

Em dados experimentais utilizando-se um modelo de infecção onde o inoculo é realizado na cavidade oral dos camundongos, foi possível observar que o primeiro sítio de contato do parasito com as células do hospedeiro é a região naso-maxilar, aonde foi possível observar por bioluminescência que, tão logo após a realização do inóculo (15min), o parasita invade as células dessa região. Posteriormente, nesse modelo de infecção, ele segue se multiplicando pelos tecidos da cavidade oral e órgãos adjacentes como a cavidade nasal, o palato, a região maxilar, e se disseminando pelo corpo do hospedeiro atingindo o estômago após 1 hora de infecção (27).

Vale ressaltar que, os dois modelos de infecção oral apresentam diferenças na progressão da doença. Por exemplo, os níveis de parasitemia e de mortalidade na infecção com inóculo na mucosa oral (i.o) são notavelmente maiores que os níveis resultantes do inóculo na mucosa gástrica (i.g). Apesar da i.g apresentar maiores áreas de infiltrado inflamatório nos tecidos cardíacos de camundongos infectados, o modelo i.o expressa valores

muito maiores de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e INF- γ) nesse tecido, e sistemicamente na corrente sanguínea dos camundongos infectados. De forma interessante, foi notado que os altos níveis de TNF estavam associados à mortalidade dos camundongos infectados por via oral, e que bloqueando o excesso dessa citocina aumentava-se a sobrevivência dos camundongos durante a fase aguda da infecção (28).

Estima-se que o período de incubação do parasita nessa via de infecção dure aproximadamente 22 dias (via vetorial 4 a 15 dias, transfusão sanguínea 30-40 dias) (20). Tal forma de transmissão tem sido descrita por apresentar uma gravidade sintomatológica muito acentuada na fase aguda da doença, além de índices de mortalidade elevados quando comparados a outras vias de transmissão(24).

1.1.3. Manifestações clínicas

A doença de Chagas apresenta duas formas clínicas durante seu curso de infecção: a aguda e a crônica. Essas fases envolvem o número de parasitas circulantes e a cronologia da doença. Ambas podem se apresentar sintomáticas ou assintomáticas (14).

A fase aguda é caracterizada por uma maior quantidade de parasitas circulantes na corrente sanguínea e representa o primeiro contato do parasita com o hospedeiro, no qual este vai interagir com as células e se multiplicar. Esse é também o momento em que a resposta imunológica do hospedeiro é estimulada, devido à presença do parasita.

Após o controle da parasitemia aguda, o hospedeiro inicia a fase crônica da doença. Essa fase é caracterizada por uma quantidade muito baixa de parasitas circulantes, sendo muito rara a sua detecção em exames diretos. Ela pode durar a vida inteira do paciente e é inicialmente assintomática. Nessa fase, ao realizar diferentes testes sorológicos, é possível detectar anticorpos IgG contra *T. cruzi*, e em muitos pacientes, os parasitas podem ser isolados em cultura sanguínea ou por xenodiagnóstico (8,29).

Estima-se que cerca de 20 a 30% dos indivíduos infectados desenvolvem complicações na fase crônica da Doença de Chagas. Manifestações típicas dessa fase são miocardite crônica (causando insuficiência cardíaca), síndromes mega colon e mega esôfago, ou uma combinação destes, e são agrupados em três formas: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (14,30,31).

1.1.4. Fase Aguda

Após o primeiro contato com o parasita, o hospedeiro inicia a fase aguda da doença. Na transmissão vetorial clássica, o ponto de entrada do parasita pode ser marcado por inflamação local (chagoma de inoculação), e quando ocorre na mucosa ocular pode ocasionar conjuntivite, edema palpebral unilateral e adenopatia satélite pré-auricular (sinal de Romana). Na transmissão por via oral o sinal mais frequentemente notado é a presença de edemas na face e nos membros inferiores dos pacientes (12,32).

Geralmente, os sinais e sintomas observados na fase aguda em pacientes infectados não são específicos, o que conseqüentemente dificulta o diagnóstico da infecção nos estágios iniciais e limita a disponibilidade de estudos descrevendo as condições imunológicas de indivíduos infectados nesse estágio de infecção (ver quadro 1)(8). Em aproximadamente 90% dos casos de doença de Chagas agudos que apresentam sintomatologia evidente os indivíduos não tratados com manifestações clínicas recuperam-se espontaneamente, dentro de aproximadamente 3 meses. Os sintomas que podem ser apresentados nessa fase são em geral: febre, mal estar, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, edema subcutâneo de membros inferiores e de face, miocardite, meningoencefalite, cefaleia, mialgia, vômito, dor abdominal, icterícia, diarreia e hemorragia digestiva (12,30).

FASE AGUDA			
<i>Via de transmissão</i>	<i>Incubação</i>	<i>Sintomas</i>	<i>Mortalidade</i>
Vetorial Clássica	1 – 2 semanas	Normalmente assintomática, podendo apresentar febre, mal estar, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, edema subcutâneo, sinais de porta de entrada (sinal de Romana, Chagoma), miocardite, meningoencefalite	<5 – 10%
Oral	3 – 22 dias	febre, mal estar, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, edema subcutâneo de face e membros inferiores, miocardite, meningoencefalite, dor de cabeça, mialgia, vômito, dor abdominal, icterícia, diarreia, e hemorragia digestiva	8 – 35%

Quadro 1.2: Quadro representativo dos sintomas característicos nas fases agudas de duas vias de transmissão vetorial: clássica e oral [Fonte: (12)].

1.2. Sistema Imune na Doença de Chagas

Após a invasão, o parasita se multiplica sob forma amastigota no citoplasma de diferentes tipos celulares do hospedeiro como macrófagos, fibroblastos, músculo esquelético e cardíaco, tecido nervoso e linfóide, células epiteliais e da mucosa (17).

Estudos em modelos murinos demonstram que no início da infecção aguda, padrões moleculares associados a patógeno (PAMP's) derivados do *T. cruzi* (como glicoproteínas de membrana, mucinas relacionadas a proteínas de superfície, DNA) estimulam a resposta imunológica via receptores "Toll-like" (TLR) 2, 4 e 9. Algumas dessas proteínas de superfície são associadas à evasão da resposta imune do hospedeiro (33,34).

Tem sido descrito que a proteína de superfície (cruzipaina) está relacionada à infectividade, evasão da resposta imune do hospedeiro, e replicação intracelular. Macrófagos de camundongos infectados, estimulados com cruzipaina aumentam a atividade de arginase e a produção de IL-10 e TGF- β , sendo esta última capaz de suprimir algumas funções microbicidas de macrófagos, criando um microambiente celular favorável e, dessa forma, aumentando vantagens de sobrevivência do parasito (35,36). Também foi demonstrado que a fosfolipase A1 de *T. cruzi* (Tc-PLA1) está envolvida na modificação de lipídios na célula do hospedeiro levando a geração de lipídios mensageiros secundários como lisofosfatidilcolina (LPC) e à ativação de PKC (proteína cinase C), que pode modular os níveis de Ca^{2+} intracelular, contribuindo para a invasão do parasita. Além disso, LPC tem sido descrito por inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados pelo *T. cruzi*, e a expressão de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), assim interferindo nesses mecanismos da resposta imune do hospedeiro contra o parasita (34,37).

Algumas proteínas de superfície do parasita estão associadas com a membrana plasmática através da ancora glicosilfosfatidilinositol (GPI), que além de estar presente em grandes quantidades na superfície do *T. cruzi*, têm sido demonstradas por apresentar propriedades imunoregulatórias. As GPI são reconhecidas pelo receptor transmembranar TLR2, e estudos *in vivo* têm demonstrado que esse receptor induz predominantemente a uma resposta imunológica de perfil regulatório, ao invés de pró-inflamatório. Em contrapartida, o DNA do *T. cruzi* foi relatado por se ligar ao receptor TLR-9, e estimular a ativação de macrófagos e células dendríticas. Alguns trabalhos sugerem que TLR-2 e TLR-9 cooperam no controle parasitário durante a fase aguda da infecção (34,38,39).

Após a ativação de macrófagos e células dendríticas por TLR 2, 4 e 9 ocorre a indução da expressão de receptores co-estimulatórios, e aumento da endocitose e morte intracelular de parasitas através da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por essas células. Além disso, macrófagos também secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27 e TNF- α promovendo a ativação de outras células do sistema imune de perfil inflamatório. Em seguida, macrófagos e células dendríticas que endocitaram parasitas estimulam a produção de anticorpos contra o *T. cruzi*, além de da ativação de linfócitos T, induzidos por IFN- γ específicos contra o parasita, que migram juntamente a outros leucócitos para sítios de inflamação induzida pela presença de quimiocinas (como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10). Inicialmente, essa resposta leva a um efeito protetor, gerando controle do parasitismo e parasitemia, porém não induz a completa eliminação do parasita (33,39).

Há uma teoria amplamente discutida, de que a doença de Chagas tem uma etiologia autoimune. O principal suporte para isso é a conclusão de que sinais da doença são evidentes em tecidos onde não há a presença de parasitas, como observado na fase crônica. Assim, foi levantada uma hipótese de que as alterações observadas em órgãos alvo pode ser o resultado de uma reação autoimune causada por autoanticorpos e células T autoreativas. Fatores que podem contribuir para essa resposta contra células próprias do organismo do hospedeiro seriam o mimetismo molecular entre antígenos do parasita e antígenos do hospedeiro e a liberação de auto antígenos devido ao dano tecidual aos quais a resposta imune é direta(40,41). Na infecção pelo *T. cruzi* já foram descritos anticorpos que fazem reação cruzada entre proteínas ribossomais do parasita, e receptores beta-adrenérgicos e muscarínicos, que podem levar a alterações eletrocardiográficas em corações não infectados, sugerindo um possível envolvimento da reação cruzada de anticorpos na patologia cardíaca do hospedeiro (37,42).

Apesar de não totalmente suportada, a teoria da autoimunidade ainda não foi completamente descartada, tendo em vista que em tecidos de hospedeiros crônicos nem sempre são encontrados ninhos de parasitas, particularmente em locais de inflamação intensa, além da existência de reação cruzada humoral em células cardíacas devido ao mimetismo molecular. Porém a partir do surgimento de técnicas mais sensíveis para a detecção do parasito, como a PCR de tecidos de animais infectados para a investigação do DNA de *T. cruzi*, já pôde-se comprovar a presença do material genético do parasita em tecidos de pacientes crônicos antes considerados sem parasitas (43,44).

Nos momentos iniciais da infecção, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ apresentam um efeito protetor na resposta imunológica contra o *T. cruzi*, mas quando produzidas em excesso podem acarretar em danos teciduais e desarranjos metabólicos (17,45,46). Estudos recentes apontam que altos níveis de TNF- α podem estar relacionados à mortalidade de camundongos infectados com *T. cruzi* (28,47). Por outro lado, sabe-se que citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, por exemplo, também estão envolvidas na ativação de respostas neuroendócrinas, e que estas podem influenciar no curso da resposta inflamatória (45,47).

Também tem sido demonstrado em modelos experimentais com diferentes vias de infecção que, a rota pela qual o parasita tem a entrada no hospedeiro pode influenciar diretamente os primeiros tecidos alvos da infecção, além da resposta imune e resistência do organismo, podendo assim ser considerada um fator chave na patogênese da doença de Chagas (17,48).

1.3. Eixo HPA

Todo distúrbio corporal evoca uma resposta ao estresse, que serve para restaurar a homeostase e facilitar a adaptação(49). Os principais agentes na resposta contra o estresse estão localizados no núcleo paraventricular (PVN) do Hipotálamo, no lobo anterior da glândula Pituitária, e na glândula Adrenal. Esse conjunto de órgãos é comumente referido como o Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (50). O eixo HPA é ativado em resposta a uma ampla variedade de estressores, o que resulta em um rápido aumento nos níveis plasmáticos de ACTH da pituitária anterior e de glicocorticóides (corticosterona em roedores e cortisol em humanos) do córtex da adrenal (51).

