



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Ciências Médicas

Laboratório Interdisciplinar de Biociências

**Transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em camundongos
chagásicos crônicos**

Aluna: Marcelle Araujo Ribeiro

Orientadora: Prof. Dr^a. Nadjar Nitz

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Mariana Hecht

Brasília – DF
2015

Marcelle Araujo Ribeiro

**Transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em camundongos
chagásicos crônicos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF
2015

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biotecnologia, Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: CAPES

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados sobrinhos, Luanna, João Eduardo e Lucas.

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por me ampararem nos momentos difíceis, me darem força interior para superar as dificuldades, mostrarem os caminhos nas horas incertas e me suprirem em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, João Domingos Ribeiro e Edilene Araujo, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em minha capacidade e pelos melhores conselhos quando precisava. À minha querida avó, Maria da Graça Araujo, por ser minha maior incentivadora e base de minha existência, obrigada por todas as horas de orações dedicadas a mim, nos momentos difíceis. Aos meus padrinhos, Marcelo Araujo e Eliane Araujo, por serem meus verdadeiros protetores, obrigada por todo carinho e amparo.

Aos meus queridos irmãos, Luciano Ribeiro, Mariana Ribeiro, Mayara Ribeiro, Beatriz Araujo, Luiz Phelipe Araujo e Luiza Araujo, por serem os meus melhores amigos em todos os momentos da vida, por toda forma de amor e confiança depositados em mim. Aos meus cunhados, Wanessa Ribeiro e Gabriel Gomes, que se tornaram pessoas importantes e fonte de grande incentivo e apoio. Aos meus sobrinhos, Luanna Ribeiro, João Eduardo Ribeiro e Lucas Ribeiro, que são os motivadores da minha maior e melhor forma de amor.

Às minhas queridas amigas/irmãs, Allana Moreira, Jessica Moreira, Nathalia Costa, Thays Pera, Cele Silva e Regina Moreira por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa.

À minha família, Araujo Ribeiro, a qual amo demais, por todo amparo e carinho, para realização dos meus sonhos. Sem vocês a vida não teria graça!

À minha família, Luz dos Corações e JonpeM, que estavam comigo desde o momento da aprovação no processo seletivo até o final. Ao Padre e grande amigo Flavio Moreira, pelos conselhos e confiança.

Às minhas orientadoras, Nadjar Nitz e Mariana Hecht, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional e de mulheres.

Aos amigos adquiridos no laboratório, Perla Araujo, Thaís Minuzzi, Luciana Hagström-Bex, Maria Carolina Diniz, Bernad Oliveira, Aline Moraes, Bruna Caroline, Búzinhos (Guilherme Marques), Ana Luísa Marques, Camilla Santana, Tamires Vital, Ester Rose, que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos. Manatealoucas quero levar vocês para o resto da vida.

Ao meu amigo e irmão Adriano Silva, sem ele não teria chegado até onde cheguei. À minha amiga Tamires Vital, que foi essencial no meu crescimento profissional e espiritual. À minha amiga Camilla Santana, que é minha companheira de aventuras e foi meu braço direito e esquerdo durante toda a realização desse trabalho.

Aos colaboradores do trabalho, Alessandro Oliveira, Bruno Dallago, Ana de Cássia Rosa, Tércia Castro, Rafael Andrade, Prof. Florêncio Figueiredo, e Prof Rodrigo Gurgel, que se prontificaram a me auxiliar em todos os momentos necessários.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é transmitido principalmente por via vetorial, entretanto, outras vias de transmissão também apresentam importância epidemiológica, como a transfusão sanguínea, a via transplacentária e por meio da contaminação de alimentos. A transmissão sexual do *T. cruzi* foi sugerida por vários pesquisadores, desde a descoberta da doença de Chagas, contudo, poucos trabalhos científicos foram realizados. Pesquisas anteriores sugerem que camundongos infectados podem transmitir o parasito por via sexual durante a fase aguda da doença, quando a carga parasitária é alta. Como a maioria dos indivíduos infectados são diagnosticados na fase crônica, é de extrema importância investigar se também ocorre a transmissão sexual do *T. cruzi* em condições de baixa parasitemia. O presente trabalho teve como objetivo investigar a transmissão sexual do *T. cruzi* no modelo experimental murino durante a fase crônica. Dez camundongos BALB / c, machos e fêmeas sexualmente maduros, infectadas por via intraperitoneal com 10^3 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foram cruzados com animais não infectados após 90 dias da infecção. Os casais foram avaliados depois de duas gestações e a infecção pelo *T. cruzi* foi analisada por testes parasitológicos, sorológicos e métodos moleculares. Além disso, foi determinada a carga parasitária em diferentes tecidos por qPCR. Os resultados mostram que camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi* podem transmitir o parasita aos parceiros sexuais. O exame parasitológico identificou o parasito no sangue periférico em 100% dos animais infectados intraperitonealmente e em 20% dos camundongos que foram infectados pela via sexual. Os testes sorológicos e moleculares demonstraram a presença de anticorpos específicos e amplicons em todos os animais testados após o período de 120 dias. Análise histopatológica do coração, testículo/ovário, intestino e músculo, identificou a presença de infiltrado inflamatório moderado e destruição de fibras cardíacas nos animais infectados pela via intraperitoneal, na ausência de ninhos de amastigota. A transmissão sexual do parasita para fêmeas inicialmente não infectadas também foi validada pela identificação da infecção transplacentária para os filhotes. A análise da progênie mostrou que a infecção congênita ocorreu em 25/26 (96,15%) animais, que apresentaram resultados positivos nos testes moleculares. Os resultados confirmam a transmissão sexual do *T. cruzi* na fase crônica da infecção. Até onde sabemos, esta é a primeira demonstração experimental da transmissão sexual do *T. cruzi* na fase crônica da infecção. A via sexual pode ser um fator potencial de dispersão da Doença de Chagas no mundo. A determinação desta via de transmissão em animais cronicamente infectados é de suma importância, uma vez que a maioria dos indivíduos com CD encontram-se na fase crônica. Além disso, estudos epidemiológicos em áreas livres de triatomíneos são necessários para determinar o potencial de infectividade em casais em que apenas um dos parceiros tem uma história de CD, favorecendo a maior compreensão da importância da transmissão sexual em populações humanas.

Palavras Chaves: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Transmissão sexual.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is mainly transmitted by haematophagous triatomines, however, other routes of transmission also have epidemiological importance, such as blood transfusion, transplacental route and through food contamination. Sexual transmission of *T. cruzi* was suggested by several researchers, since the discovery of Chagas disease, but, few scientific studies have been conducted on the subject. Previous work suggests that infected mice can transmit the parasite sexually during the acute phase of the disease, when the parasite load is high. Since most infected individuals are diagnosed during the chronic phase, it is important to investigate whether also occurs sexual transmission of *T. cruzi* in low parasitaemia conditions. This study aimed to investigate the sexual transmission of *T. cruzi* in murine model during the chronic phase. Ten sexually mature BALB/c, males and females, infected intraperitoneally with 10^3 *T. cruzi* trypomastigotes were crossbred with non-infected animals 90 days after infection. The couples were assayed after two pregnancies and *T. cruzi* infection was analyzed by parasitological, serological and molecular methods. In addition, parasite load was determined in different tissues by qPCR. The results show that mice chronically infected with *T. cruzi* can transmit the parasite to sexual partners. Parasitological test identified the parasite in the peripheral blood in 100% of intraperitoneally infected animals and in 20% of mice that were infected through sexual contact. The serologic and molecular analysis demonstrated the presence of specific antibodies and amplicons in all animals tested after 120 days. Histopathological analysis of heart, testis / ovary, intestine and muscle identified the presence of mild infiltration and destruction of cardiac fibers in animals infected intraperitoneally, in absence of amastigote nests. Sexual transmission of the parasite to naive females was also validated by the identification of transplacental infection in their offspring. Progeny analysis showed that congenital infection arised in 25/26 (96.15%) animals, which showed positive results in molecular tests. The results confirm the sexual transmission of *T. cruzi* in the chronic phase of infection. To the best of our knowledge, this is the first confirmation of sexual transmission of *T. cruzi*, a route with great potential for spreading CD worldwide. The determination of this pathway in chronically infected animals is of paramount importance, since most individuals with CD are in the chronic phase. In addition, epidemiological surveys in triatomine-free areas are required to determine the infectivity rate in couples in which only one partner has a history of CD, thus helping to clarify the importance of this mode of transmission in human populations.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, sexual transmission.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Movimento migratório e número estimado de infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> em cada país. | 18 |
| Figura 2: Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> . | 20 |
| Figura 3: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . | 22 |
| Figura 4: Distribuição dos animais nos grupos experimentais. | 36 |
| Figura 5: Curva Padrão da qPCR | 47 |
| Figura 6: Fluxograma da metodologia utilizada | 50 |
| Figura 7: Detecção de forma tripomastigota em sangue periférico de camundongo infectado pela via sexual. | 52 |
| Figura 8: Identificação de anticorpos específicos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> pelo método ELISA. | 53 |
| Figura 9: Presença de anticorpos específicos anti – <i>Trypanosoma cruzi</i> detectados pela Imunofluorescência indireta. | 55 |
| Figura 10: Detecção de DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em camundongos dos grupos A, B, C e D, antes do cruzamento. | 56 |
| Figura 11: Identificação do DNA nuclear do <i>Trypanosoma cruzi</i> camundongos não infectados após acasalamento com parceiros sexuais infectados. | 57 |
| Figura 12: Amplificação de nDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em amostras de camundongos infectados pela via intraperitoneal, antes do acasalamento, utilizando os <i>primers</i> TCZ3/TCZ4. | 58 |
| Figura 13: Amplificação de nDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em amostras de animais infectados pela via sexual, utilizando os <i>primers</i> TCZ3/TCZ4 em animais infectados pela via sexual. | 59 |
| Figura 14: Carga parasitaria em diferentes tecidos de camundongos infectados | |

pelas vias seual e intraperitoneal. **60**

Figura 15: Amplificação de nDNA de *Trypanosoma cruzi* utilizando os *primers* PON1/PON2 nos camundongos do grupo D. **63**

Figura 16: Amplificação de nDNA de *Trypanosoma cruzi* utilizando os *primers* TCZ3/TCZ4 nos camundongos do grupo E. **64**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Títulos de anticorpos específicos IgG anti – *Trypanosoma cruzi* produzidos em camundongos dos grupos C e D. **54**
- Tabela 2:** Título de anticorpos específicos IgM anti – *Trypanosoma cruzi* produzidos por camundongos do grupo E. **62**
- Tabela 3:** Anexo B. Resultados dos testes parasitológicos, sorológicos, moleculares e imunohistológicos, dos camundongos estudados. **88**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| CN | Controle Negativo |
| CP | Controle Positivo |
| DC | Doença de Chagas |
| DCA | Doença de Chagas Aguda |
| DME | Meio modificado por Dulbecco |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico) |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzimas) |
| HAI | Hemaglutinação Indireta |
| IFI | Imunofluorescência Indireta |
| Ig | Imunoglobulina |
| IP | Infecção Intraperitoneal |
| IS | Infecção Sexual |
| kDNA | <i>Kinetoplast DNA</i> – DNA do cinetoplasto |
| MS | Ministério da Saúde |
| nDNA | DNA nuclear |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em cadeia) |
| qPCR | PCR quantitativa |
| SFB | Soro Fetal Bovino |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| I. INTRODUÇÃO | 17 |
| 1. Doença de Chagas | 17 |
| 1.1 Panorama geral | 17 |
| 2. <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| 3. Ciclo Biológico | 20 |
| 4. Manifestações clínicas | 23 |
| 5. Patogênese | 23 |
| 6. Diagnóstico | 25 |
| 7. Tratamento | 26 |
| 8. Vias de Transmissão | 27 |
| 8.1 Transmissão vetorial | 27 |
| 8.2 Transmissão oral | 28 |
| 8.3 Transmissão congênita | 29 |
| 8.4 Transmissão transfusional | 30 |
| 8.5 Transmissão por transplante de órgãos | 31 |
| 8.6 Transmissão sexual | 31 |
| II. JUSTIFICATIVA | 34 |
| III. OBJETIVOS | 35 |
| 1. Objetivo Geral | 35 |
| 2. Objetivos Específicos | 35 |
| IV. MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 1. Grupos Experimentais | 36 |
| 2. Cruzamento dos camundongos | 37 |
| 3. Cultura do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 37 |
| 4. Infecção dos camundongos | 37 |
| 5. Pesquisa a fresco do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 37 |
| 6. Esfregaço sanguíneo | 38 |
| 7. Hemocultura | 38 |
| 8. Imunodiagnóstico | 38 |
| 8.1 Amostra | 38 |
| 8.2 Preparação de antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 38 |
| 8.3 ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) | 39 |
| 8.4 Imunofluorescência Indireta | 40 |
| 9. Extração de DNA | 41 |

| | | |
|-------|---|----|
| 9.1 | Extração de DNA total do <i>T. cruzi</i> | 41 |
| 9.2 | Extração de DNA de sangue..... | 41 |
| 9.3 | Coleta de tecidos e extração de DNA | 42 |
| 9.4 | Quantificação e análise qualitativa do DNA | 43 |
| 10. | Diagnóstico molecular | 43 |
| 10.1 | Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)..... | 43 |
| 10.2 | <i>Nested</i> PCR | 44 |
| 10.3 | <i>Nested</i> qPCR | 46 |
| 11. | Análise histopatológica..... | 48 |
| 12. | Imunohistoquímica | 48 |
| 13. | Análise Estatística | 49 |
| | Figura 6. Fluxograma da metodologia utilizada..... | 50 |
| V. | RESULTADOS..... | 51 |
| 1. | Diagnóstico Parasitológico | 51 |
| 2. | Diagnóstico sorológico | 52 |
| 3. | Diagnóstico Molecular | 56 |
| 4. | Quantificação do <i>Trypanosoma cruzi</i> no tecido de camundongos infectados .. | 59 |
| 5. | Diagnóstico imunohistológico | 60 |
| 6. | Avaliação da transmissão congênita como ferramenta para confirmação da transmissão sexual do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 61 |
| VI. | DISCUSSÃO | 65 |
| 1. | Avaliação dos testes de diagnóstico utilizados para detecção da transmissão sexual..... | 65 |
| 2. | Avaliação da análise Histopatológica e imunohistoquímica na identificação do <i>Trypanosoma cruzi</i> em tecidos de camundongos infectados | 67 |
| 3. | Avaliação de transmissão congênita como ferramenta de confirmação da transmissão sexual do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 68 |
| 4. | Transmissão sexual do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 68 |
| VII. | CONCLUSÕES | 70 |
| VIII. | PERSPECTIVAS..... | 71 |
| IX. | REFERÊNCIAS..... | 72 |
| | Anexo A..... | 87 |
| | Anexo B..... | 88 |
| | Anexo C | 92 |

I. INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas

1.1 Panorama geral

A infecção causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* foi descoberta em 1909, pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas. Foi durante uma campanha contra Malária, no estado de Minas Gerais, que o mesmo deparou-se com uma menina, Berenice, que apresentava estado febril. Ao analisar em microscópio o esfregaço sanguíneo da mesma, observou um protozoário flagelado desconhecido. Além do agente causador, o cientista identificou também o agente transmissor do parasito, um triatomíneo hematófago muito frequente em casas de barro e madeira da região. Após os achados, Carlos Chagas descreveu com riquezas de detalhes aspectos relacionados ao agente etiológico, ao hospedeiro vertebrado, bem como mecanismo de infecção e manifestações clínicas (Texeira *et al.*, 2006; Coura e Viñas, 2010).