Neurônios produtores de fator liberador de corticotrofina são localizados na subdivisão medial parvocelular do PVN no hipotálamo e são concentrados mais lateralmente. Seus axônios terminam na zona externa de um sistema porta venoso na eminência mediana e pedúnculo hipofisário (conexão entre o hipotálamo e a hipófise posterior). Veias porta longas e pequenas transportam hormônios hipotalâmicos (peptídeos e dopamina) para a pituitária anterior (adenohipofise) onde se ligam a cinco tipos de células endócrinas clássicas e influenciam a liberação de seus hormônios (50,52). O pool de neurônios produtores de CRH no PVN libera esse hormônio nas veias porta hipofisárias que acessam a glândula hipófise. O CRH é o principal regulador do eixo HPA, e controla a secreção de hormônios da pituitária anterior. A ligação de CRH com seu receptor nos corticotrópicos induz a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sistêmica. O principal alvo para o

ACTH circulante é o córtex da glândula adrenal onde, ao se ligar com seus receptores, estimula a síntese e secreção de glicocorticoides pela zona fasciculata. Glicocorticoides são efetores “downstream” do eixo HPA e regulam mudanças fisiológicas distribuídas através de receptores intracelulares distribuídos ubiquamente (50,52).

Os GC medeiam uma variedade de efeitos nas células e no organismo como um todo, incluindo alterações metabólicas que primariamente levam ao catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Esses hormônios aumentam os níveis glicêmicos, dependendo das circunstâncias, e, podem tanto influenciar na sobrevivência de algumas células quanto induzir morte celular. Em altos níveis durante um longo período de tempo causam osteoporose. Além disso, os GC podem promover supressão da produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, sendo considerado como um potente componente endócrino com função imunoreguladora (47,53).

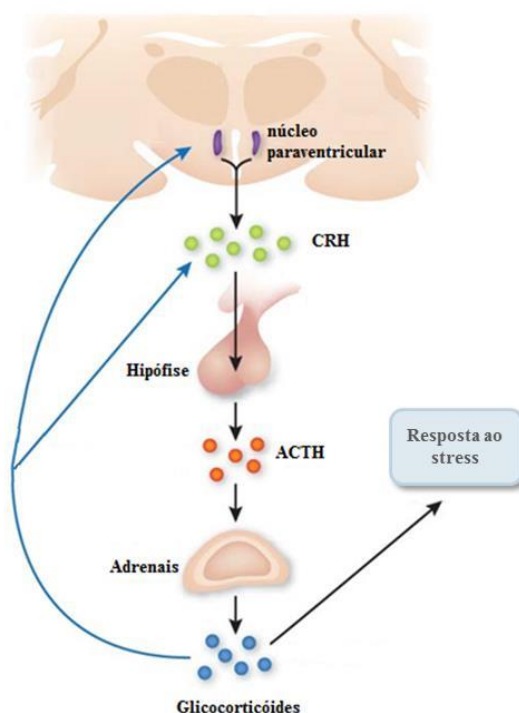


Figura 2: O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal: Figura representativa das glândulas que compõem o eixo HPA e células produtoras de hormônios específicos à regulação do eixo. Hipotálamo produtor do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), que atua na Adeno hipófise, induzindo a produção do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), esse último atinge a circulação e atua nas glândulas adrenais induzindo a produção de Corticosteróides (CORT) como a corticosterona (modificado de Steven E Hyman *et al.* 2009).

Corticosteroides atingem todos os órgãos através da circulação sanguínea, que permite a coordenação das funções do cérebro e corpo que se destinam a lidar com estresse, recuperação e adaptação (54). As ações imunossupressoras e anti-inflamatórias dos GC são bem reconhecidas: eles suprimem a produção de citocinas e mediadores pró inflamatórios, o tráfico de células periféricas, e a quimiotaxia de linfócitos, neutrófilos e granulócitos, com redução do acúmulo de células fagocíticas nos sítios inflamatórios (55,56). GCs também promovem atrofia da glândula tímica e, em menor grau, outros tecidos linfoides, induzindo sinais apoptóticos em precursores de células B e T assim como em células T maduras. Além disso, eles promovem mudança da resposta de perfil Th1/Th2, influenciando no diferenciação para uma resposta humoral (57,58).

1.3.1. Eixo HPA e sistema imune

A comunicação entre o sistema imune e o sistema neuroendócrino é crítica para a defesa do hospedeiro, porque ela fornece um meio por onde o Sistema Nervoso Central (SNC) pode detectar alterações no status imunológico e iniciar uma série de respostas coordenadas (comportamental, psicológica e imunoregulatória) designadas à proteção do hospedeiro e, assim, restaurar a homeostase. Nesse quesito, a ativação do eixo HPA representa uma resposta hormonal primária ao desafio homeostático, e possibilita a adaptação do organismo a diversos estímulos nocivos. Em geral, uma ativação do eixo HPA pode ser induzida por uma grande variedade de estressores, sejam psicológicos (entrevistas, exames, falar em público), físicos (fraturas, ou algum outro estímulo de dor) ou imunológicos (após infecções). Através da liberação de GC, o eixo HPA mobiliza energia de reserva para assegurar que o organismo tenha as fontes necessárias para enfrentar uma situação de estresse (59–61).

O eixo HPA interage fisiologicamente com o sistema imune, e isso é refletido pelo aumento de glicocorticoides circulantes, juntamente à ativação da resposta imunológica contra antígenos diversos. Besedovsky e colaboradores demonstraram, em 1986, que tanto camundongos infectados com “Newcastle disease vírus” (NDV) quanto camundongos injetados com o sobrenadante de cultura de leucócitos humanos ou esplenócitos murinos infectados com NDV, apresentaram níveis circulantes de corticosterona elevados. Além disso, mostraram que com o bloqueio de IL-1 não aconteciam os mesmos efeitos estimuladores da produção de corticosterona, evidenciando assim, que a citocina IL-1 estimula a produção de corticosterona (62). Outras citocinas, como TNF- α e IL-6, também foram relatadas por possuírem o potencial de estimular a ativação do eixo HPA. Em um estudo avaliando os níveis hormonais após a aplicação intravenosa dessas citocinas, em camundongos, foi visto

que passada uma hora de tratamento altos níveis de ACTH e Corticosterona eram detectados, em relação aos seus controles (63).

Tendo em vista que durante processos infecciosos, o sistema imune desenvolve uma resposta inflamatória acentuada com alta produção de algumas citocinas Th1, muitos estudos têm demonstrado que esse aumento nos níveis de citocinas ocasionado pela resposta imune contra a infecção é paralelo à alterações significativas na resposta hormonal, como a intensa produção de glicocorticoides (64). Em trabalhos avaliando alterações imunoendócrinas em pacientes portadores de doenças infecciosas, foi demonstrado que indivíduos infectados pelo *Plasmodium falciparum* apresentam níveis circulantes elevados das citocinas TNF- α e IL-6, concomitantemente com níveis elevados de cortisol (65). Já pacientes portadores de tuberculose pulmonar, apresentam elevados níveis de IL-6 e IFN- γ juntamente a níveis elevados de cortisol em comparação com indivíduos não infectados (66).

Portanto, tem sido demonstrado que durante o curso de processos inflamatórios, como por exemplo acontece após o contato com agente infeccioso, ocorre a ativação do sistema imune, que leva a produção de citocinas, dentre elas IL-1, TNF e IL-6, descritas por possuírem a capacidade de induzir a liberação de ACTH e corticosterona (63,67).

A ativação do eixo HPA e o hipercorticoidismo resultante frequentemente agem como um mecanismo de *feedback* negativo de forma a suprimir uma resposta imune/inflamatória exagerada, iniciada pela cadeia de citocinas. Esse equilíbrio delicado parece ser parte de um mecanismo homeostático, cuja falência pode resultar em sérias desordens como infecção, câncer, ou doenças autoimunes (53).

1.3.2. O eixo HPA na Doença de Chagas

Dentre as citocinas produzidas durante a infecção pelo *T. cruzi*, sabe-se que TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IFN- γ podem estimular a ativação do eixo HPA, que culmina em um aumento dos níveis de glicocorticoides. Glicocorticóides também são bem descritos por serem necessários para a proteção do indivíduo de consequências letais a uma resposta pro-inflamatória exacerbada. Adicionalmente, esses hormônios tem um papel no controle da autoimunidade na doença de Chagas pela inibição da síntese de anticorpos parasita-específicos que também são capazes de reagir cruzadamente com antígenos do hospedeiro (47,68).

Porém, apesar do efeito imunoregulatório importante desses hormônios, SANTOS 2005 demonstrou que quando camundongos infectados são submetidos à um estresse contínuo, o que acarreta em níveis de glicocorticoides constantemente elevados, há um

importante aumento na parasitemia durante a fase aguda da infecção, sugerindo que o estresse majora a patogênese da doença pela supressão da resposta imunológica.

Durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* foram descritos algumas alterações no eixo HPA, tanto morfológica quanto fisiologicamente. Em 2013, Villar e colaboradores relataram alterações nas glândulas adrenais de camundongos normais e geneticamente deficientes para receptor TNFR1, infectados pelo *T. cruzi* por via subcutânea. Em ambas as cepas de camundongos foram notadas hipertrofia da zona fasciculata (formada pelas células responsáveis pela produção de glicocorticóides) do córtex das adrenais. Além disso, também já foi descrito que camundongos duplo nocautes tanto para o receptor TNFR1 quanto TNFR2, apresentam altos níveis circulantes das citocinas TNF, IL-1 β e IL-6, assim como de corticosterona em relação a camundongos que expressam ambos os receptores (69).

Em experimentos com camundongos infectados e adrenalectomizados, foi notado que os níveis das citocinas TNF, IL-1 β e IL-6 eram muito mais altos nos camundongos que tiveram suas adrenais removidas em relação aos camundongos não operados. Em contrapartida, camundongos não operados apresentavam uma sobrevida maior frente à infecção pelo *T. cruzi* quando comparados aos camundongos operados (69,70).

Em um trabalho analisando os tecidos nervoso e neuroendócrino de camundongos infectados pelo *T. cruzi* por infecção via intravenosa, foi relatada a presença de infiltrado inflamatório em áreas do cérebro, sendo essas particularmente ricas em células TCD8 positivas. Já nas glândulas pituitária e adrenal do eixo HPA de animais infectados, foi descrita a presença de células TCD8 positivas, e numa menor quantidade, a presença de células TCD4 positivas assim como de macrófagos. Em análises histológicas foram observadas alterações morfológicas tanto nas adrenais quanto na hipófise de camundongos infectado, e a presença de ninho de amastigotas no córtex das adrenais. Além disso, por análises moleculares foi observada a presença de DNA do parasita na hipófise de camundongos infectados. Quanto à funcionalidade do eixo HPA durante a infecção pelo *T. cruzi*, foi visto que acontece um desequilíbrio na produção de hormônios reguladores do eixo, com uma diminuição na produção de CRH, concomitante a um aumento dos níveis de corticosterona, enquanto os níveis de ACTH se mantinham sem alterações (71).

Silva-dos-Santos e colaboradores descreveram recentemente que nos momentos iniciais após a inoculação de *T. cruzi* na cavidade oral de camundongos BALB/c, existe um tropismo do parasita para tecidos do palato e da fossa nasal. De acordo com a progressão da infecção e diante da multiplicação do *T. cruzi* nesses tecidos, o parasita se espalha para outras regiões da cabeça, atingindo o bulbo olfatório e a hipófise desses animais após 7 dias de infecção.

Também demonstrada a presença de DNA do parasita em outras regiões do cérebro após 21 dias de infecção (27).

Portanto, tendo em vista a já relatada gravidade da infecção por via oral, e o tropismo parasitário nessa via de infecção para regiões do cérebro que correspondem ao eixo HPA (fig 2), se faz importante o estudo de alterações imunoendócrinas nessa via de infecção, devido ao potencial desse parasitismo afetar a resposta inflamatória e neuroendócrina de camundongos infectados, que por sua vez pode estar relacionado à gravidade dessa via de infecção.

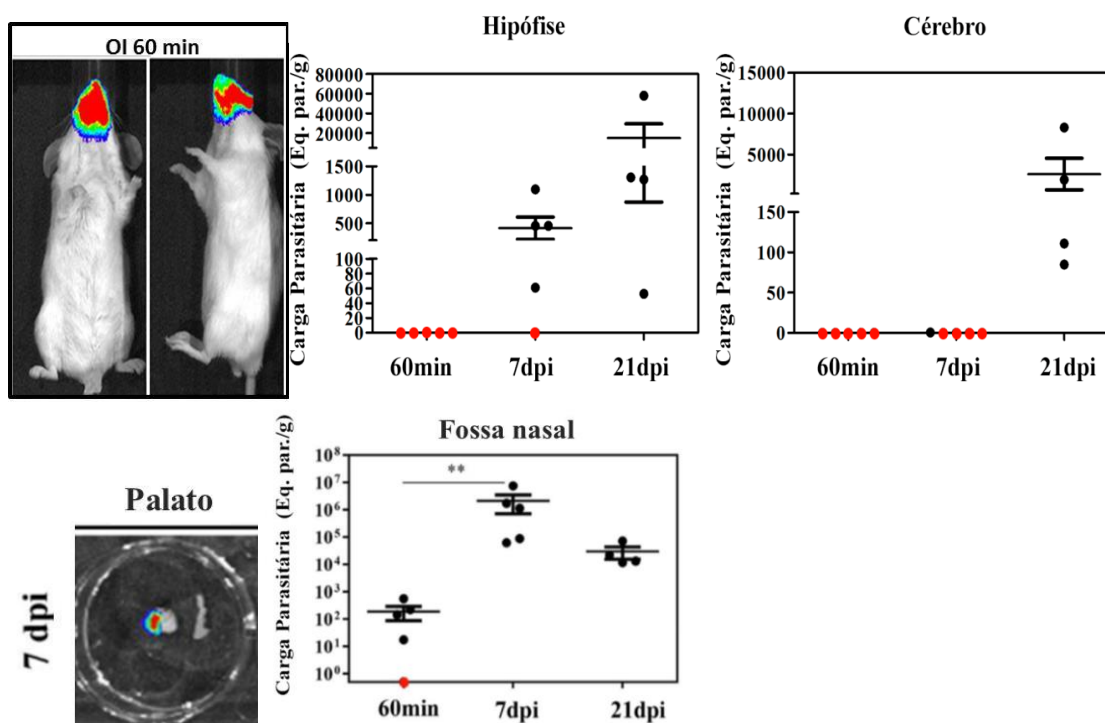


Figura 3 Análise do parasitismo em regiões da cabeça de camundongos infectados pelo *T. cruzi* por via oral. Imagem por bioluminescência demonstrando o parasitismo da região do focinho/fossa nasal após 60 min de infecção e palato após 7 dias de infecção. Gráficos de carga parasitária nos tecidos da hipófise, cérebro e fossa nasal de camundongos infectados, em momentos iniciais e mais tardios da fase aguda da infecção (Adaptado de Silva-dos-Santos, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influencia da infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* por via oral na ativação do eixo HPA e analisar a atividade e os mecanismos moleculares de ativação do eixo HPA durante a fase aguda da infecção.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Quantificar a presença de tripomastigotas no sangue e amastigotas nos tecidos do hipotálamo, hipófise e glândula adrenal.
- II. Estudar os mecanismos moleculares associados com a hiperatividade do eixo HPA em animais infectados pelo *T. cruzi*, por via oral
- III. Fazer uma associação entre a atividade do eixo HPA e a produção de citocinas pró-inflamatórias em animais infectados pelo *T. cruzi*
- IV. Avaliar o impacto do glicocorticóides e/ou da citocina TNF- α sobre a parasitemia de animais infectados pelo *T. cruzi*.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Neste estudo, foram utilizados camundongos da cepa BALB/c machos com idade de 6 a 8 semanas. Estes foram obtidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) e mantidos no biotério do Pavilhão Leonidas Deane, em ciclos de claro e escuro a cada 12 horas, com temperatura controlada e acesso livre à água e ração durante a infecção até o momento da eutanásia. Os procedimentos realizados com os animais possuem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (L-028/2016).

3.2. Parasitas e infecção

Em todos os protocolos experimentais, foi utilizada a cepa Tulahuén do protozoário *Trypanosoma cruzi* obtida de cultura primária de macrófagos, mantida em RPMI + 10% de SBF ou derivada de fezes de barbeiro. As formas tripomastigotas de cultura ou tripomastigotas metacíclicas das fezes foram utilizadas para infecção dos animais, que foram mantidos sem água e ração por 3-4 horas antes e pelo menos 15 minutos depois da infecção. A inoculação foi realizada através do modelo de infecção oral (OI) com inóculo na cavidade oral dos camundongos, conforme estes ingeriam o volume pipetado de 50µL de meio ou fezes contendo 5×10^4 formas infectantes do parasita.

A parasitemia foi monitorada ao longo da infecção, de modo a estabelecer a fase aguda da doença. Utilizando um volume de 5 µL de sangue, obtidos da extremidade da cauda dos animais infectados, foi realizada a contagem de formas tripomastigotas de *T. cruzi* circulantes dentro de 50 diferentes campos em lamínula (18x18 mm) por microscopia óptica convencional, utilizando aumento de 400x. A análise da parasitemia foi realizada calculando o número de parasitas presentes em 1 mL de sangue através do método de Pizzi-Brener, e o logaritmo natural desse valor foi utilizado na formação do gráfico (modelo Ln/mL).

3.3. Tratamentos

Com o objetivo de avaliar a influencia da ação do TNF- α na ativação do eixo HPA dos camundongos infectados, foi realizado o bloqueio desta citocina através da administração de uma proteína quimérica cuja função é inibir a ação do TNF- α circulante. O tratamento teve início após o 18º dia de infecção, utilizando o fármaco Enbrel[®] (Etanercept Enbrel, Wyeth Pharmaceuticals) em uma dosagem de 0.83 mg/Kg diluídos em 50µL de solução aquosa, com aplicações semanais por via intraperitoneal.

Com o objetivo de avaliar a influência da ação dos glicocorticóides na resposta imunológica dos camundongos infectados, foi realizado o bloqueio da ação desses hormônios utilizando-se de um fármaco antagonista do seu receptor. O tratamento utilizado para o protocolo de bloqueio da ação de glicocorticóides teve início no 14º dia pós-infecção e foi realizado através da administração do RU486 (Mifepristone, Sigma-Aldrich, USA) em uma dosagem de 20 mg/kg diluídos em óleo de metilcelulose 0,5% (Methyl cellulose, Sigma-Aldrich, USA) com aplicações diárias por gavagem.

Os camundongos tratados com o fármaco Enbrel[®] foram eutanasiados após 28 dpi, e os camundongos tratados com RU486 aos 21 dias após infecção. Após a eutanásia os camundongos tiveram seu sangue coletado para obtenção de plasma e quantificação de citocinas e hormônios circulantes.

3.4. Análise histológica do eixo HPA

Com o objetivo de avaliar a presença de infiltrado inflamatório e ninhos de amastigotas, o hipotálamo, a hipófise e as glândulas adrenais de camundongos infectados por via oral foram extraídos após 4, 14 e 21 dias de infecção. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina, cortados com 5 µm, de forma seriada com espaçamento de 5 a 8 cortes de modo a analisar toda a extensão do órgão, e corados utilizando a técnica de Hematoxilina e Eosina.

As lâminas foram scaneadas utilizando o Scanner Panoramic Midi 1.16RTM (3DHitech – “Three-dimensional Histological Technologies”, EUR), e as imagens dos cortes foram analisadas através do Software Panoramic Viewer. As fotos foram obtidas utilizando o mesmo software, em aumento de 400x.

A fim de avaliar o aumento do volume das células da zona fasciculada da glândula adrenal, responsáveis pela produção de glicocorticoides, foi realizada análise da hipertrofia dessas células, em cortes histológicos realizados como descrito acima. Foram analisadas 10 fotos da zona fasciculada de cada corte.

As fotos foram analisadas utilizando o programa ImageJ de análises de imagens. A área das células foi mensurada selecionando-se o contorno de uma célula bem definida em cada foto. As fotos foram obtidas através do Software Panoramic Viewer, em aumento de 1000x.

3.5. Avaliação do peso das glândulas adrenais

Com o objetivo de analisar se haveria alguma alteração no peso das glândulas adrenais ao longo da fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi*, camundongos infectados foram eutanasiados como descrito anteriormente, após 7, 14 e 21 dias de infecção e suas adrenais foram extraídas e pesadas imediatamente em balança de precisão.

3.6. Avaliação da carga parasitária no eixo HPA

Para a investigação da carga parasitária no tecido do eixo foi feita a análise da presença de material genético do parasita no hipotálamos, na hipófise e glândulas adrenais de camundongos infectados por via oral coletados nos dias 7, 14 e 21 pós-infecção, utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Após a eutanásia, os animais foram perfundidos com PBS 1x, com o intuito de retirar ao máximo o sangue contido nos órgãos analisados.

O DNA obtido desses tecidos foi extraído empregando o reagente TRIzol (Ambion, Life Technologies), na fase orgânica após a adição de clorofórmio. As reações de amplificação foram realizadas no aparelho Vii7 da plataforma de qPCR da FIOCRUZ, utilizando TaqMan Master Mix (Roche) e primers para pesquisa de DNA do parasita adquiridos da Life Technologies.

Foi utilizado GAPDH (ver quadro 2) como gene constitutivo endógeno. As reações foram realizadas em duplicata utilizando 5µL de DNA amostral por reação, em um volume total de 20µL. Os resultados obtidos por qPCR foram normalizados através do gene constitutivo e analisados pelo Software QuantStudio™ Real-Time PCR Software.

3.7. Análise do perfil de citocinas plasmáticas

A fim de avaliarmos o perfil de citocinas produzidas durante a infecção pelo *T. cruzi* por via oral, os camundongos infectados como descrito acima foram submetidos à eutanásia nos dias 3, 7, 14, 18, 21 e 28 pós-infecção e, após punção cardíaca, seu plasma foi coletado e devidamente armazenado à -80°C para análises posteriores.

A avaliação do perfil de citocinas plasmáticas foi realizada utilizando-se o kit comercial CytometricBead Array® Th1, Th2, Th17 (BD, USA), que analisa os níveis das citocinas TNF, IFN, IL-6, IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17 com análises no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, USA)

3.8. Quantificação de corticosterona

Com o objetivo de avaliarmos a funcionalidade do eixo HPA durante a infecção aguda de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, o plasma de animais oralmente infectados foi coletado, pela manhã (8:00h) em 7, 14 e 21 dias após infecção para análise dos níveis do glicocorticoide corticosterona, produzidos durante a fase aguda da infecção através da técnica de Radioimunoensaio (RIA, Radio Imune Assay).

A quantificação de Corticosterona foi realizada utilizando-se kits da MP Biomedicals. Os protocolos foram realizados segundo as instruções do fabricante, e a leitura dos resultados foi feita no aparelho contador de partículas gama WIZARD[®] Automatic Gamma Counter (PerkinElmer, USA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.9. Expressão gênica dos mecanismos de regulação molecular do eixo HPA

Para avaliarmos a expressão de receptores de citocinas e de hormônios importantes para a funcionalidade do eixo HPA, foi realizada a técnica de RT-qPCR para análise da expressão gênica. Os tecidos do eixo HPA foram coletados e congelados em -80°C. Para a avaliação da expressão dos receptores envolvidos na regulação do eixo HPA foi realizada a investigação da expressão gênica dos receptores de ACTH (MC2-R) nas glândulas adrenais, de glicocorticoide (GR) no hipotálamo e hipófise, e de TNF (TNFR) em todas as glândulas do eixo. Os tecidos dos camundongos infectados por via oral foram coletados nos dias 7, 14 e 21 pós-infecção.

O RNA obtido desses tecidos foi extraído empregando o reagente TRIzol (Ambion, Life Technologies) e o kit de extração de RNA (RNeasy Mini, Quiamp) na fase aquosa após a adição de clorofórmio. A síntese de cDNA foi realizada por RT-PCR com SuperScrip[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). As reações de amplificação foram realizadas no aparelho Vii7 da plataforma de qPCR da FIOCRUZ, utilizando TaqMan Master Mix (Roche) e primers para os receptores de citocinas e hormônios pesquisados adquiridos da Life Technologies. Foram utilizados Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) e GAPDH (ver tabela 3) como genes constitutivos endógenos.