A Doença de Chagas (DC), ou Tripanossomíase Americana é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma Doença Tropical Negligenciada e constituindo um grave problema social e econômico para humanidade (Rassi *et al.*, 2012). A doença foi identificada primeiramente na América Latina, em áreas rurais de países endêmicos, resultado das condições precárias de moradias que favorecem a infestação vetorial. Contudo, casos de infecção em áreas não endêmicas vêm crescendo nas últimas décadas em consequência da migração urbana. Alguns países como Estados Unidos, Canadá e do continente Europeu, livres de transmissão vetorial, também são atingidos pela enfermidade devido à migração (Figura 1). Estima-se que no mundo existam de 6 a 7 milhões de pessoas sob o risco de contraírem a infecção, principalmente na América (Biolo *et al.*, 2010; Martins-Melo *et al.*, 2012; WHO, 2015).

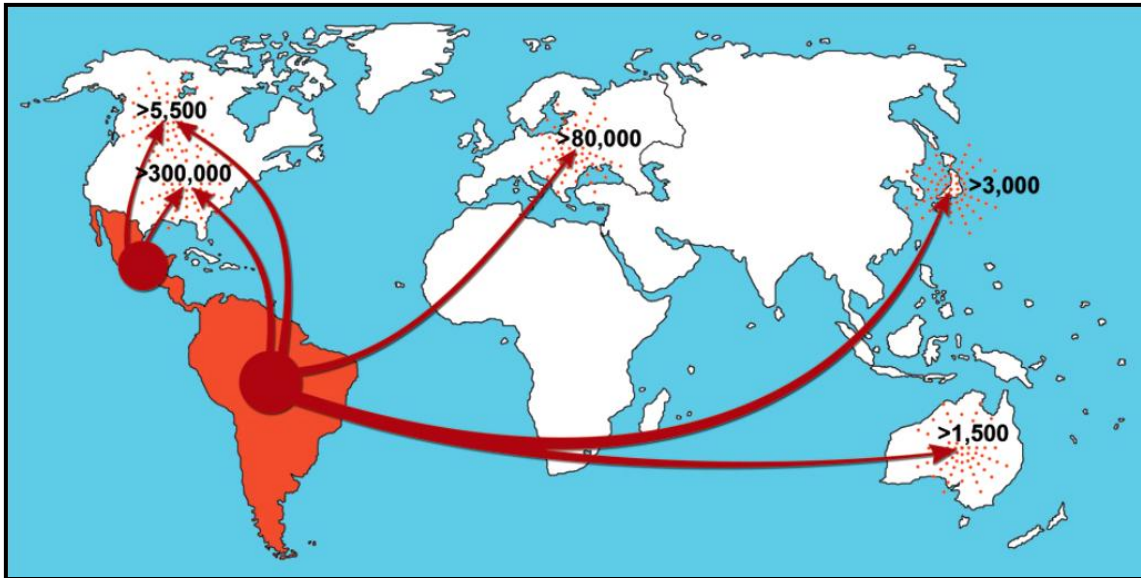


Figura 1. Movimento migratório e número estimado de infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em cada país (Coura e Viñas, 2010).

No Brasil, a implementação de programas de prevenção e controle do vetor, como a utilização de inseticidas de ação residual e a melhoria habitacional, modificou o cenário epidemiológico, diminuindo a ocorrência de novos casos de transmissão vetorial em áreas originalmente endêmicas. Os casos de transmissão transfusional diminuíram drasticamente devido à realização de exames pré-transfusoriais específicos para a pesquisa da infecção por *T. cruzi*. Contudo, mesmo que ocorra um controle da transmissão vetorial, existe ainda o risco de animais silvestres serem potenciais transmissores da infecção para o homem, pela contaminação direta de fluidos ou pela ingestão de alimentos contaminados. Exemplo disso é o que está acontecendo na Amazônia, onde se tem observado a ocorrência de casos e surtos de transmissão oral e vetorial (sem colonização), tornando-a uma área endêmica. Estima-se que existam cerca de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas no país, em comparação com 7 milhões de infectados no ano de 1960. (Nóbrega *et al.*, 2009; Martins-Melo *et al.*, 2012).

2. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, agente causador da DC, pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Rassi *et al.*, 2010). Este hemoflagelado tem como hospedeiros vertebrados mamíferos e como hospedeiros invertebrados hemípteros reduvídeos da subfamília Triatominae. O parasito apresenta uma única mitocôndria, contendo DNA de estrutura circular formando redes concatenadas conhecido por DNA do cinetoplasto ou kDNA. Apresenta diferentes formas evolutivas e variações quanto á infectividade e patogenicidade durante seu ciclo de vida. No hospedeiro invertebrado a forma replicativa é a epimastigota extracelular (Figura 2A), que se caracteriza por sua forma alongada (fusiforme), cinetoplasto discóide posicionado anteriormente ao núcleo e com o flagelo livre emergindo da região anterior. No hospedeiro vertebrado a forma replicativa é a amastigota intracelular (Figura 2B), com flagelo bem curto e de formato arredondado (Neves, 2004; Texeira *et al.*, 2011).

As formas infectantes, tanto para o hospedeiro vertebrado como para o hospedeiro invertebrado, são as tripomastigotas (Figura 2C), formas não replicativas, alongadas com cinetoplasto arredondado, posterior ao núcleo e flagelo, que percorre externamente toda extensão de seu corpo aderido a uma membrana ondulante (Neves, 2004; Texeira *et al.*, 2012).

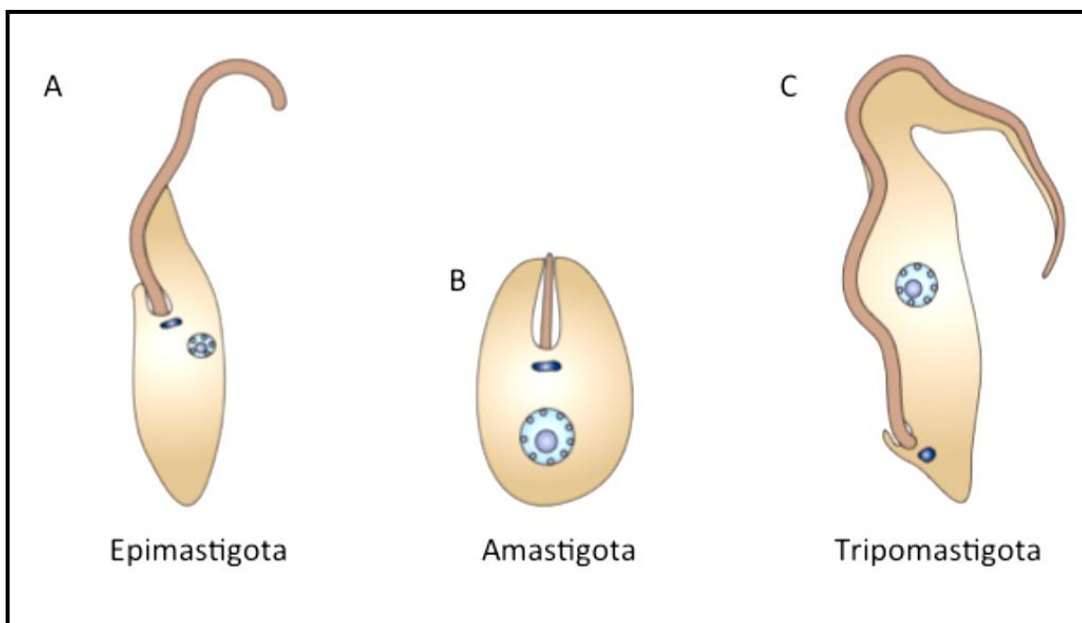


Figura 2. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Epimastigota extracelular replicativa no intestino do inseto-vetor; (B) Amastigota intracelular replicativa no hospedeiro vertebrado; (C) Tripomastigota. (Adaptado de Docampo *et al.*, 2005).

3. Ciclo Biológico

O ciclo de vida do *T. cruzi* é heteroxênico, alternando formas intracelulares e extracelulares entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Figura 3). Ao fazer o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, o vetor ingere formas tripomastigotas que, no intestino médio, se diferenciam em formas epimastigotas. O flagelado multiplica-se sob a forma epimastigota, as quais migram para o intestino posterior do vetor, aderem-se à mucosa e sofrem um processo de diferenciação, transformando-se em tripomastigotas metacíclicos. Após o repasto sanguíneo, o vetor libera em suas fezes as formas metacíclicas infectantes, que penetram a pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado (Rassi *et al.*, 2010; Machado *et al.* 2012; Texeira *et al.*, 2012).

Nos mamíferos, os flagelados invadem células do Sistema Fagocítico Monocitário (SFM), onde convertem-se para formas amastigotas e iniciam o ciclo de multiplicação intracelular. Após vários ciclos de reprodução assexuada, as amastigotas diferencia-se em tripomastigotas, que rompem as células e são liberadas no meio externo. Na circulação sanguínea, disseminam-se pelo organismo, parasitando qualquer célula nucleada, em especial células do sistema

reticuloendotelial, tecido muscular liso e estriado, células endoteliais e células do sistema nervoso periférico e central. O ciclo é completado quando o mamífero infectado é picado por outro triatomíneo, ingerindo novamente formas tripomastigotas circulantes, que chegam ao intestino do inseto (Neves, 2004; Machado *et al.*, 2012; Texeira *et al.*, 2012).

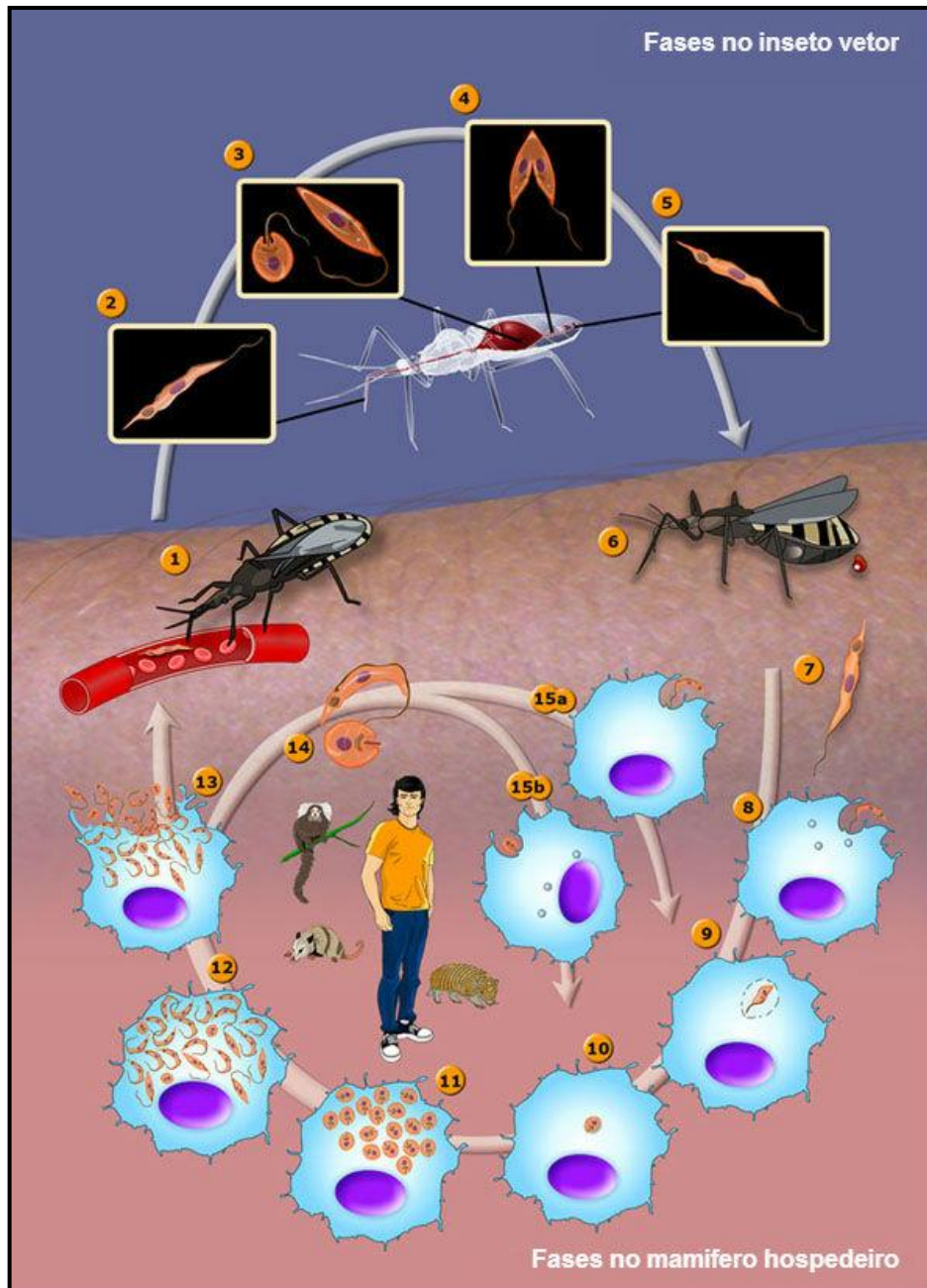


Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) O vetor ingere formas tripomastigotas do *T. cruzi* presentes no sangue periférico de mamíferos infectados. (2) Tripomastigotas (3) No intestino médio do inseto, se diferenciam em epimastigotas e algumas esferoastigotas. (4) Epimastigotas se multiplicam. (5) No intestino posterior se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas. (6) O inseto vetor libera em suas fezes formas tripomastigotas, perto do local do repasto sanguíneo. (7) Forma tripomastigota metacíclica. (8) Infectam macrófagos. (9) Tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. (10) Amastigotas evadem o vacúolo parasitóforo. (11) Multiplicação das amastigotas no citoplasma. (12) Amastigotas se diferenciam em tripomastigotas. (13) Tripomastigotas rompem as células e são liberadas no meio extracelular. (14) Formas amastigotas e tripomastigotas. (15) A. Tripomastigotas e B. Amastigotas, infectam macrófagos (Adaptado de Texeira *et al.*, 2012).

4. Manifestações clínicas

A DC tem a fase inicial aguda, a qual é iniciada logo após a inoculação do *T. cruzi* e pode durar semanas ou meses, sendo caracterizada por alta parasitemia. Na maioria dos casos, é assintomática, porém, quando sintomática, pode apresentar sinal de entrada (chagoma de inoculação ou sinal de Romana), febre generalizada, dores musculares e articulares. Ocasionalmente, miocardite, meningite e meningoencefalite, adenopatia, edema e hepatoesplenomegalia (Coura e Borges-Pereira, 2010).