Alvo DNA	Fabricante (Número Ref)	Fases de pausas e ciclos (40x)	Concentração do primer
<i>T. cruzi</i>	4304971	50°C-5min / 95°C-10min / 95°-15sec / 58°C-1min	750nM
Alvo mRNA			
TNFR	Mm00441883_g1	50°C-5min / 95°C-10min / 95°-15sec / 58°C-1min	330nM
MC2R	Mm00434865_s1	50°C-5min / 95°C-10min / 95°-15sec / 58°C-1min	330nM
GR	Mm00433832_m1	50°C-5min / 95°C-10min / 95°-15sec / 58°C-1min	330nM
HPRT	Mm00446968_m1	50°C-5min / 95°C-10min / 95°-15sec / 58°C-1min	330nM
GAPDH	Mm99999915_g1	50°C-5min / 95°C-10min / 95°-15sec / 58°C-1min	330nM

Quadro 3: Relação de primers dos receptores de hormônios e citocinas, do DNA de *T. cruzi*, e dos genes constitutivos utilizados para reações de amplificação, e seus respectivos dados. *volume final da reação = 20µL (DNA), 20µL (RNA).

3.10. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através dos testes Kruskal-Wallis (com pós teste de Dun), One-Way ANOVA (com pós teste de Bonferroni) e Box-Cox de acordo com cada necessidade, utilizando-se o *software* R ou *GraphPad Prism 5*. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1. Parasitemia de camundongos infectados por via oral com *T. cruzi*

Com o objetivo de avaliar o estabelecimento da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* por via oral, foram realizadas análises dos níveis de formas tripomastigotas circulantes em camundongos infectados em uma cinética de 4 semanas.

A análise da parasitemia foi realizada como descrito anteriormente até o 28º dia pós infecção (dpi). Ao avaliarmos a cinética da parasitemia observamos um aumento no número de parasitas circulantes a partir de 10 dpi, e um pico de parasitemia atingido em 21 dpi. Esse número grande de parasitas circulantes mantém-se até o ultimo dia avaliado (28 dpi) (Fig.4).

Apesar de notarmos altos níveis de parasitemia nos camundongos analisados e estabelecermos uma infecção ativa por via oral, não pudemos observar óbitos que fossem relacionados ao desenvolvimento da infecção até o ponto avaliado.

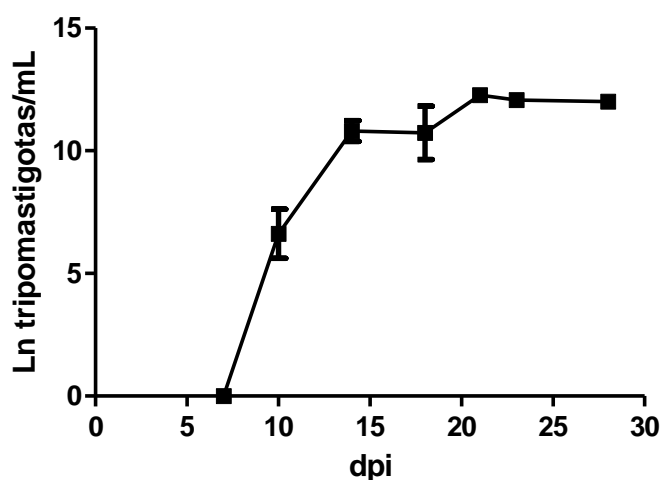


Figura 4: **Análise da parasitemia de camundongos infectados por via oral.** Cinética de parasitemia de camundongos infectados por via oral com 5×10^4 formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi*. Durante a fase aguda, 5 μ L de sangue periférico foram coletados dos camundongos infectados para a contagem de parasitas circulantes em 50 campos por microscopia óptica com aumento de 400x. N= 8 camundongos. Gráfico representativo de 4 experimentos. Cálculo da parasitemia foi feito pelo método Pizzi-Brenner. O número de tripomastigotas circulantes no sangue está representado em Ln tripomastigotas/mL. Ln= logaritmo natural.

4.2. Análise da presença do *T. cruzi* nas glândulas hipotálamo, hipófise e adrenal de camundongos infectados por via oral

Com o objetivo de avaliarmos a presença do *T. cruzi* no eixo HPA, os tecidos dos órgãos que o compõem foram extraídos e processados para a realização de cortes histológicos. Os cortes foram corados através da coloração de Hematoxilina e Eosina para visualização dos tecidos em momentos iniciais de infecção, e durante a infecção até o momento de maior índice de parasitas circulantes (4,14 e 21 dpi) (Fig. 5). Vale ressaltar que foi notado um aumento visual das células da zona fasciculada dos animais infectados em relação aos animais controle, além de um ninho de parasitas na região cortical da adrenal, em célula da zona fasciculada, de um camundongo com 21 dias de infecção (Fig.6)

Tendo em vista que a análise dos cortes não revelou a presença de ninhos de amastigotas no hipotálamo e na hipófise, e somente na adrenal de um animal infectado (Fig. 5 e 6), uma nova abordagem foi utilizada para investigar a possível presença dos parasitas. Através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), foi possível constatar e quantificar a presença do DNA de *T. cruzi* nos tecidos que compõem o eixo HPA, de camundongos na fase aguda da infecção .

As análises foram feitas em 7, 14 e 21 dpi, onde foi possível quantificar os níveis de DNA do parasita. Foi observado níveis de DNA de parasitas estatisticamente significativos nos três órgãos analisados 21 dias após infecção (Fig. 7), em comparação tanto com o grupo de animais não infectados quanto com 7 dias de infecção. Vale ressaltar, que na comparação entre órgãos, o hipotálamo foi o órgão que apresentou menor carga de DNA parasitário enquanto que a hipófise foi a glândula com maior quantidade de DNA do parasito.

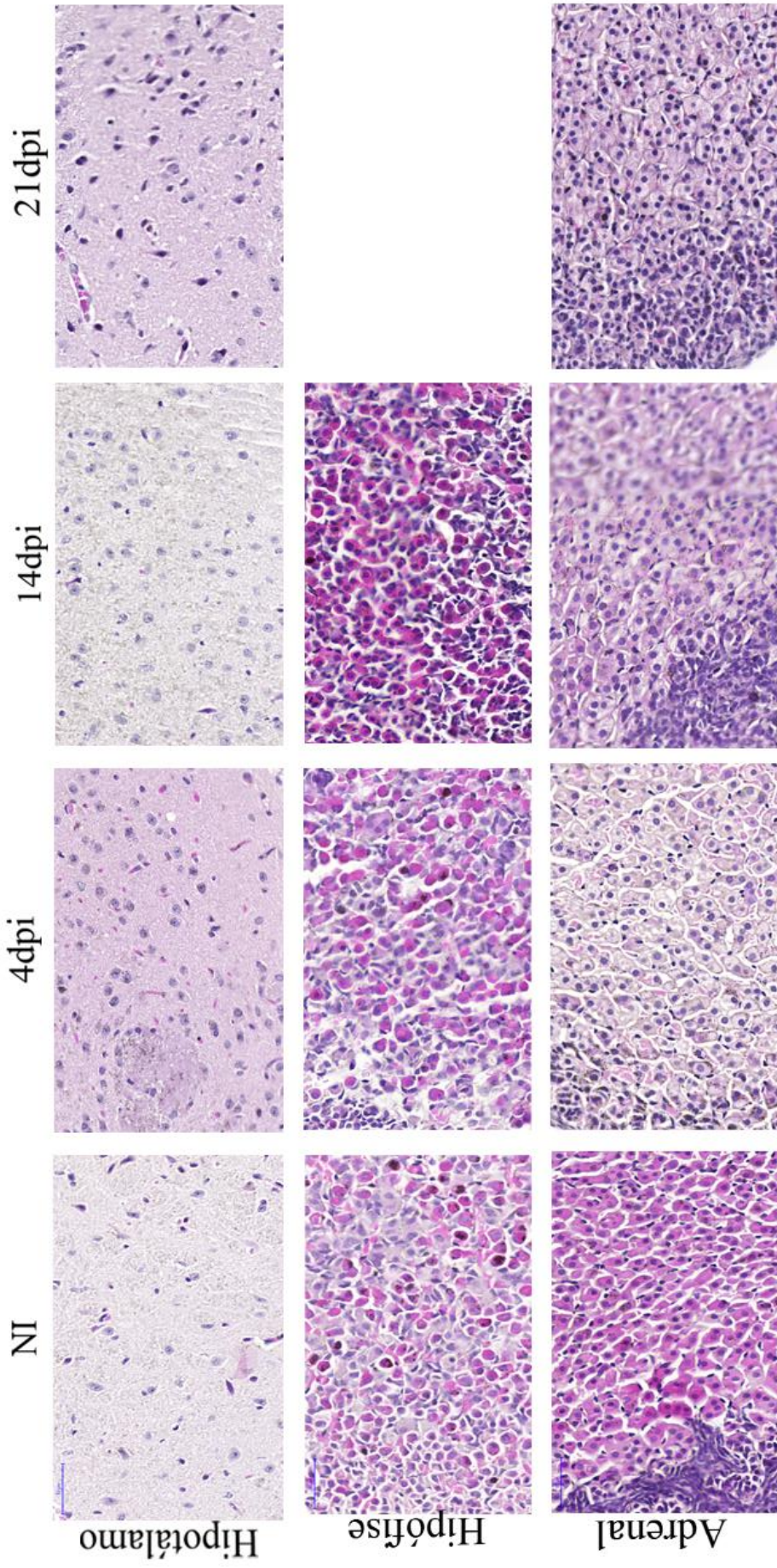


Figura 5: Avaliação histológica das glândulas que constituem o eixo HPA de camundongos infectados por via oral. Cortes histológicos de Hipotálamo, Hipófise e Adrenal de camundongos infectados com 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi* (*Tulahúén*) foram processados, incluídos em parafina e corados com Hematoxilina de Harris e Eosina Fluxina com 4, 14 e 21 dpi. N= 3 camundongos/grupo. Imagem em aumento de 400x.

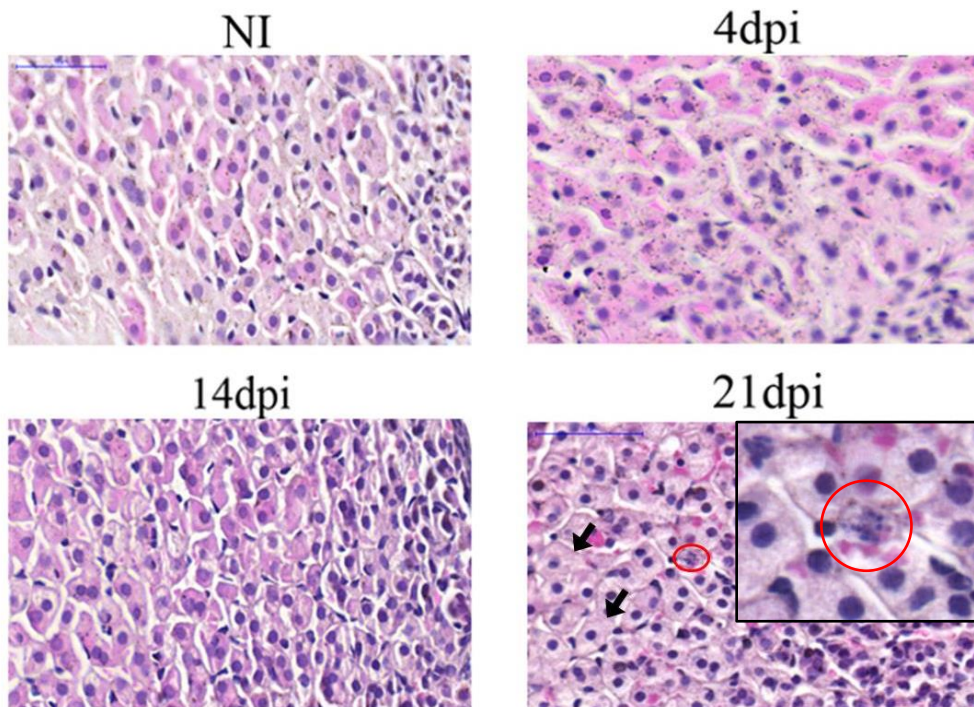


Figura 6: **Avaliação histológica da hipertrofia das células da zona fasciculada de camundongos infectados pelo *T. cruzi* por via oral.** Cortes histológicos das glândulas adrenais de camundongos infectados com 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi* (*Tulahué*n) foram processados, incluídos em parafina e corados com Hematoxilina de Harris e Eosina Fluxina após 21 dpi. Setas indicam células volumosas, e círculo indica ninho de amastigotas na zona fasciculada do córtex de adrenais. N= 3 camundongos/grupo. Imagem em aumento de 1000x.

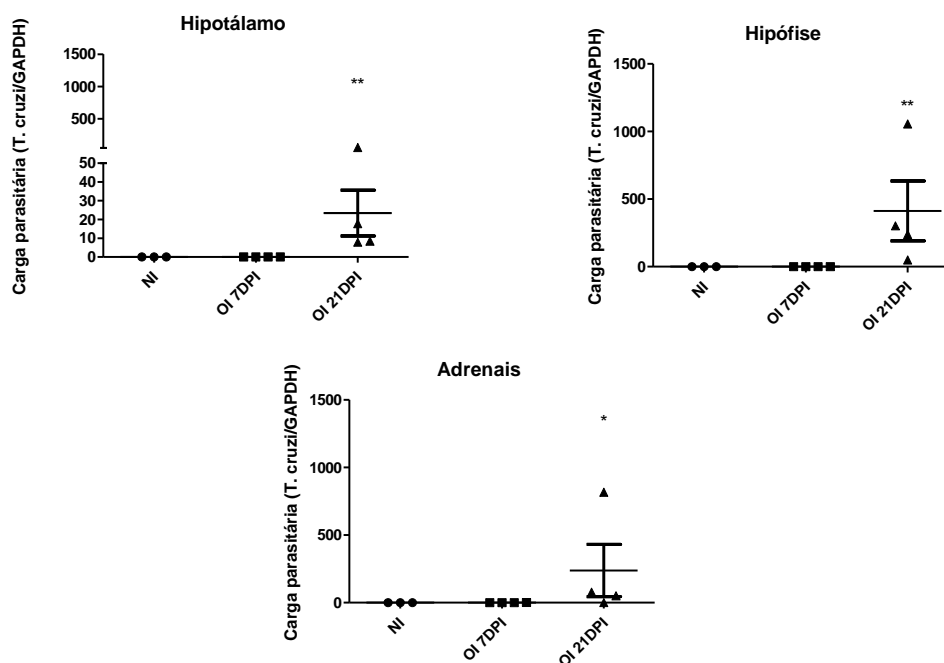


Figura 7: **Avaliação da presença de DNA de parasitas nos órgãos que constituem o eixo HPA de camundongos infectados por via oral.** DNA extraído de Hipotálamo, Hipófise e Adrenais de camundongos infectados com 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi* (*Tulahué*n) foram utilizados na pesquisa de DNA de parasitas, por qPCR utilizando o sistema Vii7. As quantificações foram determinadas pelo QuantiStudioPCR Real-Time software considerando-se os valores de quantidade média. As análises estatísticas foram realizadas pelo método Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. N=3 camundongos NI e 4 camundongos/grupo infectado. *p=0,05; **p=0,01.

4.3. Análise da hipertrofia das glândulas adrenais de animais infectados pelo *T. cruzi* por via oral.

Considerando-se que durante as análises histológicas para investigação da presença de infiltrado inflamatório ou ninhos de amastigotas, foi notado um aparente aumento das células da zona fasciculada (responsáveis pela produção dos hormônios glicocorticoides) das adrenais, e tendo em vista que foi encontrado um ninho de amastigotas nessa zona celular, além da presença do DNA do parasito no tecido das adrenais, foram analisados o peso dessas glândulas e o tamanho das células produtoras de glicocorticoides, com o objetivo de avaliar uma possível hipertrofia desse órgão durante a fase aguda da infecção (fig. 8).

O peso das adrenais foi analisado após 7, 14 e 21 dpi. Nessa cinética nós observamos uma tendência ao aumento nas medidas dos órgãos de animais infectados ao longo da infecção, aonde nota-se um maior peso desses órgãos já em 14dpi apesar desse não se apresentar estatisticamente significativo. Em 21dpi ocorre um grande aumento do peso dessas glândulas em relação ao peso encontrado nos animais controle (fig. 8a).

De maneira interessante, ao avaliarmos mais profundamente os cortes histológicos, utilizando uma análise quantitativa da área das células da *zona fasciculata* do córtex dessas glândulas, pudemos observar um importante aumento dessas células concomitante ao aumento do peso da glândula após 21dpi (Fig. 8). Também foi notado que, em momentos iniciais da infecção (4 e 14dpi) não existem diferenças no tamanho das células da zona fasciculada em relação aos controles (Fig. 8b), apesar do pequeno aumento no peso desses órgãos após 14dpi.

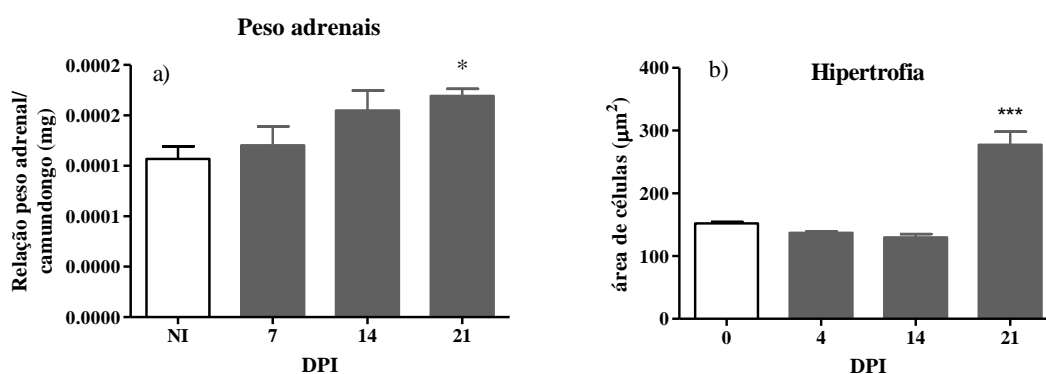


Figura 8: Análise da hipertrofia das glândulas adrenais de camundongos infectados pela via oral. Camundongos infectados por via oral com 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi* (Tulahué) foram eutanasiados após 4, 7, 14 ou 21 dias e, tiveram suas glândulas adrenais coletadas. A) Após a coleta as glândulas foram pesadas; ou B) processadas e incluídas em parafina. Cortes histológicos das adrenais foram corados com H&E e a área das células da zona fasciculada foi analisada com o software ImageJ em fotos com aumento 1000x. A) N= 5-8 camundongos/grupo; B) N=3 camundongos/grupo. As análises estatísticas foram realizadas pelo método One-way ANOVA com pós teste de Bonferroni.

4.4. Análise do perfil de citocinas e quantificação de corticosterona em camundongos infectados com *T. cruzi* por via oral

Com o objetivo de analisar o perfil da resposta imunológica durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi*, foi avaliado, por ensaios de citometria de fluxo, o perfil de citocinas circulantes produzidas em camundongos infectados, nos dias 0, 3, 7, 14, 21, 24 e 28 pós-infecção.

A partir dessa avaliação pode-se observar que em momentos mais iniciais da infecção (7 dpi) ocorre um aparente aumento de IL-6, que se mantém elevada até 21 dpi. Nesse mesmo ponto, também foram observados elevados níveis de TNF α e IFN γ , quando comparados ao grupo controle. Interessantemente, ao analisarmos os níveis circulantes de IFN γ , nota-se que essa citocina tem um aumento significativo dos seus níveis plasmáticos concomitante ao momento do começo da parasitemia ativa (Fig.4), e seus níveis mais altos correspondem aos momentos de maior parasitemia. Já o TNF apresenta um pequeno aumento nos momentos iniciais da infecção, atingindo um pico aos 21 e se mantendo estatisticamente relevante até 28dpi, Esses dados indicam que durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi* há uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias (Fig 9).

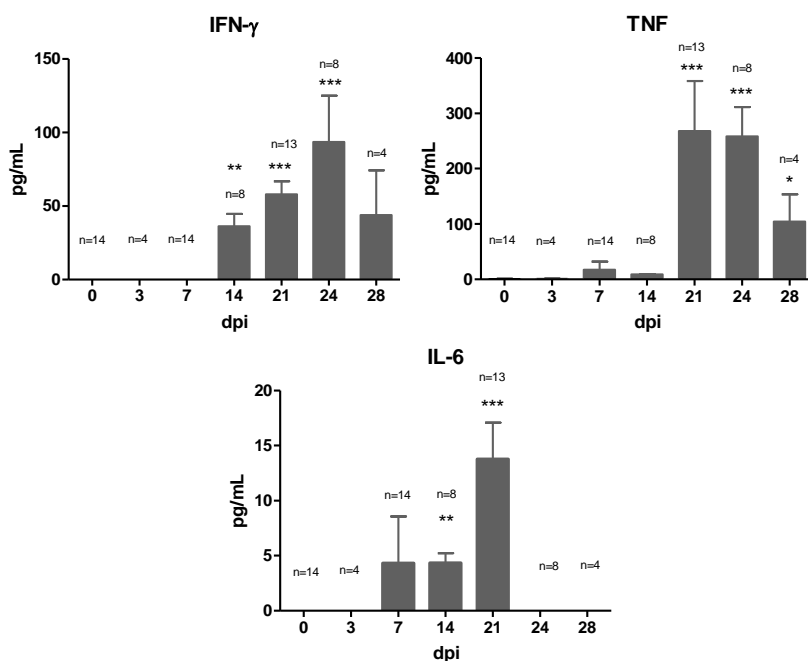


Figura 9: Análise do perfil de citocinas de camundongos infectados por via oral com *T. cruzi*. A quantificação de citocinas plasmáticas de camundongos infectados foi realizada através do ensaio citométrico CBA utilizando plasma coletado de camundongos infectados com 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi* (Tulahuen) por via oral. As análises foram realizadas através do software FCAP ArrayTM. Análises estatísticas foram feitas utilizando método Kruskal-Wallis com pós teste de Dun. N= 3-4 camundongos/grupo. *p=0,05, **p=0,005, ***p=0,001 em comparação com o grupo controle.

Tendo em vista que nossos dados apontam uma hipertrofia das glândulas adrenais, além de um aumento na produção de IL6, TNF e IFN γ durante a fase aguda, nosso próximo passo foi avaliar a atividade do eixo HPA. Nesse sentido, realizamos ensaios para a quantificação dos níveis plasmáticos de corticosterona desses animais após 7, 14 e 21 dias de infecção.

Nossos dados demonstram que em momentos iniciais da infecção oral os camundongos não apresentam mudanças na produção de glicocorticoides, porém após 14dpi já é possível notar níveis ligeiramente mais altos de glicocorticoides, porém não significativos. Esses níveis aumentam durante o curso da infecção aguda, e se tornam estatisticamente significativos em 21 dpi (Fig10).

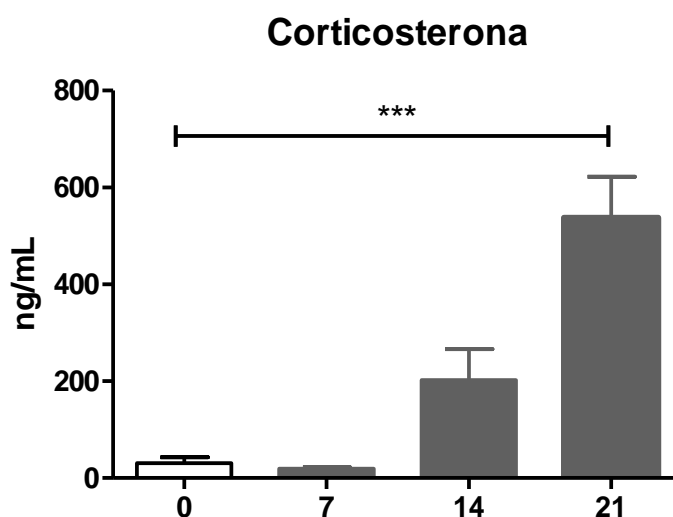


Figura 10 **Avaliação da produção de corticosterona por camundongos infectados via oral com *T. cruzi*.** Quantificação dos níveis de corticosterona produzidos por camundongos infectados por via oral com 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi* (Tulahuén) foi realizada por kit de RadioImunoEnsaio e as análises foram realizadas conforme as instruções do fabricante. N= 5-6 camundongos/ grupo. Análises estatísticas foram realizadas com o teste One-Way ANOVA e pós teste de Bonferroni. ***p=0,001 em comparação com o grupo controle.