Após três meses, a infecção segue para a fase crônica, com baixa parasitemia e inicialmente com ausência de manifestação clínica, sendo denominada fase indeterminada, onde a maioria dos indivíduos infectados possuem anticorpos contra o parasito na ausência dos sintomas. Porém, 1/3 das infecções na fase crônica podem evoluir para a DC sintomática, relacionadas com complicações graves e com a letalidade da doença. O coração é o principal órgão afetado. Os pacientes apresentam miocardiopatia associada a arritmias, insuficiência cardíaca e, frequentemente, morte súbita. Além disso, podem ocorrer graves distúrbios digestivos. As infecções crônicas cursam com escassez de parasitos no sangue e nos tecidos, ainda que a gravidade da doença seja reconhecida pelas taxas elevadas de morbidade e mortalidade (Texeira *et al.*, 2006; Haberland *et al.*, 2013).

5. Patogênese

A patogênese da DC é bastante complexa, são muitos mecanismos dependentes de numerosos fatores que interferem quantitativamente e qualitativamente na determinação e evolução da infecção, e por isso, não é claramente compreendida. Na fase aguda da infecção a imunidade humoral é eficaz ao ponto de reduzir drasticamente a parasitemia, porém ainda não existem relatos comprovados de uma cura espontânea. Na fase crônica, apesar da baixa parasitemia, ainda é observada a resposta imune humoral, que é comprovada em testes laboratoriais. Nesta fase, observa-se a presença de ninhos de amastigotas em apenas 20% dos chagásicos, não necessariamente relacionados à presença de infiltrados inflamatórios mononucleares associados à lise das células-alvo e

ocasionando alto índice de cardiopatia. As perguntas que vários autores fazem são: qual seria o fator que desencadeia o rompimento do equilíbrio da infecção, aparentemente observado na fase crônica? O que desencadeia a cardiopatia grave e/ou as megalias (megacólon e megaesôfago)? Várias teorias tentam explicar as lesões presentes na fase crônica da doença, entre elas estão à persistência do parasito e a autoimunidade (Teixeira *et al.*, 2006; Gironès *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2014).

A teoria da persistência do parasito está diretamente relacionada com a presença do *T. cruzi* no tecido de pacientes. As formas infectantes ao invadirem células do hospedeiro (macrófagos, células da neuroglia central e periférica, fibroblastos e células musculares estriadas e lisas), se transformam em amastigotas intracelulares que sofrem divisão binária, o que ocasiona a ruptura da célula. Quanto maior o número de parasito e células mortas, maior será a quantidade de antígenos parasitários liberados e de infiltrados inflamatórios, os quais são importantes para aumentar os efeitos tóxicos dos antígenos do parasito, intensificando a resposta imune do organismo. Porém essa teoria não explica a baixa letalidade nos pacientes com a Doença de Chagas Aguda (DCA) e também por que a maioria dos pacientes com a doença crônica não apresentam lesões (Higuchi *et al.*, 2003; Texeira *et al.*, 2006; Texeira *et al.*, 2011).

O primeiro relato da autoimunidade foi a constatação feita por Santos-Buch e Texeira (1974), que comprovaram a rejeição por linfócitos de células cardíacas de coelhos cronicamente infectados por *T. cruzi*. Os dados do estudo mostraram que as células de coelhos controles, não infectados, não eram destruídas por linfócitos, enquanto que as células dos infectados eram destruídas rapidamente. Outros autores relatam que a miosina cardíaca induz a proliferação de clones de células TCD4⁺, provenientes de infiltrados nas lesões cardíacas de chagásicos crônicos (Cunha Neto *et al.*, 1986). Ribeiro dos Santos *et al.* (1992) sugeriram a teoria da autoimunidade quando observou que enxertos de coração de camundongos geneticamente idênticos são destruídos por células do sistema imune de um receptor cronicamente infectado por *T. cruzi* enquanto que em camundongos não infectados não houve rejeição.

Outra vertente de estudo da autoimunidade é a possível reação cruzada entre epítomos do hospedeiro e antígenos do *T. cruzi*, o que levaria uma resposta imune contra o próprio tecido (Leon e Engman, 2006). Outra hipótese sugere que a DC possa ter origem na integração do DNA mitocondrial do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro, o que ocasionaria mutações relacionadas à patogênese (Teixeira *et al.*, 2012). Embora haja muitas teorias, ainda não está esclarecido os mecanismos que definem o desenvolvimento das lesões presentes na fase cônica da DC.

6. Diagnóstico

Para diagnóstico da DC, devem ser considerados antecedentes epidemiológicos e manifestações clínicas do paciente, e então ser confirmado pelo diagnóstico laboratorial, que pode ser realizado de acordo com a fase da infecção (Brenner *et al.*, 2000; Murcia *et al.*, 2013).

Na fase aguda, são priorizados testes parasitológicos para pesquisa do parasito no sangue periférico. Os exames parasitológicos mais utilizados para a pesquisa do parasito são o exame a fresco, gota espessa corada com Giemsa e microhematócrito. Para o diagnóstico na fase crônica da infecção, que apresenta baixa parasitemia, as prioridades são para testes com pesquisa indireta do parasito como xenodiagnóstico e hemocultura. Ambos os métodos apresentam limitações por serem de execução trabalhosa e demorada, e por apresentar baixa sensibilidade. Os testes sorológicos são rotineiramente empregados no diagnóstico da DC crônica, amplamente utilizados no diagnóstico clínico e em triagens de bancos de sangue. Os principais testes utilizados são imunofluorescência indireta (IFI), ensaios imunoenzimático (ELISA) e hemaglutinação indireta (HAI) (Brenner *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2012; Afonso *et al.*, 2012; Murcia *et al.*, 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que sejam feitos três testes sorológicos, e o diagnóstico positivo é dado quando dois desses testes forem reagentes para anticorpos anti-*T. cruzi*. Contudo, os testes sorológicos podem apresentar resultados falsos positivos ou duvidosos, devido às reações cruzadas com antígenos de outros parasitos presentes em pacientes com malária,

toxoplasmose, paracoccidiodomicose, leishmanioses e outras (Vexanat *et al.*, 1996; Luciano *et al.*, 2009; De Souza e Amato Neto, 2012; WHO, 2012).

Devido o alto índice de pacientes assintomáticos, o diagnóstico diferencial pode ser feito com a técnica de PCR, considerada um método complementar ao diagnóstico quando a sorologia para *T. cruzi* for inconclusiva. A técnica apresenta alta especificidade e sensibilidade se mantidos o padrão de qualidade dos reagentes. Os principais alvos utilizados na PCR são as regiões conservadas dos minicírculos de kDNA (Sturm *et al.*, 1989). Além disso, também são utilizados iniciadores que anelam em regiões repetitivas do genoma nuclear do *T. cruzi* (Moser *et al.*, 1989). As diferenças genéticas entre cepas do *T. cruzi*, relacionadas com a virulência e a suscetibilidade a resposta imune, podem ser consideradas como fator de restrição e explicar parcialmente a diferença de sensibilidade observada em estudos realizados em diferentes áreas endêmicas (Galvão *et al.*, 2003; Britto, 2009; Schijman *et al.*, 2011).

7. Tratamento

Após 105 anos da descoberta da DC, ainda se segue a suposição de quanto mais cedo for iniciado o tratamento específico maior são as chances de cura e benefícios clínicos para o indivíduo. Atualmente o tratamento da DC se restringe a apenas dois fármacos que se apresentam terapeuticamente eficazes contra a infecção por *T. cruzi*, são eles o Benznidazol e o Nifurtimox. Ambos apresentam boa eficiência quando utilizados durante a fase aguda da infecção, porém seu efeito diminui quando administrado na fase crônica, o que reduz drasticamente o índice de cura. No Brasil, a droga disponível é o Benznidazol. O MS preconiza o uso de 5 mg//Kg/dia (adultos) e 5 – 10 mg/Kg/dia (crianças) divididos em 2 a 3 doses diárias, durante 60 dias, sendo contra indicado para gestantes. E a terapia prolongada (aproximadamente 60 dias) causa inúmeros efeitos colaterais, o que leva a interrupção do tratamento em muitos casos (Brasil, 2010; Sathler-Avelar *et al.*, 2012; Albajar-Viñas e Dias, 2014).

8. Vias de Transmissão

8.1 Transmissão vetorial

A principal via de transmissão da infecção por *T. cruzi* se dá através da deposição de formas tripomastigotas metacíclicas, presentes nas fezes de insetos hematófagos conhecidos como barbeiros, na pele de hospedeiros mamíferos. Os barbeiros pertencem à família Reduviidae e subfamília Triatominae. Estima-se que existam 150 espécies de triatomíneos reconhecidas no mundo, 64 são encontradas no Brasil, mas poucas apresentam comportamentos sinantrópicos. O vetor mais importante da DC na América do Sul foi e ainda continua sendo o *Triatoma infestans*, que na década de 1970 teve um alcance estimado de 12 populosos estados brasileiros e grandes áreas da Bolívia, Peru, Chile, Argentina, Paraguai e Uruguai. Devido à sua grande distribuição, foi criado um projeto para os países do Cone Sul, onde foram implantados programas de prevenção e controle ao vetor com uso de inseticidas. Tal ação resultou na redução drástica de aproximadamente 94% da incidência de transmissão da doença nos países do Cone Sul (Noireau, 2009; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012; Justi *et al.*, 2014).

Apesar de o Brasil ter recebido, em 2006, o certificado de país livre da transmissão vetorial por *T. infestans*, há outras espécies de triatomíneos potencialmente capazes de transmitir o *T. cruzi*. As espécies mais capturadas nos programas de controle e monitoramento da DC no Brasil são: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*. O *Panstrongylus megistus* é uma espécie amplamente distribuída em todo Brasil, e apresenta capacidade de invadir e colonizar ambientes domiciliares, além de apresentar altos níveis de infecção por *T. cruzi*, tornando-a espécie de maior importância epidemiológica no Brasil, após o controle do *T. infestans*. A principal espécie encontrada nas regiões semi-áridas do nordeste do Brasil é a *Triatoma brasiliensis*, uma espécie nativa, encontrada em ambientes naturais podendo colonizar ambientes domiciliares após intervenções de controle. O *Triatoma maculata* na Venezuela é o segundo vetor mais importante e ocupa áreas no Brasil como o estado de Roraima e a região Amazônica brasileira, encontrado em galinheiros, áreas peridomiciliares e esporadicamente nas residências. Já o *Triatoma sordida* tem sua distribuição no Brasil desde o sul até o nordeste do país,

áreas onde o *Triatoma infestans* foi eliminado através do uso de inseticidas, sendo encontrado em maior parte em áreas peridomiciliares, em especial galinheiros (Costa *et al.*, 2002; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012; Vinhaes *et al.*, 2014; Coura, 2015).

As espécies *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* são triatomíneos predominantemente silvestres, que habitam diferentes espécies de palmeiras no Brasil. *Rhodnius neglectus* é considerado como vetor secundário na transmissão da DC, característico do cerrado brasileiro, com evidências de formações de colônias domiciliares nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás. A espécie *R. robustus* tem ampla distribuição na região amazônica, ocorrendo frequentemente em palmeiras, e apresentando altas taxas de infecção por tripanossomatídeos. Apresenta-se como potencial vetor extradomiciliar, podendo ainda contaminar equipamentos de processamento de alimentos (Barreto-Santana *et al.*, 2011).

8.2 Transmissão oral

O primeiro relato de casos de infecção aguda da DC transmitido pela via oral foi em 1965, em Teutônia no Rio Grande do Sul. O autor descreveu o caso de 17 indivíduos que apresentavam a DCA, identificando, mediante a análise histológica, a presença de ninhos de amastigotas no músculo cardíaco. A transmissão pela via oral ocorreu pela ingestão de verduras contaminadas com secreções de animais infectados por *T. cruzi*. Outros autores descreveram estudos clínicos de indivíduos que apresentavam a DCA, semelhantes aos casos relatados em Teutônia, porém as fontes da infecção foram atribuídas a outros alimentos como o caldo da cana de açúcar, açaí e carnes de animais mal cozidas (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991; Toso *et al.*, 2011; Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012).

Em 2005, um surto de DCA no sul do Brasil deu maior destaque à questão da transmissão oral do *T. cruzi*. Neste episódio, foram notificados ao Ministério da Saúde 45 casos da DCA ocasionados pela ingestão de caldo de cana de açúcar contaminado. Microepidemias têm sido descritas desde 2006 na região norte do Pará com a ingestão de açaí contaminado com fezes ou com o próprio triatomíneo infectado (Dias *et al.*, 2013; Nóbrega *et al.*, 2009; Noya *et al.*, 2010).

Surtos da transmissão oral do *T. cruzi* foram relatados na Venezuela e na Colômbia, sendo esses relacionados, em sua grande parte, ao consumo de sucos de goiaba, laranja e tangerina, provavelmente contaminados com fezes de triatomíneos, visto que na maioria dos estudos os vetores não foram identificados dentro do domicílio desses indivíduos. A transmissão oral vem surgindo em áreas onde programas de prevenção e controle, ao vetor, obtiveram sucesso e em áreas sem histórico de transmissão do parasito (Dias, 2006; Rueda *et al.*, 2014).

8.3 Transmissão congênita

Desde 1911, Carlos Chagas levantou a suspeita da transmissão congênita do *T. cruzi*, porém a confirmação dessa via só foi realizada posteriormente em estudos experimentais com animais que acasalavam na fase aguda e crônica da infecção. O primeiro caso humano da DC congênita foi descrito em 1949 por Dao. Com esse relato, uma série de outros trabalhos foram publicados referentes à transmissão congênita do *T. cruzi*. A transmissão transplacentária na DC se dá tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção. Entretanto, estudos realizados com gestantes revelaram que a presença da infecção na placenta nem sempre está relacionada com a infecção do feto ou recém-nascido (Moya e Moretti, 1997; Moretti *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2009).

Esta via de infecção causa preocupação em todo mundo devido à migração de pessoas provenientes de países da América Latina, onde a DC é endêmica, para outros países. Estudos estimam que existam cerca de 40 mil mulheres grávidas com risco potencial de transmissão do *T. cruzi* para 2000 recém-nascidos, no Canadá, México e Estados Unidos. A transmissão congênita pode resultar em parto prematuro, baixo peso do recém-nascido, natimortos e manifestações clínicas da doença no nascimento, sendo a hepatoesplenomegalia a manifestação mais comum (Howard *et al.*, 2014; Martins-Melo *et al.*, 2014).

O diagnóstico para transmissão congênita pode ser realizado pela detecção do parasito no sangue do cordão umbilical ou no sangue periférico do recém-nascido, porém, devido à baixa parasitemia, esse tipo de diagnóstico não é muito utilizado. Métodos sorológicos para pesquisa de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* de origem não materna são recomendados após nove meses de vida da criança.

Após esse período, os anticorpos maternos desaparecem e o diagnóstico sorológico convencional pode ser utilizado para identificar anticorpos específicos do recém-nascido. Métodos moleculares mais específicos como a PCR têm sido empregados com sucesso e poderão se tornar padrão ouro para o diagnóstico da infecção congênita, uma vez que é possível a detecção do DNA do parasito no sangue periférico logo após o nascimento da criança. A amplificação do DNA do parasito já é considerada pela OMS em casos onde a parasitemia é baixa, como os casos congênitos (Cevallos e Hernández, 2014; Norman e López-Vélez, 2014; Carlier *et al.*, 2015).