4.5. Correlação entre a produção de citocinas e a atividade do eixo HPA em camundongos infectados com *T. cruzi* por via oral.

Nos experimentos anteriores, foi observado um notável aumento das citocinas do perfil Th1, assim como um aumento dos níveis circulantes de corticosterona ao longo da fase aguda da infecção oral por *T. cruzi*. Percebendo-se que a ativação do sistema imune era aparentemente concomitante ao aumento da atividade do eixo HPA, foi realizada uma análise de correlação entre as citocinas e corticosterona plasmáticos produzidos após 7, 14 e 21 dpi

(Fig 11). Foi notado ao longo dessa cinética, que o aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α (Fig. 11a e 11b) tem uma correlação positiva significativa com a maior produção de corticosterona pelos animais infectados. Enquanto que os níveis de IFN- γ , apesar de aparentaram uma relação positiva menor com os de glicocorticoides, essa também é significativa estatisticamente (Fig 11c).

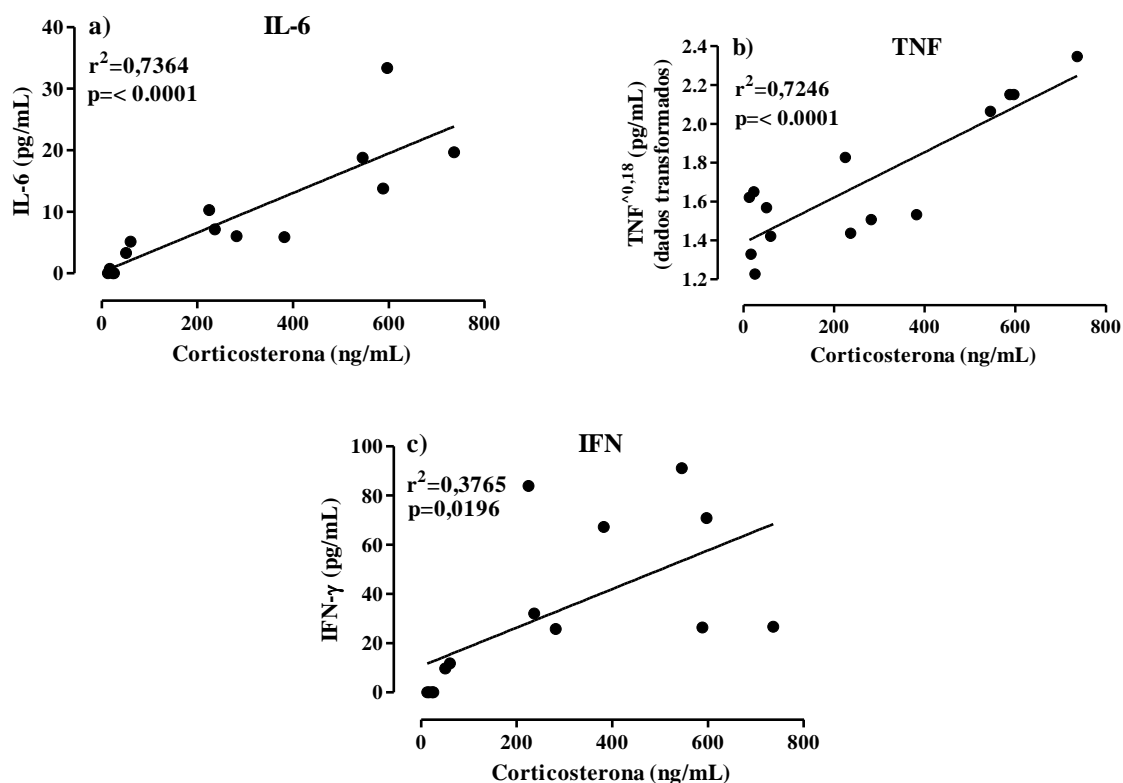


Figura 11: **Correlação entre sistema imune e produção de glicocorticoides em camundongos infectados via oral com *T. cruzi*.** Camundongos infectados por via oral com 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi* (Tulahuén) foram eutanasiados após 7, 14 e 21 dias de infecção e tiveram seu plasma coletado. A análise das citocinas foi feita por kit CBA e a de corticosterona por RIA. N= 5 camundongos/grupo.

4.6. Análise da expressão gênica dos moduladores moleculares do eixo HPA em camundongos infectados com *T. cruzi* por via oral.

Devido à ativação do eixo HPA demonstrada nesse modelo de infecção, foram realizadas análises da expressão de alguns moduladores moleculares deste eixo. O hipotálamo, hipófise e adrenais coletados, tiveram seu RNA extraído para a realização do teste de RTqPCR, e nesses foram analisadas a expressão do mRNA, do receptor de glicocorticoides (GR), no hipotálamo e na hipófise, do receptor de ACTH (MC2R) nas adrenais, e do receptor 1 da citocina TNF em todos os órgãos que compõem o eixo após 21 dias de infecção (Fig. 12).

Foi possível observar que a expressão gênica dos receptores de TNF é significativamente aumentada na infecção oral pelo *T. cruzi* nos tecidos da hipófise e do hipotálamo, em especial

nesse último, onde podemos notar uma quantificação quase 20 vezes maior nos tecidos de animais infectados em comparação aos tecidos de animais controle. Já nas adrenais há uma grande diminuição nos valores encontrados em animais infectados em relação aos animais não infectados (Fig12a). Quanto a análise dos receptores de hormônios, foi notado um aparente aumento na expressão dos receptores de glicocorticoides nos tecidos do hipotálamo e da hipófise. De maneira interessante, foi observada uma maior expressão do receptor MC2R nas glândulas adrenais dos animais infectados (Fig 12b).

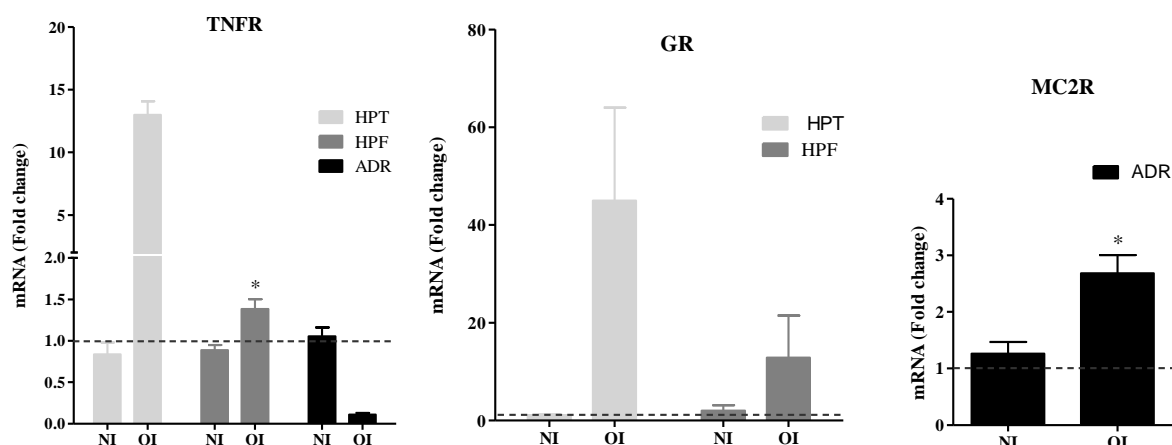


Figura 12: **Quantificação da expressão gênica dos moduladores moleculares do eixo HPA.** O RNA extraído de Hipotálamo, Hipófise e Adrenais de camundongos infectados com 5×10^4 tripomastigotas de *T. cruzi* (*Tulahuén*) foram utilizados na pesquisa da expressão gênica dos moduladores moleculares do eixo HPA, por qPCR utilizando o sistema Vii7. As quantificações foram determinadas pelo QuantiStudioPCR Real-Time software. As análises estatísticas foram realizadas pelo método t test, no programa Sigma Plot. N=2-3 camundongos /grupo infectado. *p=0,05; **p=0,01, *p=0,001.

4.7. Efeito do bloqueio de TNF- α ou do receptor de corticosterona sobre a parasitemia de animais infectados com *T. cruzi* por via oral

Com o objetivo de analisar a influência de citocinas e glicocorticoides durante a fase aguda da infecção oral, camundongos infectados foram tratados com bloqueadores de TNF- α (Enbrel) ou corticosterona (RU486), e as suas parasitemias foram analisadas em uma cinética (fig13). Foi observado que os níveis de parasitas circulantes em camundongos tratados com bloqueador de glicocorticoides, não apresentavam diferenças em comparação aos níveis do grupo tratado com veículo. De maneira similar, os camundongos tratados com o bloqueador de TNF- α não tiveram alterações na parasitemia até 28 dpi. Tomados em conjunto, esses dados demonstram que apesar da importância das citocinas na resposta imune contra o parasito, e dos glicocorticoides no controle da produção de citocinas, os seus respectivos bloqueios não impactam o nível de parasitos circulantes durante a infecção oral pelo *T. cruzi*.

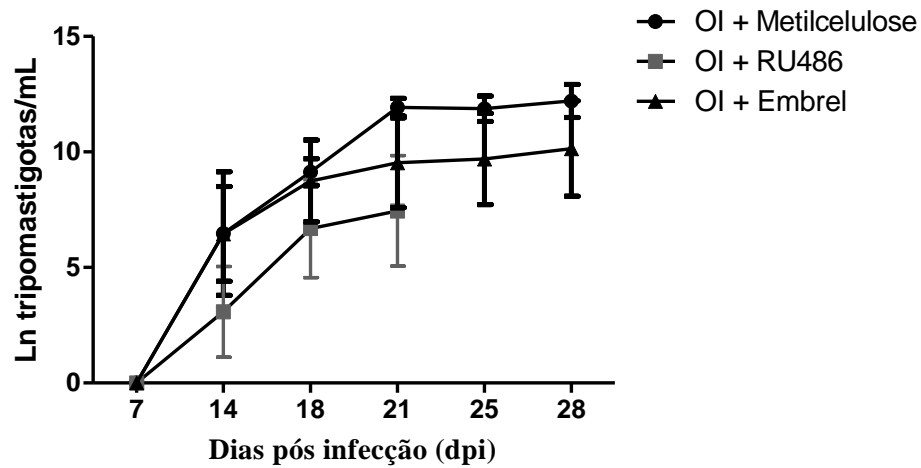


Figura 13: **Análise do impacto de citocinas e glicocorticoides no desenvolvimento da parasitemia na doença de chagas.** Cinética de parasitemia de camundongos infectados por via oral com 5×10^4 formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi*, e tratados com Embrel (0.83 mg/Kg, semanalmente, via i.p.) ou RU486 (20 mg/kg, diariamente via i.g.). Durante a fase aguda, $5 \mu\text{L}$ de sangue periférico foram coletados dos camundongos infectados para a contagem de parasitas circulantes em 50 campos por microscopia óptica com aumento de 400x. N= 5-6 camundongos. Cálculo da parasitemia foi feito pelo método Pizzi-Brenner. O número de tripomastigotas circulantes no sangue está representado em Ln tripomastigotas/mL.

5. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada que aflige principalmente países da América Latina, e estima-se infectar cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo (OMS 2017). A doença apresenta duas fases, a aguda e a crônica. Atualmente a forma de infecção mais frequente dessa doença no Brasil é a via oral. A infecção por via oral do *T. cruzi* tem sido relatada por apresentar uma fase aguda mais severa em comparação com outras formas de infecção, provavelmente devido ao fato de que diferentes rotas de entrada do parasita podem influenciar na resposta imune do hospedeiro, o que torna possível sugerir que a via de entrada representa um fator importante no curso da patogênese da doença (2,7,13).