8.4 Transmissão transfusional

A transmissão transfusional do *T. cruzi* foi confirmada pela primeira vez em 1952 por Freitas *et al.*, e ganhou grande importância em centros urbanos, onde a migração da população rural para cidade promoveu o aumento do número de doadores de sangue chagásicos. Na década de 1970, a alta prevalência de indivíduos chagásicos nos centros urbanos e a falta de programas de controle, fez que a transmissão transfusional do *T. cruzi* fosse responsável por aproximadamente 20 mil novos casos da doença no Brasil. Ao longo das décadas de 1980 e 1990, a ação dos programas de controle e prevenção ao vetor *Triatoma infestans* em países do Cone Sul, como o Brasil, fez com que o aparecimento de novos casos humanos da doença fosse decorrente, principalmente, da via transfusional (Freitas *et al.*, 1952; Dias, 1992; Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011).

A transmissão pela transfusão sanguínea é umas das principais vias em países não endêmicos, devido ao movimento migratório significativo de pessoas da América Latina. No Canadá e Estados Unidos, estão documentados vários casos da DC por transfusão e, na Espanha, foram descritos pelo menos três casos. Nesses países e até mesmo em países endêmicos, a real ocorrência da transmissão pela transfusão de sangue não é conhecida, já que, em muitos casos, a infecção passa despercebida ou o *T. cruzi* não é identificado como agente das manifestações clínicas, além de não ser obrigatória uma notificação dos casos associados à transfusão (Pereira *et al.*, 2011; Fearon *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2013).

Considerando a resistência do parasito em condições de armazenamento do sangue e seus componentes, ele pode sobreviver aproximadamente 18 dias a 4 °C. Condições de congelamento e descongelamento foram implementados em programas de prevenção a transmissão do *T. cruzi* em bancos de sangue, bem como a triagem dos doadores através de entrevistas e testes sorológicos, o que diminuiu a incidência da transmissão pela via transfusional no Cone Sul. Contudo, muitos países endêmicos ainda não iniciaram programas de controle em relação aos doadores. Estados Unidos, Espanha e países da Ásia, Europa e Oceania, considerados não endêmicos, também não implementaram programas de triagem de doadores e testes para detecção da DC, já que recebem com frequência milhares de imigrantes, de áreas endêmicas, infectados pelo *T. cruzi* (Castro, 2009; Coura, 2015).

8.5 Transmissão por transplante de órgãos

A inexperiência e a incapacidade de identificação da DC antes do transplante cardíaco vêm contribuindo para surgimento de novos casos. O diagnóstico da DC antes do transplante de órgãos é extremamente importante, pois o coração é um importante reservatório para o *T. cruzi* em pessoas com a infecção crônica. Uma vigilância especial torna-se necessária, e já é realizada antes do transplante de órgãos sólidos, em países endêmicos que realizam transplante cardíaco, como Brasil, Argentina, Colômbia, Chile, México, Uruguai, Peru e Equador (Cura *et al.*, 2013; Huprikar *et al.*, 2013; Kransdorf *et al.*, 2014).

8.6 Transmissão sexual

A transmissão sexual da infecção pelo *T. cruzi* ainda é pouco estudada, mas desde sua descoberta, Carlos Chagas já havia anunciado a possibilidade de transmissão do *T. cruzi* pela via sexual. Em 1911, Vianna, observou em análises histopatológicas de cobaias infectadas pelo *T. cruzi*, ninhos de amastigotas no túbulo seminífero e no epidídimo, sendo a camada basal a mais infectada. O autor sugeriu que assim como elementos normais do hospedeiro, os parasitos também poderiam se desprender da parede e invadir a luz tubular, e, dessa maneira, serem carregados pelo líquido espermático. Posteriormente Teixeira (1970) verificou a presença de ninhos de amastigotas em células de gonioplastos de túbulos

seminíferos dos testículos e em células da teca dos ovários, de um menino de 18 meses de idade e uma menina de 4 meses de idade, que haviam sucumbido à DCA. Também já foi sugerido que a infecção poderia ser transmitida na relação sexual entre uma mulher infectada para homem suscetível, durante o período menstrual (Dias, 1979; Dias *et al.*, 2011).

Outros trabalhos descrevem a colonização do trato urogenital de cobaias pelo *T. cruzi*. Em 1986, Gonçalves da Costa *et al.*, realizaram experimentos com camundongos e verificaram a presença elevada de parasitos nos ovários e testículos, destacando que as células do sistema reprodutor masculino, células intersticiais e túnica albugínea dos túbulos seminíferos, foram altamente colonizadas pelo parasito. Carvalho *et al.* (1991) observaram a presença do *T. cruzi* no lúmen do ducto epididimal de camundongos infectados. Carvalho *et al.* em 2009, verificaram a presença de formas amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma de células mióides de túbulos seminíferos, no compartimento basal da células de Sertoli e na pele do escroto, próxima das glândulas sebáceas, de camundongos com as infecções agudas pelo *T. cruzi*. Esses dados sugerem que a contração e a ruptura de células mióides infectadas pelas formas amastigotas do protozoário facilitem a migração de formas infectantes do parasito para dentro dos ductos seminíferos.

Com o intuito de avaliar a transmissão do *T. cruzi* pelo sêmen, Alencar *et al.* (1991) inocularam camundongos com sêmen proveniente de animais infectados, e os resultados revelaram o percentual de 91,3 % de infectividade. Na análise histopatológica dos corações, 77% dos animais apresentavam ninhos de amastigotas e evidências de miocardite. Em um segundo experimento, foi realizado a introdução de sêmen e sangue infectados sobre a mucosa vaginal de camundongos. Além da miocardite, ambos os grupos, apresentaram ninhos de amastigotas em 100% dos animais. Em 2010, Hecht *et al.* observaram a presença do DNA nuclear de *T. cruzi* em sêmen humano de indivíduos com a DC.

Lenzi *et al.* (1996 e 1998) investigaram a invasão de estruturas do sistema reprodutor masculino e feminino pelo *T. cruzi* e descreveram a presença do parasito na vagina, útero, teca do ovário, mesovário, epidídimo, células de Leydig, vesícula seminal, ductos deferentes, próstata e uretra de animais infectados, observando que estruturas do sistema reprodutor masculino foram mais intensamente parasitadas do

que o feminino. Outros autores sugerem que a transmissão sexual do *T. cruzi* ocorra mediante o acasalamento devido à capacidade do parasito de ultrapassar a membrana vulvovaginal e às glândulas da mucosa do pênis não representarem uma barreira absoluta, devido sua fragilidade, erosões frequentes e microfissuras (Storino e Jorg, 1994).

Cabrine-Santos *et al.* (2003) concluíram que estruturas do aparelho geniturinário de hamsters podem ser infectadas tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*. Em estudo realizado por Silva, em 2013, camundongos na fase aguda da infecção por *T. cruzi* foram colocados para acasalar com camundongos saudáveis. Os resultados dos testes sorológicos, após o acasalamento, identificou a presença de anticorpos específicos em 100% das fêmeas inicialmente saudáveis e em 40% dos machos inicialmente saudáveis. Já nos testes moleculares, após o acasalamento, 100% dos animais saudáveis, machos e fêmeas, apresentaram o DNA nuclear do parasito no sangue. Ao realizar a análise histopatológica, o autor observou ninhos de amastigotas nos testículos de camundongos infectados, fato que chamou atenção, pois no coração desses mesmos animais foi observado poucos parasitos, sugerindo um tropismo do *T. cruzi* pelos órgãos sexuais. O estudo, portanto, comprovou a transmissão sexual do *T. cruzi*, em camundongos, durante a fase aguda da infecção.

II. JUSTIFICATIVA

Estima-se que, no mundo, mais de 1 milhão de pessoas adquirem uma infecção transmitida sexualmente a cada dia. E que, cada ano, 500 milhões de pessoas possam adquirir uma das quatro seguintes infecções sexualmente transmitidas: clamídia, gonorreia, sífilis e tricomoníase (WHO, 2013; Siracusano *et al.*, 2014). Doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) podem ser causadas por vários microrganismos, como vírus, bactérias, fungos e protozoários. Dentre esse último grupo, o *Trichomonas vaginalis* se apresenta como o principal agente infeccioso transmitido sexualmente. Contudo, já foi descrita a transmissão sexual de outros protozoários. Embora a transmissão sexual do *T. cruzi* já tenha sido sugerida pelo próprio Carlos Chagas há mais de 100 anos, poucos trabalhos científicos foram realizados sobre este tema até o momento. Dessa forma, consideramos imprescindível a expansão de pesquisas experimentais e estudos epidemiológicos que definam qual a importância real dessa via de transmissão da DC, e que favoreçam o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção mais eficientes.

Diante do exposto, a nossa pesquisa teve como propósito elucidar questões como: a transmissão por via sexual do *T. cruzi* pode ocorrer durante o período crônico da doença? A transmissão sexual diminui significativamente durante a fase crônica, em razão da baixa parasitemia? Machos e fêmeas transmitem a doença nas mesmas proporções?

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar a transmissão sexual das infecções crônicas por *Trypanosoma cruzi*, clinicamente assintomáticas, em camundongos.

2. Objetivos Específicos

- Verificar a presença do parasito no sangue e nos tecidos dos animais infectados e seus parceiros sexuais por testes parasitológicos;
- Identificar anticorpos específicos contra o *T. cruzi* no soro dos animais infectados e seus parceiros sexuais;
- Identificar e quantificar o DNA de *T. cruzi* presente no sangue e tecidos dos animais infectados e seus parceiros sexuais;
- Realizar a análise histopatológica de tecidos dos animais infectados e seus parceiros sexuais;
- Demonstrar a transmissão congênita do *T. cruzi* para os filhotes nascidos de mães que adquiriram a infecção pelavia sexual.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Grupos Experimentais

Para a formação dos casais que participaram dos experimentos de transmissão sexual, foram utilizados 24 camundongos do tipo BALB/c com 30 dias de idade, distribuídos em 4 grupos: o grupo A foi formado por 1 fêmea não infectada e 1 macho não infectado, que serviram como controle negativo; o grupo B foi formado por 1 macho infectado e 1 fêmea infectada, intraperitonealmente, constituindo controle positivo; o grupo C foi composto por 5 machos infectados intraperitonealmente e 5 fêmeas não infectadas; e o grupo D foi formado por 5 fêmeas infectadas intraperitonealmente e 5 machos não infectados. Além desses quatro grupos experimentais também foi realizada a análise dos filhotes oriundos do cruzamento dos animais do grupo C, que constituiu o grupo E composto por 26 animais (Figura 4).

A utilização dos camundongos nesta pesquisa foi devidamente autorizada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA - FM) da Universidade de Brasília, com o número de Protocolo 10411/2011 (Anexo A).

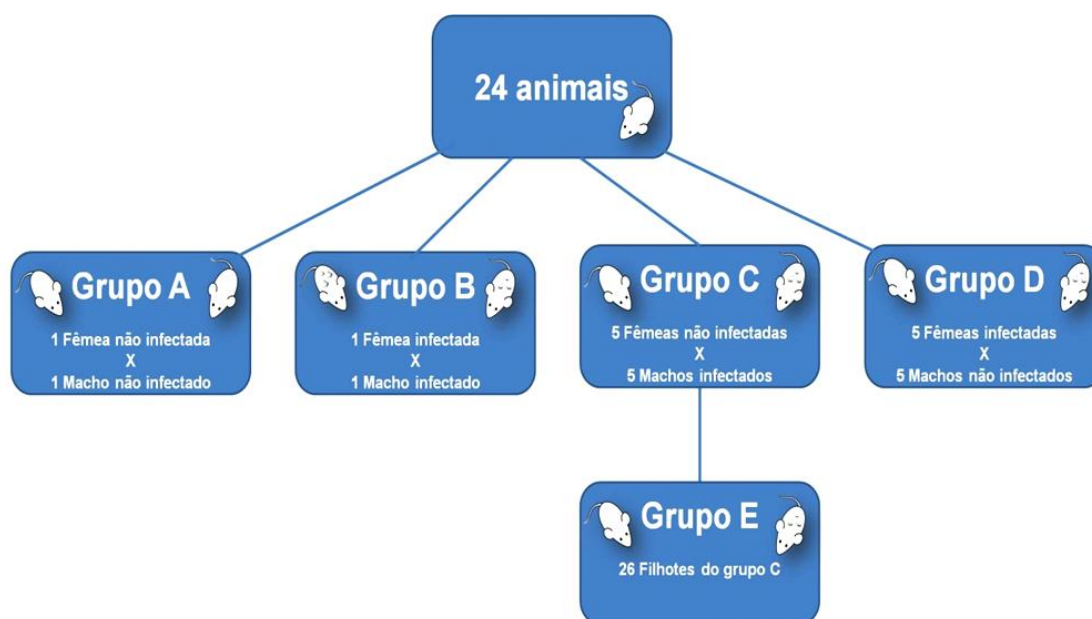


Figura 4. Distribuição dos animais nos grupos experimentais. O diagrama representa a quantidade de animais infectados e não infectados pertencentes a cada grupo experimental.

2. Cruzamento dos camundongos

Os animais foram mantidos separados, um animal por gaiola, após 3 meses (90 dias) da inoculação do *Trypanosoma cruzi*, pela via intraperitoneal, os camundongos foram colocados para cruzamento. Após a gravidez as fêmeas eram separadas dos machos, ficando um animal por gaiola novamente. Todos os casais foram alojados em gaiolas que foram mantidas em caixas de contenções, com 53,5 cm de comprimento, 35,5 cm de largura e 20,5 cm de altura.

3. Cultura do *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, da linhagem Berenice, foram mantidas em cultura de células musculares murinas da linhagem L6, cultivadas com Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DME) Sigma-Aldrich®, pH 7,4 acrescido de Soro Fetal Bovino (SFB) a 5%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, adicionado 3,7g de bicarbonato de sódio [7,5% p/v], sob atmosfera de CO₂ a 5%, a 37 °C. O número de parasitos no sobrenadante foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, diluído em solução salina 0,9% e ajustado para inoculação.

4. Infecção dos camundongos

Camundongos machos e fêmeas BALB/C, do alojamento de animais da Faculdade de Medicina da UnB, pesando em média 23 g, foram infectados com 100 µL de salina contendo 10³ formas tripomastigotas de *T. cruzi*, pela via intraperitoneal.

5. Pesquisa a fresco do *Trypanosoma cruzi*

A pesquisa do parasito em sangue periférico dos camundongos foi realizada a partir da coleta de 50 µL de sangue, da cauda dos animais. A presença de parasitos no sangue foi analisada após 7 dias da infecção. A contagem utilizou 5 mm³ de sangue e foi realizado em 50 campos com aumento de 400x em microscópio ótico de acordo com a metodologia descrita por Brener (1962).

6. Esfregaço sanguíneo

Os esfregaços foram realizados com 50 µL de sangue periférico proveniente da cauda dos camundongos. Utilizando uma lâmina extensora, o sangue foi estendido em lâminas previamente limpas e desengorduradas, fixados com solução de álcool metílico e coradas com Giemsa. As extensões foram analisadas por microscopia óptica (aumento de 1000x), avaliando a presença ou ausência de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

7. Hemocultura

A hemocultura foi realizada segundo a técnica descrita por Chiari *et al.*, 1989, aplicadas algumas modificações devido ao pequeno volume de sangue coletado dos camundongos, por punção intracardíaca. O sangue dos camundongos (50 µL) foi colocado em tubos contendo ágar sangue à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se mais 3 mL de meio LIT a cada um dos tubos. As análises das hemoculturas foram feitas a cada 15 dias por 365 dias. Cerca de 50 µL de sangue foi colocado em uma lâmina e observado em microscópio no aumento de 400X.

8. Imunodiagnóstico

8.1 Amostra

Os soros dos camundongos foram obtidos a partir de 200 µL de sangue, coletados sem anticoagulante e armazenados em 50% de glicerol, mantidos a – 20 °C. Posteriormente, as amostras foram analisadas quanto à presença de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* utilizando testes de imunofluorescência indireta e ELISA.

8.2 Preparação de antígenos de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, estoque Berenice, cultivadas em meio LIT, foram suplementadas com 10% de SFB (Cultilab, Campinas- BR) e 40 µg/mL de gentamicina. O cultivo dos parasitos foi feito a temperatura de 28 °C. A colheita dos flagelados foi realizada na fase exponencial de crescimento, por centrifugação a 1500 g por 15 min a 4 °C. Posteriormente, os parasitos foram lavados três vezes

com PBS pH 7,4 por igual período e ressuspensas em 2 mL de água Milli-Q. Em seguida, os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento a -20 °C/ descongelamento a 37 °C. Após os ciclos de congelamento/descongelamento, foi realizada a quantificação das proteínas presentes no extrato antigênico. Microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com 0,2µg/poço do parasito de antígenos não purificados de *T. cruzi* diluídos em PBS pH 7,4 em um volume de 50µL/poço. As placas sensibilizadas foram incubadas no período de 18 horas a 4 °C em câmara úmida. O excesso do antígeno foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4 contendo 0,05% de *Tween-20* (PBS-T). Para bloquear os sítios de adesão livres de proteínas que ainda existiam na superfície dos poços, foram adicionados 100µL/poço de PBS/Leite 5%. Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas a 37 °C em câmara úmida. Após este período as placas foram lavadas novamente com PBS-T. Ao término da lavagem, as placas foram imediatamente envolvidas em papel alumínio e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

Para a realização dos testes de imunofluorescência indireta, após a centrifugação a 1500 g por 15 min a 4 °C, as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram lavadas três vezes com PBS 1X, pH 7,4 por igual período e ressuspensas em 2 mL de paraformaldeído (3,7%). Após os períodos de lavagem, os parasitos foram ressuspensos em PBS pH 7,4, de maneira a obter uma concentração de aproximadamente 30 parasitos por campo. Essa quantidade de parasitos em suspensão foi posta nas lâminas de microscopia demarcadas e desengorduradas. Depois de secas ao ar livre, as lâminas foram embrulhadas com papel alumínio e guardadas a -20 °C até o momento do uso (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

8.3 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Incubação com anticorpo primário: Com intuito de detectar anticorpos específicos, os soros dos camundongos foram diluídos 2: 100 em PBS/leite desnatado 2% e adicionados à placa (50 µL/poço, em triplicata). Após incubação por 1 hora e 30 min a 37 °C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Em cada placa, os soros controles positivos e negativos foram incluídos nas mesmas condições. Para controle dos reagentes, foram colocados apenas PBS/leite desnatado 2% (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

Incubação com anticorpo secundário (anti-IgG) e revelação de imunocomplexos: O conjugado previamente testado e titulado, composto por anticorpos anti-IgG de camundongo marcado com Peroxidase (Sigma) foi diluído 1: 5000 em PBS/leite desnatado 2% e adicionado à placa (50 µL/poço). Após incubação por mais 1 hora e 30 min a 37 °C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e novamente as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000). A revelação dos imunocomplexos foi feita pela adição (50 µL/poço) do substrato, O-Phenylenediamine tablets - OPD (Sigma), em tampão citrato pH 5,0 e H₂O₂. Após o desenvolvimento da reação cromógena por 10 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, foi feita leitura em espectrofotômetro (BioTeK- Synergy HT) a 490 nm.

Incubação com anticorpo secundário (anti-IgM) e revelação de imunocomplexos: O conjugado previamente testado e titulado, composto por anticorpos anti-IgM de camundongo marcado com fosfatase (Sigma) foi diluído 1: 1000 em PBS/leite desnatado 2% e adicionado à placa (50 µL/poço). Após incubação por mais 1 hora e 30 min a 37 °C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e novamente as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000). A revelação dos imunocomplexos foi realizada pela adição (50 µL/poço) do substrato p-nitrofenol fosfato (Sigma) em tampão de dietanolamina. Após o desenvolvimento da reação cromógena por 30 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, foi feita leitura em espectrofotômetro (BioTeK- Synergy HT) a 405 nm.

O ponto de corte foi calculado a partir da soma das médias dos controles negativos com o triplo do desvio padrão das amostras (Nybo, 2010). A análise quantitativa foi realizada por regressão linear. Uma curva padrão com os DOs dos controles, que foi utilizada para determinar a quantidade de anticorpo em cada amostra. Foram considerados: não reagente < 0,9; reagentes ≥ 1,1 e indeterminado entre 0,9 – 1,0.

8.4 Imunofluorescência Indireta

Os soros dos camundongos foram diluídos e titulados de modo seriado (1: 20 a 1: 360) em PBS pH 7,4. Foram colocados 15 µl das diluições nas lâminas com

parasito fixado. Após incubação de 40 min a 37 °C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e as lâminas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4. As mesmas foram colocadas para secagem à temperatura ambiente. Depois, adicionou-se o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína (Sigma), diluído 1: 200 em PBS pH 7,4 e Azul de Evans 0,01%. As lâminas foram incubadas 40 min a 37 °C, em câmara úmida. Logo após, o excesso foi retirado e as mesmas foram lavadas, três vezes, com PBS pH 7,4. Depois de secas à temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com lamínulas, sobre glicerina tamponada, pH 7,9. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (*Olympus*® DP76 U-TVO-63XC), cuja luz ultravioleta ativa o isotiocianato de fluoresceína presente apenas nos parasitos com anticorpos ligados na membrana. Uma amostra era considerada positiva pela fluorescência verde brilhante obtida em títulos $\geq 1: 40$ nas infecções pelo *T. cruzi* (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

9. Extração de DNA

9.1 Extração de DNA total do *T. cruzi*

O DNA do *T. cruzi* foi extraído a partir de formas epimastigotas crescidas em meio LIT e colhidas por centrifugação a 1500 x g por 15 min. O sedimento foi lavado com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl), por duas vezes nas mesmas condições de centrifugação, ressuspenso em tampão de lise (na concentração de 5×10^7 células/mL, acrescido de Proteinase K), e incubado a 37 °C por 12 horas. Após a incubação, o DNA foi purificado com duas extrações com clorofane (fenol: clorofórmio: ácido isoamílico, proporção 25: 24: 1) e uma extração com clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, proporção 24: 1). O DNA foi precipitado com 2,5 V de etanol absoluto gelado e 1/10 V de acetato de sódio 3,0 M, pH 4,7. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com etanol a 70% gelado, secado à temperatura ambiente e ressuspenso em tampão Tris-EDTA (TE) (10M Tris-HCl pH 8,0 e 1 M EDTA pH 8,0) e 1 μ L de Ribonuclease A (RNase) 200 μ g/mL, ficando incubados a 37 °C por 24 horas. O DNA total do *T. cruzi* foi quantificado e guardado a – 20 °C até o momento do uso.

9.2 Extração de DNA de sangue

Foram coletados 300 µL de sangue para a extração de DNA com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Foram acrescentadas às amostras 900 µL de solução de lise para células vermelhas, incubado por 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 2000 x g por 10 min. Após ressuspender o *pellet*, foi adicionado 300 µL do tampão de lise nuclear e RNase (concentração final 20 µg/mL), misturando o lisado por inversão e incubado à 37 °C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão de precipitação de proteína, homogeneizado em vórtex por 20 segundos e centrifugado a 2000 x g por 10 min. A precipitação do DNA foi através da transferência do sobrenadante para eppendorf contendo 300 µL de isopropanol, misturando por inversão e centrifugando a 2000 x g por 1 minuto. A lavagem do *pellet* de DNA foi realizada com 300 µL de etanol 70% centrifugação a 2000 x g por 1 minuto. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente *overnight* e reidratado com 100 µL de TE. Após a extração o DNA foi quantificado e mantido a – 20 °C até o momento do uso.

9.3 Coleta de tecidos e extração de DNA

Coletaram-se amostras de tecidos do coração, intestino, ovário e testículo de todos os camundongos. A coleta dos tecidos dos camundongos tinham duas finalidades: testes histológicos e extração de DNA. Os tecidos coletados para histologia foram fixados em formol a 10% e emblocados em parafina para análise histopatológica. Os tecidos para extração de DNA eram macerados e suspensos em 1 mL de tampão de extração com proteinase K (100µg/mL), ficando incubado a 37 °C por 12h. A extração do DNA dos diferentes tecidos foi realizada pelo mesmo método de extração descrito por Sambrook, 1989.

Resumidamente, o material foi submetido a duas extrações com igual volume de clorofane e uma extração com igual volume de clorofil. A separação da fase orgânica da aquosa foi feita por centrifugação a 5000 g x por 15 min. A partir desta etapa, o DNA foi precipitado em 5 V de etanol 100% gelado e incubação de 12h a - 80 °C. Depois desse período, o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado, secado e ressuspenso em 500 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) e RNase (200µg/mL). Após incubação de 12h a 37°C, os DNAs foram estocados a -20°C.

9.4 Quantificação e análise qualitativa do DNA

As amostras de DNA foram quantificadas no aparelho Nanovue (GE life science). A qualidade do DNA extraído foi testada a partir de PCR utilizando *primers* para o gene da β -actina e a visualização dos produtos amplificados foi feita pela eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 0,8%, corado com Brometo de Etídio 0,5 mg/mL, em tampão TAE (Tris acetato 90 mM pH 8,0; EDTA 25 mM).

10. Diagnóstico molecular

10.1 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A presença de infecção subclínica pelo *T. cruzi* foi investigada em todos os grupos experimentais para a confirmação da transmissão sexual. Para isso, foi empregada a reação de PCR com *primers* específicos para o DNA nuclear (nDNA) do parasito. As sequências dos *primers* utilizados para a amplificação nDNA do *T. cruzi* foram: PON 1 (5' TGG CTT GGA GGA GTT ATT GT 3') e PON 2 (5' AGG AGT GAC GGT TGA TCA GT 3'). Estes iniciadores amplificam regiões repetitivas do genoma do parasito e geram uma banda de aproximadamente 250 pares de base (pb) (Requena *et al.*, 1992).

A amplificação foi realizada em triplicata, de acordo com protocolos de padronização descritos pelo laboratório, e seguiram as seguintes condições: 200 ng de DNA genômico, tampão de reação da Invitrogen 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl); 2 mM MgCl₂; 0,2 μ M de cada *primer*; 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE) e 1,5 unidades *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Foram incluídos os devidos controles: branco (sem DNA), controle negativos e positivos, que consistiam, respectivamente, de DNA de camundongo não infectado e de camundongo infectado, e controle com 100 pg de DNA de *T. cruzi*. As reações foram realizadas no termociclador BIO-RAD *MyCycler™*, e seguiram o seguinte programa:

95 °C / 5 min
 35 x { 95 °C / 30 seg
 57 °C / 1 min
 72 °C / 1 min
 72 °C / 5 min
 4 °C ...

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio 0,5mg/mL, em tampão TAE (Tris acetato 90 mM pH 8,0; EDTA 25 mM).

10.2 *Nested* PCR

Foi realizada uma *Nested* PCR para a confirmação dos resultados obtidos na PCR com os *primers* PON1/2. A reação constituiu de uma etapa de pré-amplificação do DNA alvo, utilizando *primers* com as seguintes sequências: TCZ 1 (5' CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT 3') e TCZ 2 (5' CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG 3'). Estes iniciadores também amplificam regiões repetitivas do nDNA do parasito e geram um produto de aproximadamente 188 pb (Moser *et al.*, 1989).

Além dos 200 ng das amostras, foram utilizados um controle branco (sem DNA), controle negativo (com 200 ng de DNA de um camundongo não infectado), controle positivo (com 200 ng de DNA de um camundongo infectado), e controle com 100pg de DNA total de *T. cruzi*. A PCR foi realizada nas seguintes condições: tampão de reação 10 X para PCR da Invitrogen (20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂; 0,25 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação seguiu o seguinte programa:

95 °C / 5 min
 25 x { 95 °C / 30 seg
 68 °C / 1 min
 72 °C / 1 min
 72 °C / 5 min
 4 °C ...

Após a etapa de pré-amplificação, foi realizada segunda PCR para reamplificação dos produtos da PCR TCZ 1/2, utilizando *primers*, mais internos TCZ 3 (5' TGC ACT CGG CTG ATC GTT T 3') e TCZ 4 (5' ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA 3'). Esse par de iniciadores geram um produto de aproximadamente 168 pb (Ndao *et al.*, 2000).

Foram utilizados 2µL do produto da primeira PCR, branco (sem DNA), controle negativo (100 ng DNA de camundongo negativo), controle positivo (100 ng do DNA de camundongo positivo) e controle com 100pg de DNA do *T. cruzi*. A PCR seguiu as seguintes condições: tampão de reação 10 X para PCR da Invitrogen (20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl); 2 mM de MgCl₂; 0,5µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação seguiu o seguinte programa:

95 °C / 5 min
 25 x { 95 °C / 40 seg
 68 °C / 40 seg
 72 °C / 30 seg
 72 °C / 7 min
 4 °C ...

As ampliações foram realizadas em triplicata de acordo com protocolos de padronização descritos pelo laboratório. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,3%, corado com Brometo de Etídeo.

10.3 *Nested* qPCR

Para a quantificação do DNA do *T. cruzi* no sangue e tecidos dos camundongos, foi utilizada a *Nested* PCR para aumentar a quantidade e a especificidade dos produtos amplificados. Nesta técnica a *Nested* PCR foi combinada com a PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Em primeiro momento, foi realizado uma PCR utilizando *primers* TCZ 1 e TCZ 2 nas seguintes condições: 100 ng de DNA genômico, tampão de reação da Invitrogen 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl); 3 mM MgCl₂; 0,1µM de cada *primer*; 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE) e 1,5 unidades *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Foram incluídos o branco (sem DNA) e os devidos controles negativo (100 ng de DNA de camundongo negativo) e positivo (100 ng do DNA de camundongo positivo), além do controle com 100 pg de DNA de *T. cruzi*. As reações foram realizadas no termociclador *MyCycle Thermocycler* (Bio Rad Laboratoires, CA,USA), e seguiram o seguinte abaixo:

95 °C / 5 min

18 x { 95 °C / 30 seg
68 °C / 1 min
72 °C / 1 min

72 °C / 5 min

4 °C ...

Após o primeiro ciclo de PCR, os produtos foram diluídos em água ultrapura (Milli-Q) (1:40) e 2µL da diluição foram usados como molde para a qPCR, adicionando-se 0,2µM de TcZ 3 e 0,2 µM de TcZ 4 e 10 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20 µL. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços usando o termociclador

7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) com as seguintes condições de amplificação:

50 °C / 10 min
95 °C / 10 min
40 x { 95 °C / 10 seg
57 °C / 15 seg
72 °C / 30 seg

Os resultados foram calculados em função do número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectada. Este ponto é chamado de Cq (do inglês *quantification cycle*). Uma curva padrão para quantificação absoluta das amostras foi criada a partir dos valores de Cq de diferentes concentrações de DNA de *T. cruzi* (o eixo “x” corresponde ao log da concentração de DNA, e o eixo “y” aos valores de Cq) (Figura 5). Desta forma, para a geração da curva, diluições seriadas de DNA do parasito (1: 10) foram realizadas para obtenção de amostras contendo 10^2 a 10^{-4} parasitos/mL. A eficiência da curva foi de 90,6% ($y = - 3,57$, $R^2 = 0,99$). A curva padrão foi salva e usada para a quantificação de todas as *Nested-qPCR*.