Em um estudo relatando as formas de apresentação da doença em humanos, foi descrito que apesar da transmissão vetorial clássica e a transmissão por via oral apresentarem alguns sintomas similares na fase aguda (ex.: febre, dor de cabeça, hepatoesplenomegalia, miocardite), a infecção oral apresenta uma taxa de mortalidade muito alta em relação à outra via, podendo variar de 8 a 35% dos casos (12).

Com o intuito de avaliar a atividade do eixo HPA assim como associa-la com a ativação do sistema imune durante o curso da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* por via oral, no presente trabalho, avaliamos a infectividade dessa via de transmissão, a presença de parasitas nos órgãos que compõem o eixo HPA, assim como a produção de citocinas e corticosterona em animais infectados.

Foi possível observar que animais infectados por via oral possuem um aumento na parasitemia aos 14 dpi, atingem o seu pico em 21dpi e, que os níveis se mantêm aumentados até 28 dpi. Além disso, foi possível demonstrar a presença de DNA do parasito em todos os tecidos componentes do eixo HPA, além da presença de um ninho de amastigotas no córtex das glândulas adrenais após 21 dias de infecção por via oral, em contrapartida, não foram encontradas células de infiltrado inflamatório nas nossas análises histológicas.

Tem sido bem descrito que, a via de inóculo da infecção, está relacionada com a forma que a doença irá se manifestar no hospedeiro. Dados de infecções experimentais pelo *T. cruzi* cujo inóculo foi realizado por vias parenterais, como a via subcutânea (s.c), intraperitoneal (i.p) ou intravenosa (i.v), demonstram que esses camundongos tendem a apresentar maiores índices de infectividade, e uma menor média de sobrevida em comparação a camundongos infectados por vias de mucosa, como as vias intranasal (i.n), intragástrica (i.g) e oral (i.o). (72–74).

Também tem sido relatado que os primeiros tecidos alvo do parasita podem variar dentro de diferentes vias de infecção. Em um estudo comparando as vias de infecção i.p e i.g com a cepa Peruana de *T. cruzi* foi visto que a infecção por via i.p desenvolve um maior parasitismo e áreas de infiltrado inflamatório nos músculos cardíaco e esquelético, em relação a infecção por via intragástrica (73). Em um trabalho publicado por Caradonna e Pereiraperin em 2009 foi observado que, diferentemente de camundongos infectados por via i.p, camundongos infectados por via intranasal apresentavam um grande parasitismo em regiões do cérebro. Além disso, foi recentemente relatada a presença de DNA de *T. cruzi* no cérebro e hipófise de camundongos infectados por via oral, o que pode afetar a resposta inflamatória e neuroendócrina de camundongos infectados (27,74).

Em 1990, foi descrito que em um modelo de infecção na mucosa oral de camundongos, utilizando inóculo com tripomastigotas metacíclicos da cepa *Tulahuén*, provenientes de urina de triatomíneos, houve uma relação entre o percentual de camundongos infectados e o tamanho do inóculo utilizado na infecção oral (75). Camandaroba e col. em 2002 demonstraram que camundongos infectados por via intraperitoneal (i.p), que é uma forma de infecção mais sistêmica, apresentaram uma parasitemia maior em comparação a camundongos infectados por via i.g, partindo de um inóculo parasitário igual para ambas as vias de administração. Em outro trabalho também utilizando infecção experimental por via oral, realizado por Barreto-de-Albuquerque e colaboradores 2015 foi relatado que camundongos infectados por via oral com mesmo inóculo apresentam maior parasitemia em comparação a animais infectados por via intragástrica, além de um maior índice de mortalidade que, de maneira interessante, foi demonstrada estar relacionada com um aumento da citocina TNF.

Em um trabalho publicado por Hoft e col. em 1996, utilizando infecção com tripomastigotas metacíclicos da cepa *Tulahuén* na mucosa oral de camundongos BALB/c, foi observado que esses animais apresentavam lesões inflamatórias disseminadas em diversos tecidos incluindo cérebro e glândulas adrenais. Correia-de-Santana et. al. em 2006 demonstraram, em camundongos infectados com a cepa Colombiana por via i.v, a presença de ninhos de amastigotas nas adrenais, e DNA de parasitas nas adrenais e hipófise, porém não no hipotálamo desses animais. Além disso, também foi demonstrada a presença de células TCD4 e TCD8 nos tecidos das adrenais e hipófises dos camundongos infectados (76,77).

Tem sido bem discutido o fato de que citocinas pró-inflamatórias estão ligadas ao controle do parasitismo durante a infecção pelo *T. cruzi*. (17,45). Além disso, os Sistemas imune e endócrino interagem entre si, e essa interação inicia-se quando células do sistema

imune ativadas produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias na circulação, como TNF- α , IL-6, ou IL-1 β , o que leva à ativação do eixo HPA (77,78).

No trabalho aqui apresentado, foi demonstrada uma alta produção das citocinas pró-inflamatórias TNF, IFN e IL-6 em 21dpi, além de uma correlação direta entre os níveis circulantes das citocinas IL-6 e TNF, com a produção de corticosterona no início da fase aguda da infecção oral.

Durante a infecção aguda da doença de Chagas, citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27 são prontamente liberadas na circulação, e em seguida ativam células inflamatórias. Algumas dessas citocinas estão associadas com a diminuição da carga parasitária. Por exemplo, num trabalho de 2001, utilizando infecção via i.p, foi visto que camundongos geneticamente deficientes para IFN- γ apresentam maiores áreas de ninhos de amastigotas e maiores parasitemias (79,80).

Em um estudo utilizando duas cepas de camundongos diferentes, BALB/c e C57BL/6, em um mesmo inóculo de parasitas por via s.c, foi possível observar que em ambos os grupos de camundongos infectados ocorre um aumento dos níveis plasmáticos de TNF α , IL-1 β e IL-10, porém esse aumento é maior nos camundongos BALB/ em relação aos camundongos C57BL/6. Curiosamente, ao observar os níveis de TNFR solúveis desses camundongos, o fenômeno se inverte, encontrando maiores níveis no plasma de camundongos C57BL/6 em relação aos camundongos BALB/c (46).

Em 2015, foi demonstrado em um estudo comparativo entre duas vias de infecção, oral e intragástrica, utilizando-se de um mesmo inoculo que camundongos infectados por via oral apresentam uma maior produção sérica de citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da infecção em comparação ao grupo infectado por via intragástrica (28,51).

Já é bem estabelecido que há uma resposta do eixo HPA, culminando na produção de glicocorticoides em resposta ao estresse. Em um trabalho avaliando estresse crônico variável (CVS), aonde o camundongo é submetido diariamente a diferentes formas de estresse num período de duas semanas, foi notado que acontece um aumento nos níveis de corticosterona circulantes das glândulas adrenais, além de um aumento no peso desses órgãos em relação ao controle (81). Um estudo de 1995, utilizando modelo de infecção viral, demonstrou que após o inóculo do vírus influenza, houve um grande aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, e esses não foram alterados após o tratamento com o antagonista do receptor de glicocorticoides RU486 (82).

Camundongos infectados com a cepa Colombiana por via i.v apresentam altos níveis séricos de corticosterona e, tal aumento é concomitante com o pico de parasitemia desses animais (76). Embora seja conhecido que os glicocorticoides são produzidos pelas glândulas adrenais, foi observado que animais infectados submetidos a adrenalectomia ainda produziam corticosterona. Este fato justifica-se uma vez que glicocorticóides podem ser produzidos no Timo e em outros tecidos extra-adrenais. Além disso, esses camundongos adrenalectomizados também apresentavam aos 17 dpi altos níveis de TNF- α circulante (69).

De maneira interessante, também foram observados, no presente estudo, que após 21dpi, no pico de produção das citocinas pro-inflamatórias e de corticosterona, há uma hipertrofia da glândula adrenal tendo em vista o aumento de peso do órgão, além de um importante aumento da área das células fasciculares, produtoras de glicocorticoides. Nesse mesmo ponto de infecção, também foi notado um importante aumento da expressão gênica de receptores da citocina TNF nos tecidos do hipotálamo e hipófise dos animais infectados, e uma diminuição dessa expressão nas glândulas adrenais, juntamente com um aumento na expressão de Mc2R.

Em conjunto, esses dados sugerem que durante a infecção oral pelo *T. cruzi* há um aumento da expressão dos receptores de citocina e glicocorticoides nas glândulas hipotálamo e hipófise, concomitante com o período de aumento de produção de citocinas Th1 e corticosterona. Em contrapartida, nas glândulas produtoras de glicocorticoides, ocorre uma diminuição da expressão dos receptores GR, além de um aumento dos receptores de ACTH.

Os receptores de citocinas estão amplamente espalhados pelas estruturas centrais como o hipotálamo, a pituitária anterior e outras regiões do cérebro (64). Em um estudo realizado em 2013, foi relatado que há uma diminuição da expressão dos receptores de glicocorticoides em tímócitos TCD4 e TCD8 duplo-positivos de camundongos infectados pelo *T. cruzi* após 8 e 15 dias de infecção (83).

Em um trabalho recentemente publicado, foi descrito que camundongos diabéticos também apresentam elevados níveis circulantes de corticosterona e hipertrofia das glândulas adrenais, com aumento da área das células fasciculadas, assim como um importante aumento da expressão de receptores de ACTH na zona fasciculada desse órgão (84). De maneira interessante, esse aumento da expressão de receptores Mc2R nas adrenais, também já foi descrita por estar associada a um aumento da maquinaria esteroidogênica, representada por um grande aumento de StAR, nas células fasciculadas das adrenais de camundongos tratados com antioxidante (85).

Ratos que sofreram um estresse crônico pela administração contínua de pequenas doses de cocaína, e foram posteriormente restritos desse tratamento, apresentaram altos níveis plasmáticos de corticosterona e proteicos de GR no hipotálamo e hipófise, assim como aumentados níveis de mRNA do hormônio CRH no hipotálamo desses animais, correlacionando altos níveis de GC com maior expressão de GR (86).

Além disso, também foi visto em um trabalho de Villar e colaboradores em 2013, que camundongos geneticamente deficientes (KO) para o receptor TNFR1 apresentam níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias muito mais altas que o seu controle, além de uma maior produção de glicocorticoides e de um maior peso das glândulas adrenais. Esse estudo também demonstrou um aumento da zona fasciculada do córtex das adrenais de animais infectados pelo *T. cruzi* por via intraperitoneal, e de maneira interessante, os camundongos KO para TNFR1 possuíam uma menor expressão de TNFR2 em comparação ao grupo infectado selvagem (78).

Por fim, com o intuito de avaliar o impacto das citocinas e hormônios produzidos durante a infecção por via oral aguda, foram realizados bloqueios da citocina TNF e do receptor de glicocorticoide, utilizando Enbrel® e RU486, respectivamente. A partir desses tratamentos foi possível observar o efeito do excesso das citocinas TNF e dos glicocorticoides sobre a parasitemia dos animais infectados, e como resultado não foram observadas diferenças entre os valores apresentados pelos grupos tratados e não tratados.

Em um estudo realizado em 2006, utilizando o bloqueio do receptor de glicocorticoides com o antagonista RU486, foi visto que esse tratamento induz um aumento dos níveis circulantes das citocinas TNF α e IL-6, além de uma diminuição na sobrevivência dos camundongos. Porém, quando avaliados a parasitemia, e presença de ninhos de amastigotas e infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, não foram observadas diferenças entre os animais infectados tratados e não tratados (45).

Recentemente, em um trabalho publicado em 2015, utilizando um modelo de infecção oral pelo *T. cruzi*, foi notado que o momento do pico de produção de TNF, era concomitante ao período de queda na sobrevivência dos animais infectados, então, utilizando o bloqueio dessa citocina, foi possível observar um aumento na sobrevivência dos camundongos infectados, apesar do tratamento não exercer alterações na parasitemia dos animais (28).

6. CONCLUSÃO

Os dados apresentados nesse trabalho sugerem que durante a fase aguda da infecção oral pelo *T. cruzi* há uma passagem de parasitas para os tecidos que compõe o eixo HPA, além de um aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, de corticosterona, e da expressão gênica dos receptores de TNF e glicocorticoides nos hipotálamos e hipófises, assim como de ACTH nas adrenais. Sendo esses elevados níveis de glicocorticoides concomitantes a uma hipertrofia da glândula adrenal dos animais infectados, em um modelo de inóculo que mimetiza mais intimamente a via de infecção atualmente mais frequente no Brasil.

7. PERSPECTIVAS

Pretendo dar continuidade ao trabalho iniciado, primeiramente aumentando o N amostral dos experimentos, adicionando novos bloqueios (como o da citocina IL-6), realizar a curva de mortalidade dessa infecção, e posteriormente aprofundar o conhecimento aqui adquirido dando ênfase na pesquisa relacionada ao Sistema Nervoso Central, relacionando processos inflamatórios em algumas regiões do cérebro e relacionando à ativação do eixo HPA.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004;101(7):2034–9.
2. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):845–52.
3. Jimenez V. Dealing with environmental challenges: Mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Res Microbiol* [Internet]. 2014;165(3):155–65.
4. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973;27:347–82.
5. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 2001;31(5–6):472–81.
6. Hotez PJ, H. MD, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of Neglected Tropical Diseases. *Engl J Med*. 2007;357(10):1018–27.
7. Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*
8. Andrade D V., Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):1–10.
9. Ramos Jr. AN, Carvalho DM de. Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas. *Cad Saude Publica*. 2001;17(6):1403–12.
10. Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009;104 Suppl:101–7.
11. Garcia SB. Doença de Chagas: Os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor. *Arq Gastroenterol*. 2009;46(4):249–51.
12. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*
13. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Nat outlooks*. 2010;115(1–2):14–21.
14. Cura CI, Lattes R, Nagel C, Gimenez MJ, Blanes M, Calabuig E, et al. Early molecular diagnosis of acute chagas disease after transplantation with organs from *Trypanosoma cruzi*-infected donors. *Am J Transplant*. 2013;13(12):3253–61.
15. World Health Organization. CONTROL OF CHAGAS DISEASE Second report of the WHO Expert Committee World Health Organization. *W H O T e c h n i c a l R e p o r t S e r i e s*. 2002;905:1–109.
16. Zeledón R, Rabinovich JE. CHAGAS' DISEASE: An Ecological Appraisal With Special Emphasis on its Insect Vectors. *Annu Rev Entomol*. 1981;26(51):101–33.
17. Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence

- in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 2009;31(11):673–85.
18. Sánchez LV, Ramírez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology.* 2012;(September):1–13.
 19. Ribeiro M, Nitz N, Santana C, Moraes A, Hagström L, Andrade R, et al. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol [Internet].* 2016;162:1–6.
 20. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):653–5.
 21. M. Toso A, U. Vial F, Galanti N. Oral transmission of Chagas' disease. *Rev Med Chile.* 2011;139:258–66.
 22. de Noya BA, González ON. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop [Internet].* 2015;151(1):94–102.
 23. Silveira AC. Factores de riesgo implicados en la transmisión oral de la Enfermedad de Chagas. In: Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA). 2006. p. 16–9.
 24. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo a M, Franco RM, Dias VL, Passos L a. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot [Internet].* 2009;72(2):441–6.
 25. Coura JR, Junqueira AC V, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002;18(4):171–6.
 26. Maeda FY, Cortez C, Yoshida N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Front Immunol.* 2012;3(NOV):1–7.
 27. Silva-dos-Santos D, Barreto-de-Albuquerque J, rbara Guerra B, Moreira OC, Ricardo Berbert L, Tavares Ramos M, et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. 2017;1–26.
 28. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Berbert LR, de S-VE, Farias-de-Oliveira DA, Cotta-de-Almeida V, et al. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):e0003849.
 29. Dos F, Virgilio S, Pontes C, Dominguez MR, Ersching J, Rodrigues MM, et al. Infection: A Path for Vaccine Development? 2014;2014.
 30. Rassi Jr A, Rassi A, Little WC. Chagas' Heart Disease. *Clin Cardiol.* 2000;23:883–9.
 31. Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA, da Costa GC, da Silveira ABM, Reis DDÁ, et

- al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(SUPPL. 1):208–18.
32. A. P. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2001;1(2):92–100.
 33. 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;104(SUPPL. 1):252–8.
 34. Watanabe Costa R, da Silveira JF, Bahia D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. *Front Microbiol*. 2016;7(MAR):1–9.
 35. Stempin C, Giordanengo L, Gea S, Cerbán F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leukoc Biol*. 2002;72(4):727–34.
 36. Waghabi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonça-Lima L, Soeiro M de NC, et al. Uptake of Host Cell Transforming Growth Factor- β by *Trypanosoma cruzi* Amastigotes in Cardiomyocytes: Potential Role in Parasite Cycle Completion. *Am J Pathol*. 2005;167(4):993–1003.
 37. Silva-Neto MAC, Lopes AH, Atella GC. Here, there, and everywhere: The ubiquitous distribution of the immunosignaling molecule lysophosphatidylcholine and its role on chagas disease. *Front Immunol*. 2016;7(FEB):1–8.
 38. Boscardin SB, Torrecilhas ACT, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, et al. Chagas' disease: An update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med*. 2010;14(6 B):1373–84.
 39. dos Reis GA. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. 2011;44(2):84–90.
 40. Gironès N úria, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: Autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*. 2003;19(1):19–22.
 41. Tarleton RL, Zhang L. *Chagas Disease Etiology*: 1999;15(3).
 42. Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF, Dos Santos Costa PC, Bergami PL, Dos Santos Almeida N a, et al. Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J*. 1998;12(14):1551–8.

43. Higuchi M de L, De Brito T, Martins Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993;2(2):101–6.
44. Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, Beldjord C, et al. Detection of Parasite DNA in Chagas' heart disease. *Ann Intern Med*. 1985;1370–1.
45. Roggero E, Pérez AR, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Basedovsky HO, et al. Edogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol*. 2006;190(2):495–503.
46. Roggero E, Perez A, Revelli S, Bottasso O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB / c and C57BL / 6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. 2002;421–8.
47. Roggero E, Pérez AR, Bottasso OA, Besedovsky HO, Del Rey A. Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1153:264–71.
48. De Meis J, De Albuquerque JB, Dos Santos DS, 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. *Front Immunol*. 2013;4(JUL):1–7.
49. Kloet ERDE, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Pharmacology M, Amsterdam L. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. 1998;19(December):269–301.
50. Smith SM, Vale WW. Basic research. 2006;383–95.
51. Harbuz MS, Conde GL, Lightman SL, Jessop DS. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;214–24.
52. Kendal ER. Principles of Neural Science. 2000.
53. Kronfol Z. Cytokines and the Brain: Implications for Clinical Psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2000;157(5):683–94.
54. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(6):463–75.
55. Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;966(44):108–18.
56. Sapolsky RM, Romero LM, Munck a. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses ? Preparative Actions *. *Endocr Rev*. 2000;21(April):55–89.
57. Brinkmann V, Kristofic C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets. *J Immunol [Internet]*. 1995;155(7):3322–8.

58. Ramírez F, Fowell DJ, Puklavec M, Simmonds S, Mason D. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *J Immunol* [Internet]. 1996;156(7):2406–12.
59. Buckingham JC, Loxley HD, Christian HC, Philip JG. Activation of the HPA axis by immune insults: Roles and interactions of cytokines, eicosanoids, and glucocorticoids. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996;54(1):285–98.
60. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol* [Internet]. 2016;6(2):603–21.
61. Harbuz M. Neuroendocrinology of autoimmunity. *Int Rev Neurobiol* [Internet]. 2002;52:133–61.
62. Besedovsky H, Key ADEL, Sorkin E, Dinarello C a. Immunoregulatory Feedback. *Science* (80-). 1986;233(1970):652–4.
63. Besedovsky HO, Rey ADEL, Klusman I, Furukawa H, Ardití GM. CYTOKINES AS MODULATORS OF THE HYPOTHALAMUS-PITUITARY-ADRENAL AXIS. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 1991;40(4):613–8.
64. Pérez AR, Bottasso O, Savino W. The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(2):96–105.
65. Davis TME, Thu LTA, Binh TQ, Robertson K, Dyer JR, Danh PT, et al. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in severe falciparum malaria: Effects of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(9):3029–33.
66. Rey A del, Mahuad C V., Bozza V V., Bogue C, Farroni MA, Bay ML, et al. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav Immun*. 2007;21(2):171–9.
67. Turnbull AV, Rivier C. Regulation of the HPA Axis by Cytokines. Vol. 9, *Brain, Behavior, and Immunity*. 1995. p. 253–75.
68. Lepletier A, de Frias Carvalho V, Morrot A, Savino W. Thymic atrophy in acute experimental Chagas disease is associated with an imbalance of stress hormones. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1262(1):45–50.
69. Perez AR, Roggero E, Nicora A, Palazzi J, Besedovsky HO, del Rey A, et al. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain Behav Immun*. 2007;21(7):890–900.
70. González FB, Villar SR, Fernández Bussy R, Martín GH, Pérol L, Manarín R, et al. Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled *T. cruzi* infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3+ T cells. *Brain Behav Immun*.

- 2015;45:219–32.
71. Corrêa-De-Santana E, Pinto-Mariz F, Savino W. Immunoneuroendocrine interactions in Chagas disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1088:274–83.
 72. Marsden PD. *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 1967;61(1):62–7.
 73. Camandaroba ELP, Lima CMP, Andrade SG. ORAL TRANSMISSION OF CHAGAS DISEASE : IMPORTANCE OF *Trypanosoma cruzi*. *Exp Anim.* 2002;44(2):97–103.
 74. Caradonna K, Pereiraperrin M. Preferential brain homing following intranasal administration of *trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2009;77(4):1349–56.
 75. KIRCHHOFF L V., HOFT DF. Immunization and challenge of mice with insect-derived metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1990;12(1):65–74.
 76. Corrêa-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.
 77. Hoft DF, Farrar PL, Kratz-owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses . Gastric Invasion by *Trypanosoma cruzi* and Induction of Protective Mucosal Immune Responses. 1996;64(9):3800–10.
 78. Villar SR, Ronco MT, Fernández Bussy R, Roggero E, Lepletier A, Manarin R, et al. Tumor Necrosis Factor- α Regulates Glucocorticoid Synthesis in the Adrenal Glands of *Trypanosoma cruzi* Acutely-Infected Mice. The Role of TNF-R1. *PLoS One.* 2013;8(5).
 79. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal Role of Interleukin-12 and Interferon- γ Axis in Controlling Tissue Parasitism and Inflammation in the Heart and Central Nervous System during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Am J Pathol* [Internet]. 2001;159(5):1723–33.
 80. Bilate AMB, Cunha – Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of na old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50(2):67–74.
 81. Ulrich-lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP, et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. 2006;506:965–73.
 82. Hermann G, Beck FM, Sheridan JF. Stress-induced glucocorticoid response modulates mononuclear cell trafficking during an experimental influenza viral infection. 1995;
 83. Lepletier A, de Carvalho VF, e Silva PMR, Villar S, Pérez AR, Savino W, et al.

- Trypanosoma cruzi Disrupts Thymic Homeostasis by Altering Intrathymic and Systemic Stress-Related Endocrine Circuitries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11):1–13.
84. Torres CR, Magalhães NS, Silva PMR, Martins MA, Carvalho VF. Activation of PPAR- γ reduces HPA axis activity in diabetic rats by up-regulating PI3K expression. *Exp Mol Pathol*. 2016;101:290–301.
85. Prevatto JP, Torres RC, Diaz BL, Silva PMR, Martins MA, Carvalho VF. Antioxidant Treatment Induces Hyperactivation of the HPA Axis by Upregulating ACTH Receptor in the Adrenal and Downregulating Glucocorticoid Receptors in the Pituitary. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
86. Mantsch JR, Taves S, Khan T, Katz ES, Sajan T, Tang LC, et al. Restraint-induced corticosterone secretion and hypothalamic CRH mRNA expression are augmented during acute withdrawal from chronic cocaine administration. *Neurosci Lett*. 2007;415(3):269–73.