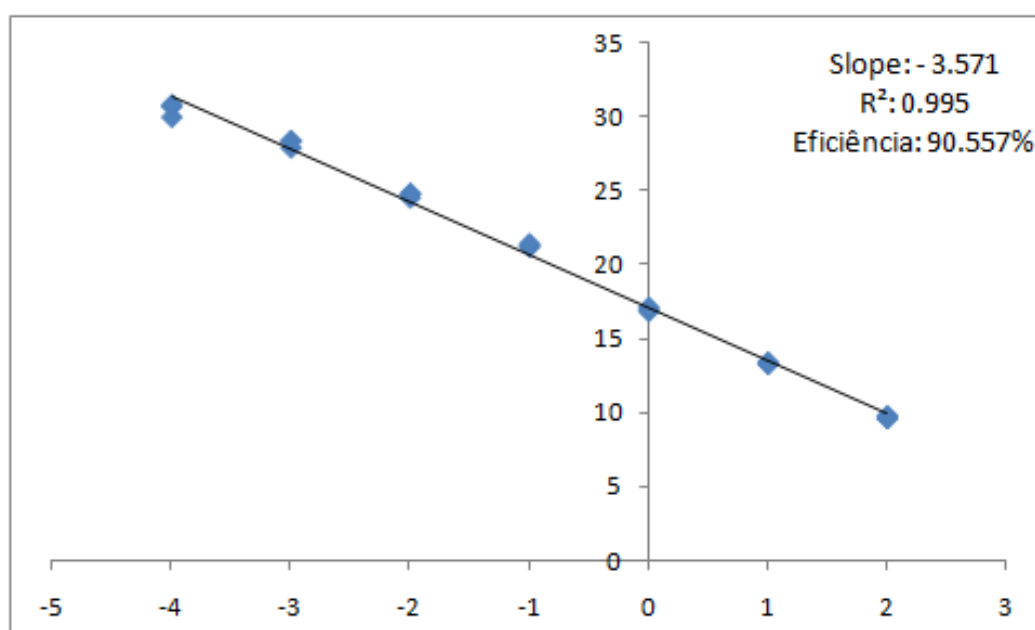


Figura 5. Curva Padrão qPCR. A curva foi realizada com a diluição seriada do *Trypanosoma cruzi* de 10^2 a 10^{-4}

11. Análise histopatológica

Para avaliar a presença de ninhos de amastigotas e lesão tecidual, foram realizados exames histológicos no laboratório de Patologia da UnB. Foram coletadas amostras de tecido cardíaco, muscular e testículo ou ovários dos animais, incluindo os animais infectados e não infectados que serviram de controles das reações. Inicialmente, o tecido passa por um processo de desidratação com banhos sucessivos em soluções com teor crescente de álcool (etanol) 70%, 80%, 90% e três vezes em 100%, por 30 min. Em seguida, passou por um processo de diafanização em três banhos sucessivos em xilol, por 30 min, seguindo-se a parafinização.

O tecido é fixado em um bloco de parafina e levado ao micrótomo, onde é cortado na espessura adequada. Após mobilização em lâmina, passou por um processo de desparafinização, sendo colocado em estufa a 60 °C por 1- 24h. Em seguida, as lâminas foram submetidas a banhos sucessivos com xilol por 5 min. Para o processo de hidratação, foram realizados banhos sucessivos com teor alcoólicos decrescentes 100%, 90%, 80%, 70%. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, seguindo a sequência de coloração com Hematoxilina de Harris 10-15 min, lavagem em água corrente, diferenciador alcoólico (Etanol/HCl 0,25g) por 2 min, lavagem em água corrente, solução aquosa de amoníaco 1%, lavagem em água corrente, coloração com Eosina – Floxina B safranina 1% por 5 min, em seguida desidratadas com banhos sucessivos em álcool por 2 min por último xilol de montagem (Sambrook *et al.*, 2001). Após a montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico na objetiva de 100X.

12. Imunohistoquímica

Para a realização da imunoperoxidase, as lâminas utilizadas passaram pelo processo de silanização, onde inicialmente foram diluídos 264 mL de detergente neutro em 5 L de água destilada, sendo colocadas as lâminas na solução durante 30 min. As mesmas foram lavadas em água corrente por duas horas, mergulhadas seis vezes em solução com 250 mL água destilada e 250 mL de álcool absoluto e colocadas para secar em estufa a 60 °C por 12 horas. Em seguida as lâminas

passaram por três banhos intercalados por secagem em papel toalha: 1º acetona PA por 2 min; 2º 480 mL de acetona PA e 30 de silano por 2 min; 3º acetona PA, quatro mergulhos. Após esse, processo as lâminas foram guardadas em estufa por 1 dia.

Tecidos embebecidos em parafina foram cortados em micrótomo na espessura de 5µm e as secções posicionadas em lâminas. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica, mergulhando as lâminas em solução de recuperação (tampão citrato e Tween 20 pH 6,0) a 96 °C durante 20 min. Após esse período, as mesmas foram retiradas e deixadas por 20 min à temperatura ambiente. Após três lavagens com água destilada, sob constante agitação, foi realizada o bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio (500 mL de água destilada para 80 mL de peróxido de hidrogênio), em dois banhos de 15 min cada. As lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e retirado o excesso de umidade com papel toalha. Em seguida, os cortes foram delimitados com caneta delimitadora (Dako pen), distribuídos em câmara úmida e cobertos e cobertos com bloqueador de proteína por 10 min.

Após incubação, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem (TBS + Tween 20) por 5 min, retirado o excesso de umidade e colocado o anticorpo primário (soro de camundongo positivo) para incubar durante a noite. Em seguida, foram realizadas lavagens exaustivas com tampão de lavagem e incubado o anticorpo conjugado com peroxidase (SIGMA) por 1 hora, seguido de lavagens, com tampão de lavagem. A revelação foi realizada com cromógeno (DAB), incubado de 2 a 5 min. As lâminas foram lavadas com água destilada e contracoloradas com hematoxilina de Harris. Posteriormente lavadas com água corrente, desidratadas e montadas com resina sintética (*Entellan*).

13. Análise Estatística

As diferenças encontradas entre os valores médios do teste de ELISA após o cruzamento dos casais, assim como, os dados da qPCR foram analisados empregando a Análise de Variância – ANOVA One-Way e Two-Way, respectivamente, e o teste complementar de Tukey, para comparação múltipla entre

pares, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Foi utilizado software GraphPad Prisma® versão 6).

Toda a metodologia está resumida no fluxograma (Figura 6)

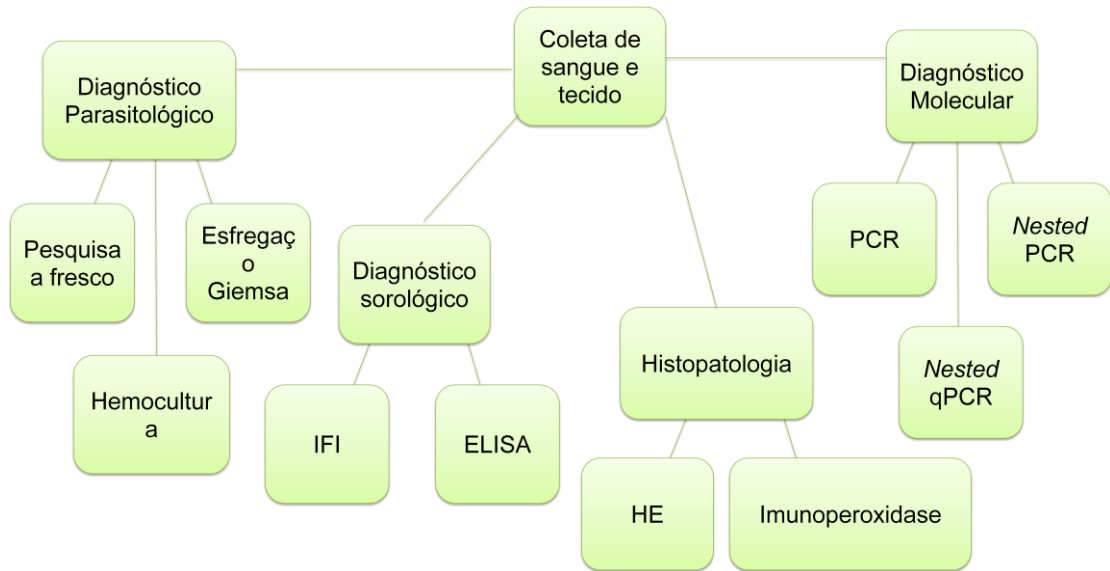


Figura 6. Fluxograma da metodologia utilizada

V. RESULTADOS

1. Diagnóstico Parasitológico

Para confirmação da infecção pela via intraperitoneal, foi realizado o exame a fresco do sangue periférico dos animais. Essa análise confirmou a presença de formas tripomastigotas na circulação de todos os camundongos inoculados com o parasito. Só após a confirmação da infecção, os animais, machos e fêmeas foram acasalados com parceiros não infectados.

Visando o diagnóstico parasitológico dos animais que foram infectados pela via sexual, foram realizados testes de hemocultura e esfregaço sanguíneo corado com Giemsa. O teste de hemocultura não foi capaz de demonstrar a presença do *T. cruzi* nos animais infectados. A análise microscópica do esfregaço sanguíneo dos animais realizada após duas gestações (aproximadamente 120 dias) identificou a presença de formas tripomastigotas em dois animais, uma fêmea (número 10) do grupo C (macho infectado x fêmea sadia) e um macho (número 12) do grupo D (macho sadio x fêmea infectada), totalizando uma positividade de 20%. A Figura 7 mostra a presença de uma forma tripomastigota de *T. cruzi* identificada no sangue de um animal infectado pela via sexual.



Figura 7. Detecção de forma tripomastigota em sangue periférico de camundongo infectado pela via sexual. Esfregaço sanguíneo de uma fêmea inicialmente sadia, após cruzamento com macho infectado (Grupo C, animal 8). Forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* indicado pela seta.

2. Diagnóstico sorológico

Para análise do perfil sorológico dos camundongos e verificação da presença de anticorpos específicos para o *T. cruzi*, foram utilizados dois testes sorológicos: ELISA e Imunofluorescência Indireta (IFI).

O teste ELISA demonstrou a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* do isotipo IgG nos camundongos inicialmente sadios (machos e fêmeas) dos grupos C e D, após o acasalamento com animais infectados pela via intraperitoneal. A análise dos resultados do ELISA mostrou que os títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* estavam mais elevado nos camundongos que foram infectados pela via intraperitoneal, como demonstrado na Figura 8 e Tabela 1.

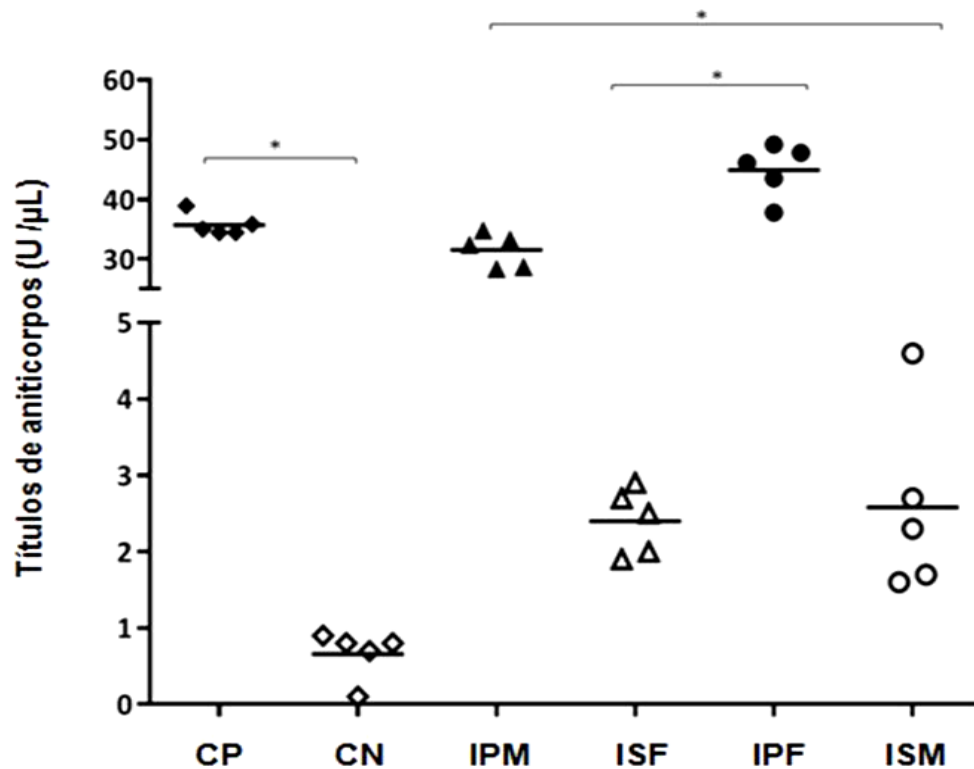


Figura 8. Identificação de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* pelo método ELISA. CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; IPM; Machos Infectados pela via Intraperitoneal; ISF: Fêmeas Infectadas pela via sexual; IPF: Fêmeas Infectadas pela via Intraperitoneal; ISM: Machos Infectados pela via sexual; (* = $P < 0,05$)

Tabela 1. Títulos de anticorpos específicos IgG anti – *Trypanosoma cruzi* produzidos em camundongos dos grupos C e D.

| Grupos | Via de infecção | Amostras | U/ μ L | DO | Resultado | Positividade |
|-----------|-----------------|-----------|------------|-------|--------------|--------------|
| C | Intraperitoneal | 1 | 33,3 | 1,011 | Reagente | (10/10) 100% |
| | Sexual | 2 | 1,9 | 0,068 | Reagente | |
| | Intraperitoneal | 3 | 28,7 | 0,871 | Reagente | |
| | Sexual | 4 | 2,5 | 0,086 | Reagente | |
| | Intraperitoneal | 5 | 28,4 | 0,864 | Reagente | |
| | Sexual | 6 | 2,7 | 0,093 | Reagente | |
| | Intraperitoneal | 7 | 34,8 | 1,055 | Reagente | |
| | Sexual | 8 | 2,9 | 0,097 | Reagente | |
| | Intraperitoneal | 9 | 32,4 | 0,983 | Reagente | |
| | Sexual | 10 | 1,5 | 0,055 | Reagente | |
| D | Intraperitoneal | 11 | 43,5 | 1,316 | Reagente | (10/10) 100% |
| | Sexual | 12 | 4,6 | 0,148 | Reagente | |
| | Intraperitoneal | 13 | 47,8 | 1,444 | Reagente | |
| | Sexual | 14 | 2,7 | 0,093 | Reagente | |
| | Intraperitoneal | 15 | 46,1 | 1,394 | Reagente | |
| | Sexual | 16 | 2,3 | 0,079 | Reagente | |
| | Intraperitoneal | 17 | 49,2 | 1,488 | Reagente | |
| | Sexual | 18 | 1,7 | 0,061 | Reagente | |
| | Intraperitoneal | 19 | 37,8 | 1,144 | Reagente | |
| | Sexual | 20 | 1,6 | 0,059 | Reagente | |
| CN | | \bar{X} | 0,8 | 0,035 | Não reagente | ----- |
| CP | | \bar{X} | 35,8 | 1,085 | Reagente | ----- |

U/ μ L = unidade por microlitro; DO = densidade óptica = absorvância; \bar{X} = Média; Grupo C (fêmeas sadias acasaladas com machos infectados); Grupo D (fêmeas infectadas acasaladas com machos sadios). Ponto de corte = 0,043. Valores de referência: Não reagente = <0,9; Indeterminado = 0,9 – 1,0; Reagente = \geq 1,1

Os dados do ELISA foram validados pelo teste de IFI. Os resultados obtidos no IFI demonstraram a presença de IgG anti-*T. cruzi* em todos os casais dos grupos experimentais C e D. Os resultados do teste IFI estão demonstrados na Figura 9.

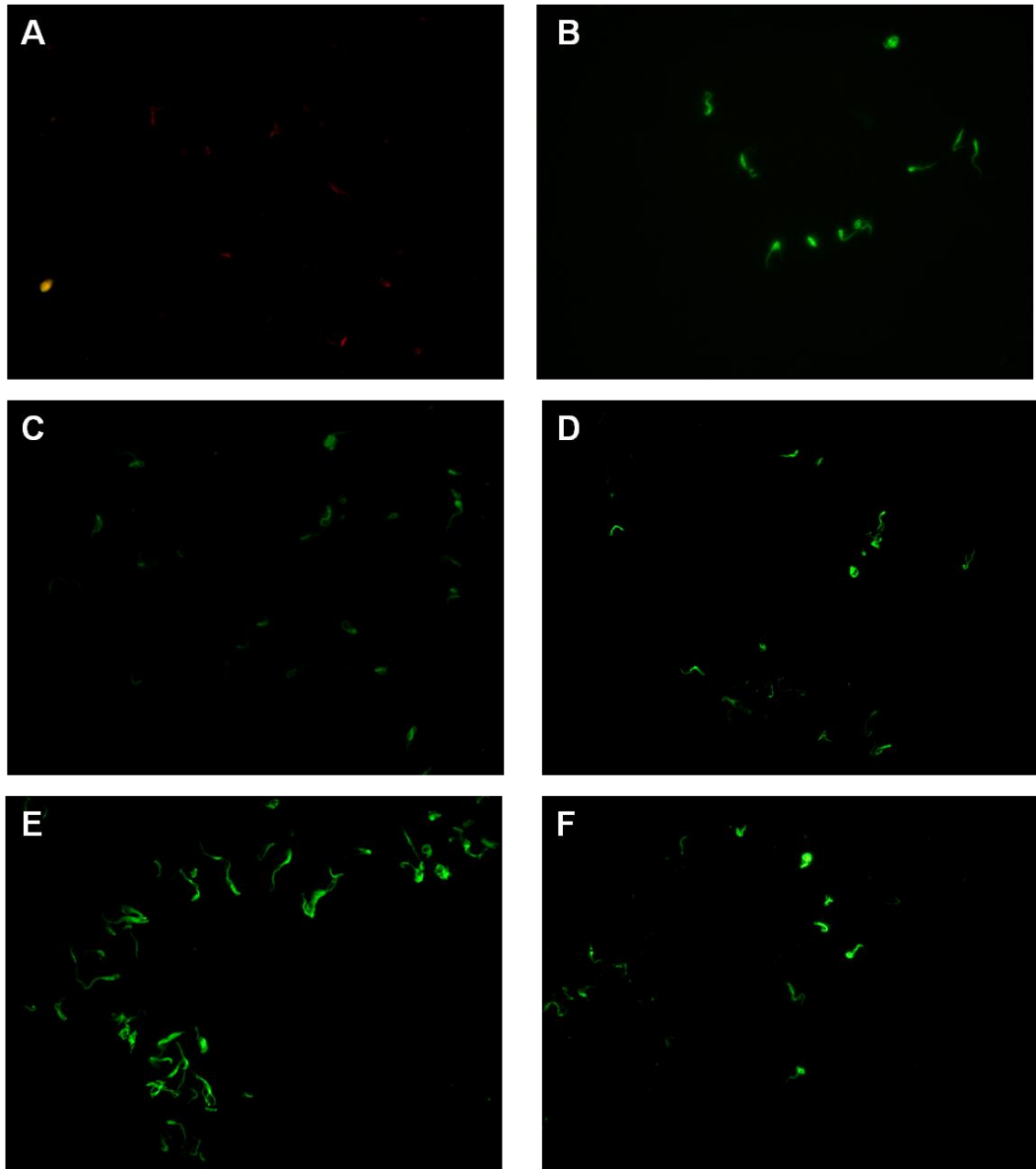


Figura 9. Presença de anticorpos específicos anti – *Trypanosoma cruzi* detectados pela Imunofluorescência indireta. A. Camundongo controle Negativo; B. Camundongo controle Positivo; C. Camundongo macho infectado por via intraperitoneal; D. Camundongo fêmea infectada por via intraperitoneal; E. Camundongo macho infectado por via sexual; F. camundongo fêmea infectado por via sexual. Aumento de 400x.

3. Diagnóstico Molecular

Foram realizados testes moleculares (PCR e *Nested* qPCR) para pesquisa de nDNA do *T. cruzi* nos camundongos. A PCR convencional foi realizada nos grupos experimentais, antes e após o cruzamento, feitas em triplicata e seus produtos visualizados em gel de agarose 1,3%.

Os testes realizados com os *primers* PON1 e PON2, amplificaram produtos de aproximadamente 250 pb em todos os camundongos que foram infectados pela via intraperitoneal. Nos animais não infectados não houve a presença de bandas específicas antes do cruzamento, como demonstra a Figura 10.

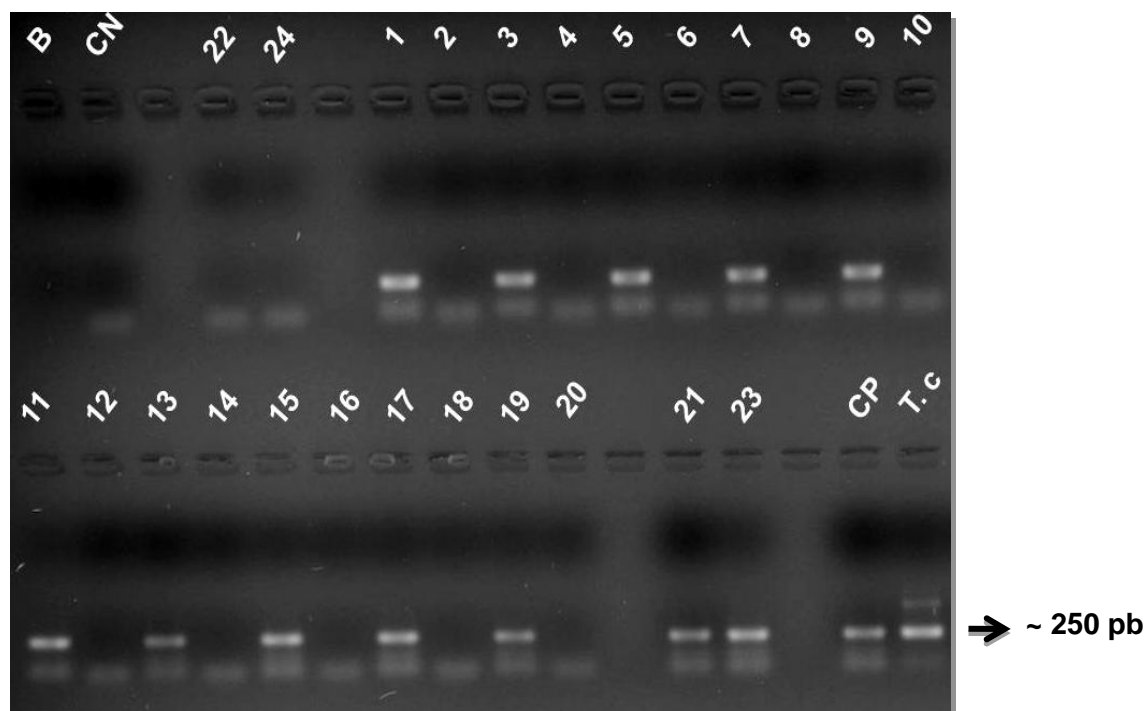


Figura 10. Detecção de DNA de *Trypanosoma cruzi* em camundongos dos grupos A, B, C e D, antes do cruzamento. Grupo A: 22 e 24; Grupos B: 21 e 23; Grupos C: 1 a 10; Grupo D: 11 a 20; B: branco (sem DNA); CN: controle negativo; CP: controle positivo; T. c: *Trypanosoma cruzi*.

Após duas gestações, foi realizada uma nova PCR, com *primers* PON1/2, para avaliar a presença de nDNA do *T. cruzi* nos camundongos infectados intraperitoneal e seus parceiros sexuais (inicialmente não infectados). Os resultados

das ampliações mostraram a presença de bandas específicas para *T. cruzi* em todos os animais testados, após o cruzamento, como pode se observado na figura 11.

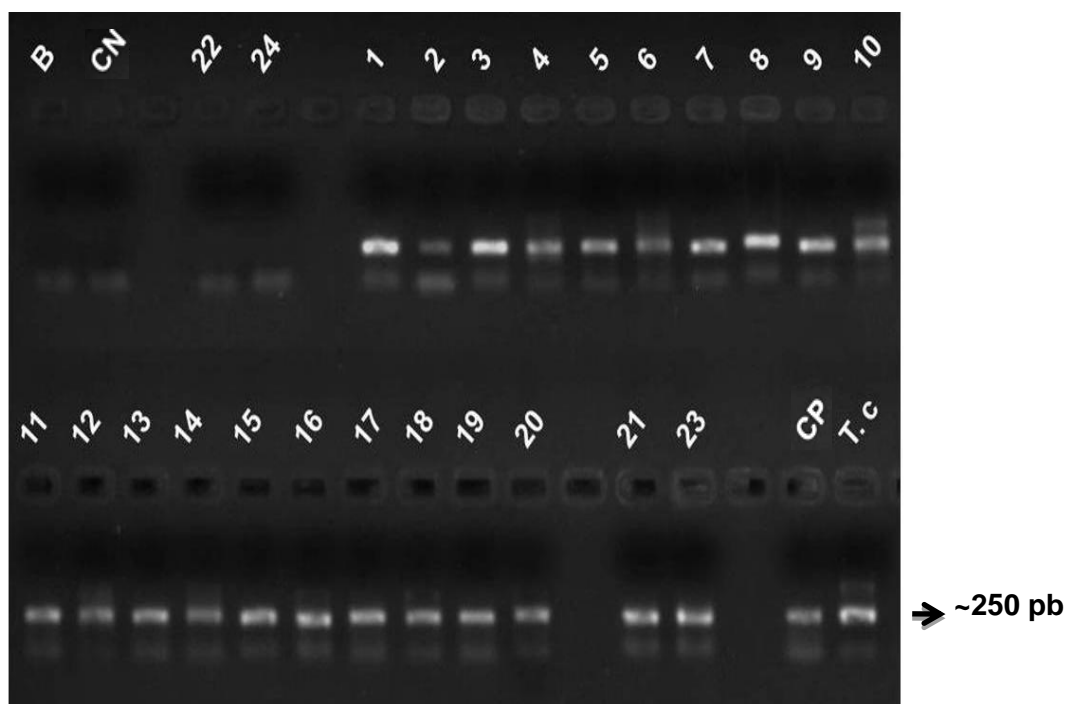


Figura 11. Identificação do DNA nuclear do *Trypanosoma cruzi* camundongos não infectados após acasalamento com parceiros sexuais infectados. Os resultados do teste de PCR, mostram bandas de 250 pb. Grupo A: 22 e 24; Grupos B: 21 e 23; Grupos C: 1 a 10; Grupo D: 11 a 20; B: branco (sem DNA); CN: controle negativo; CP: controle positivo; T. c: *Trypanosoma cruzi*.

Os resultados obtidos na PCR com os *primers* PON1/PON2 foram confirmados pela *Nested* PCR utilizando *primers* TCZ1/2 e TCZ3/4, que também reconhecem regiões repetitivas do DNA nuclear do *T. cruzi*. A *Nested* PCR que foi realizada no tempo zero, ou seja, antes do acasalamento dos animais, revelou a presença de bandas específicas de aproximadamente 168 pb nos camundongos que foram infectados pela via intraperitoneal, conforme apresentado na Figura 12.

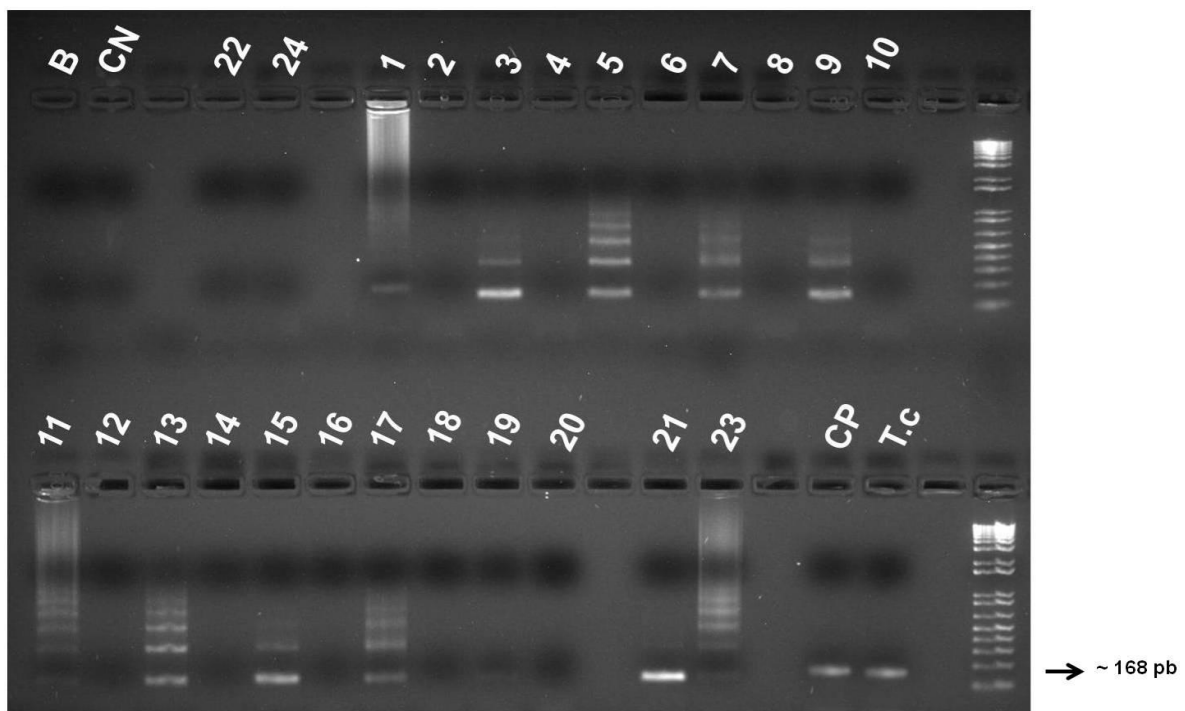


Figura 12. Amplificação de nDNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de camundongos infectados pela via intraperitoneal, antes do acasalamento, utilizando os primers TCZ3/TCZ4. Grupo A: 22 e 24; Grupos B: 21 e 23; Grupos C: 1 a 10; Grupo D: 11 a 20; B: branco (sem DNA); CN: controle negativo; CP: controle positivo; T. c: *Trypanosoma cruzi*.

Após duas gestações, foi realizada nova *Nested* PCR, com intuito de identificar a presença do nDNA do *T. cruzi* nos animais que inicialmente eram sadios. A PCR revelou a presença de bandas específicas em todos os animais sadios que foram acasalados com camundongos infectados pela via intraperitoneal, como mostra a Figura 13.

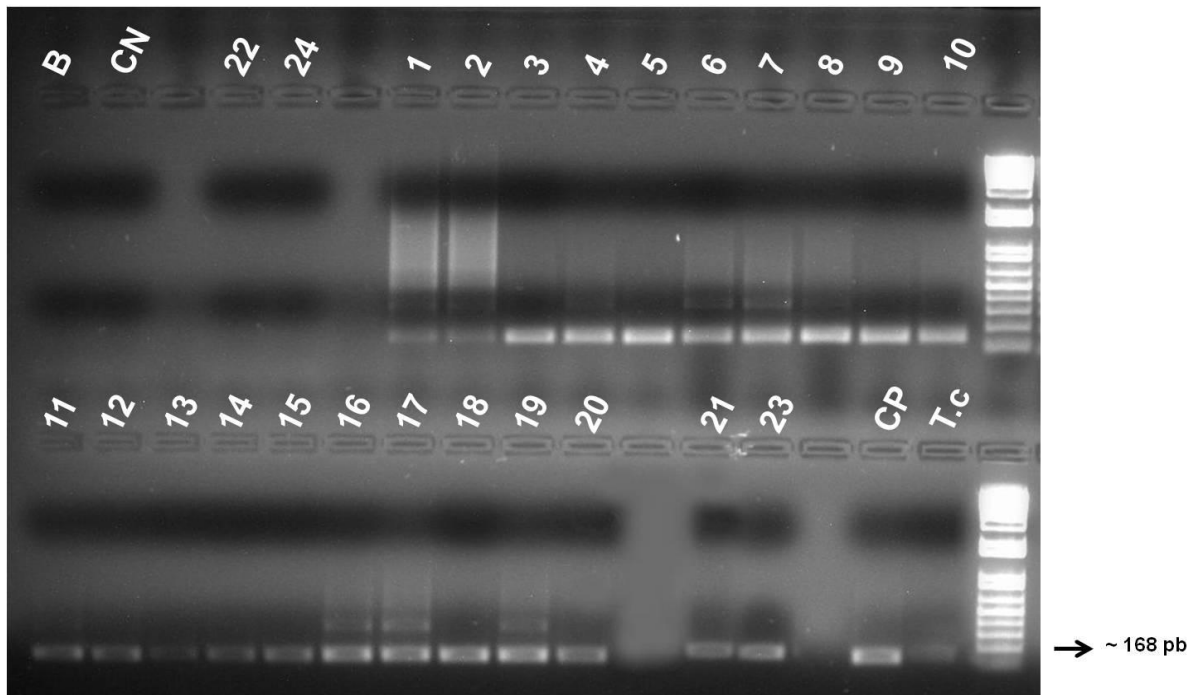


Figura 13. Amplificação de nDNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de animais infectados pela via sexual, utilizando os *primers* TCZ3/TCZ4. Os produtos da PCR geraram bandas de aproximadamente 168 pb. Grupo A: 22 e 24; Grupos B: 21 e 23; Grupos C: 1 a 10; Grupo D: 11 a 20; B: branco (sem DNA); CN: controle negativo; CP: controle positivo; T. c: *Trypanosoma cruzi*.

4. Quantificação do *Trypanosoma cruzi* no tecido de camundongos infectados

Para avaliação quantitativa absoluta da presença do nDNA do *T. cruzi* no sangue, coração, testículo e ovário dos camundongos infectados via intraperitoneal e pela via sexual, foi realizada *Nested* qPCR utilizando *primers* TCZ 1/2 e TCZ 3/4. Os resultados das amplificações demonstraram a presença do *T. cruzi* em todos os tecidos testados, evidenciando uma carga parasitária maior naqueles animais que foram infectados pela via intraperitoneal. Os camundongos infectados sexualmente, machos e fêmeas, apresentaram diferenças na carga parasitária tecidual. Fêmeas infectadas sexualmente mostraram os mesmos padrões encontrados em camundongos infectados por via intraperitoneal. No entanto, os machos sexualmente infectados apresentaram uma reduzida carga de parasitos no coração, semelhante à dos testículos e sangue. Em suma, o coração mostrou-se o tecido

mais infectado, seguido pelo ovário, testículo e sangue. Os resultados da qPCR estão representados na Figura 14.

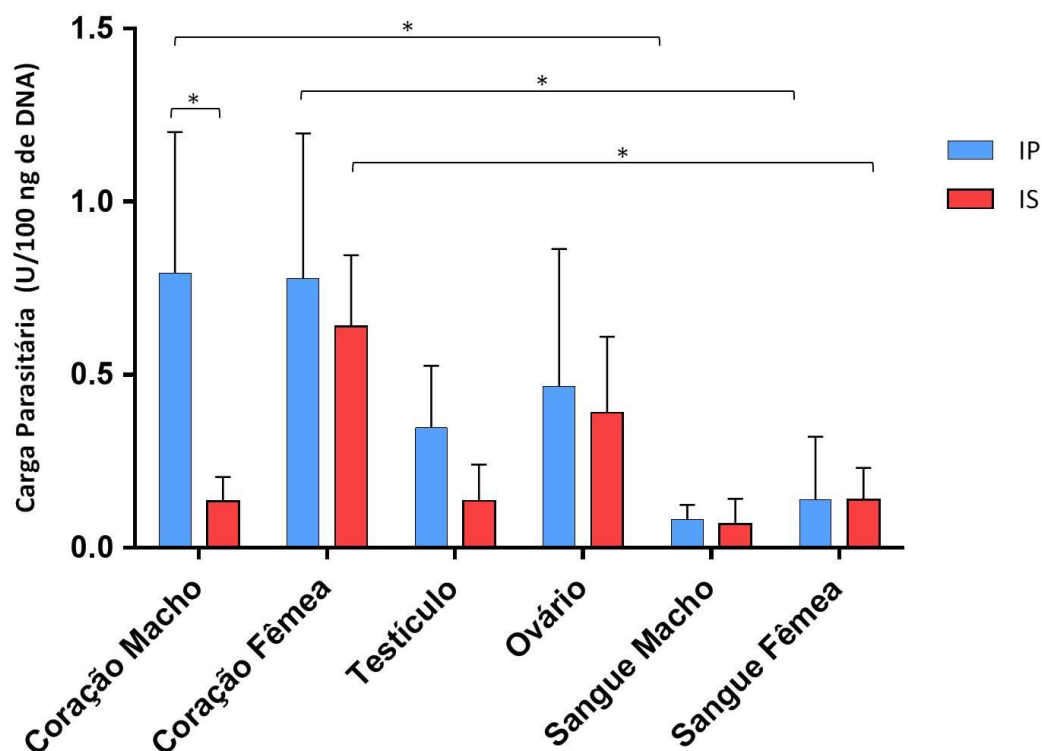


Figura 14. Carga parasitaria em diferentes tecidos de camundongos infectados pelas vias seual e intraperitoneal. Resultados da qPCR mostrando a presença de nDNA do *T. cruzi* no coração, testículo, ovário e sangue de camundongos dos grupos C e D. IP: Camundongos infectados pela via intraperitoneal; IS: Camundongos infectados pela via sexual. (* = $P < 0,05$)

5. Diagnóstico imunohistológico

Com o intuito de avaliar a presença de ninhos de amastigotas nos tecidos dos camundongos infectados pela via intraperitoneal e pela via sexual, foram realizados cortes histológicos dos tecidos cardíacos, muscular, testículo e ovário. Na análise histológica com a coloração hematoxilina-eosina e imuno peroxidase, não foi possível identificar a presença do parasito nos tecidos, sendo possível verificar, apenas, a presença de miocardite em dois camundongos fêmeas infectados pela via intraperitoneal, pertencentes ao grupo D (animais 15 e 11), presença de foco de

fibrose em um macho infectado pela via intraperitoneal (camundongo 9), pertencente ao grupo C, onde os machos foram infectados intraperitonealmente, foi possível observar a presença de autólise no testículo do animal número 7.

6. Avaliação da transmissão congênita como ferramenta para confirmação da transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi*

Com objetivo de validar e confirmar a transmissão sexual, foram realizados testes ELISA e PCR com amostras de filhotes nascidos de fêmeas do grupo C.

No diagnóstico sorológico pelo método de ELISA, 38,4% (10/26) dos filhotes provenientes de fêmeas que adquiriram a infecção por via sexual apresentaram resultados positivos. O teste de ELISA dos filhotes mostrou que ocorreu a transmissão congênita para esses animais, conforme dados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Título de anticorpos específicos IgM anti – *Trypanosoma cruzi* produzidos por camundongos do grupo E.

| Grupo | Amostras | U/ μ L | DO | Resultado | Positividade |
|-------|-----------|------------|----------|---------------|---------------|
| E | 30 | 0,9 | 0,270 | Indeterminado | (10/26) 38,4% |
| | 32 | 0,8 | 0,264 | Não reagente | |
| | 35 | 0,9 | 0,276 | Indeterminado | |
| | 36 | 1,2 | 0,346 | Reagente | |
| | 38 | 1,1 | 0,333 | Reagente | |
| | 39 | 1,0 | 0,298 | Indeterminado | |
| | 40 | 0,9 | 0,292 | Indeterminado | |
| | 42 | 0,9 | 0,280 | Indeterminado | |
| | 44 | 0,8 | 0,256 | Não reagente | |
| | 48 | 0,8 | 0,243 | Não reagente | |
| | 49 | 0,7 | 0,240 | Não reagente | |
| | 50 | 1,2 | 0,347 | Reagente | |
| | 51 | 1,2 | 0,346 | Reagente | |
| | 52 | 0,9 | 0,277 | Indeterminado | |
| | 53 | 0,9 | 0,291 | Indeterminado | |
| | 54 | 1,2 | 0,368 | Reagente | |
| | 55 | 1,0 | 0,304 | Indeterminado | |
| | 56 | 0,9 | 0,290 | Indeterminado | |
| | 57 | 1,0 | 0,302 | Indeterminado | |
| | 58 | 1,2 | 0,352 | Reagente | |
| | 59 | 1,3 | 0,373 | Reagente | |
| | 60 | 1,0 | 0,300 | Indeterminado | |
| | 61 | 1,0 | 0,303 | Indeterminado | |
| | 62 | 1,1 | 0,333 | Reagente | |
| | 64 | 1,1 | 0,334 | Reagente | |
| 65 | 1,1 | 0,304 | Reagente | | |
| CN | \bar{X} | 0,8 | 0,255 | Não reagente | ----- |
| CP | \bar{X} | 1,2 | 0,332 | Reagente | ----- |

U/ μ L = unidade por microlitro; DO = densidade óptica = absorvância; \bar{X} = Média; Ponto de corte = 0,282. Valores de referência: Não reagente = < 0,9; Indeterminado = 0,9 – 1,0; Reagente = \geq 1,1

O resultado das PCRs com os *primers* PON1/2 revelou a presença de bandas específicas para nDNA do *T. cruzi* em 53,84% dos filhotes (14/26), confirmando os achados sorológicos de transmissão congênita nesses animais, como demonstrado na Figura 15.

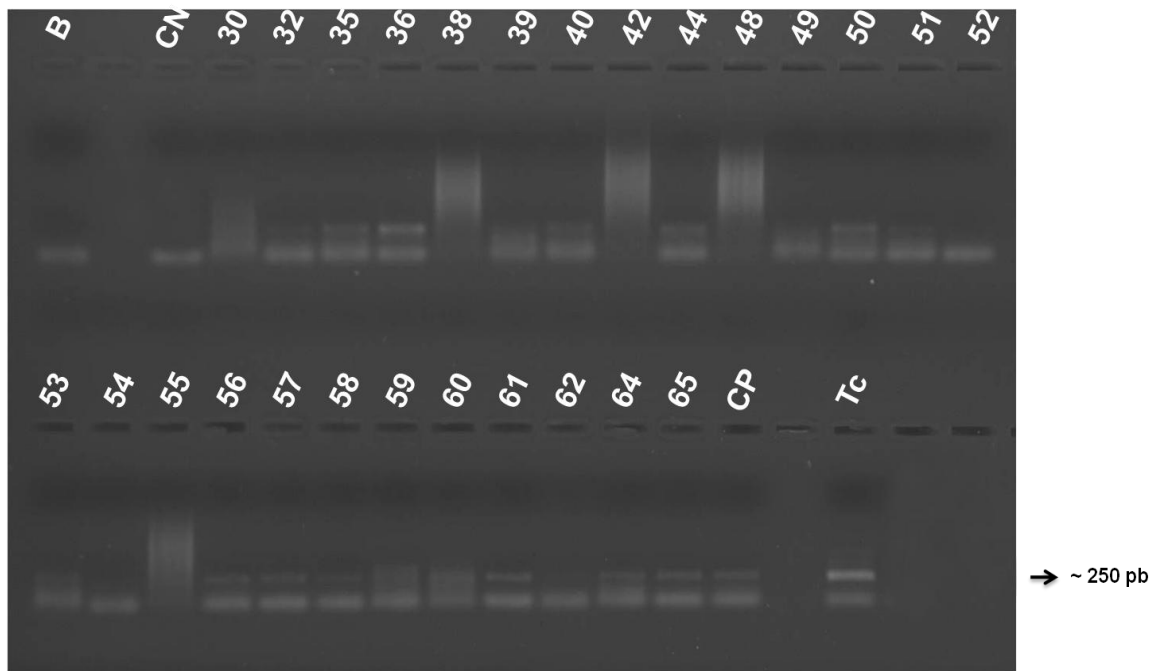


Figura 15. Amplificação de nDNA de *Trypanosoma cruzi* utilizando os primers PON1/PON2 nos camundongos do grupo E. Os produtos da PCR geraram bandas de aproximadamente 250 pb. Grupo E: 38 a 65; B: branco (sem DNA); CN: controle negativo; CP: controle positivo; T. c: *Trypanosoma cruzi*.

Além da PCR convencional, foi realizada uma *Nested* PCR utilizando os primers TCZ1/TCZ2 e TCZ3/TCZ4 em amostras dos camundongos provenientes do grupo E para verificar a presença de bandas específicas para o *T. cruzi*. A PCR identificou a presença do nDNA do parasito em 96,15 % (25/26) dos filhotes de fêmeas sadias que adquiriram a infecção pela via sexual, como mostra a Figura 16.

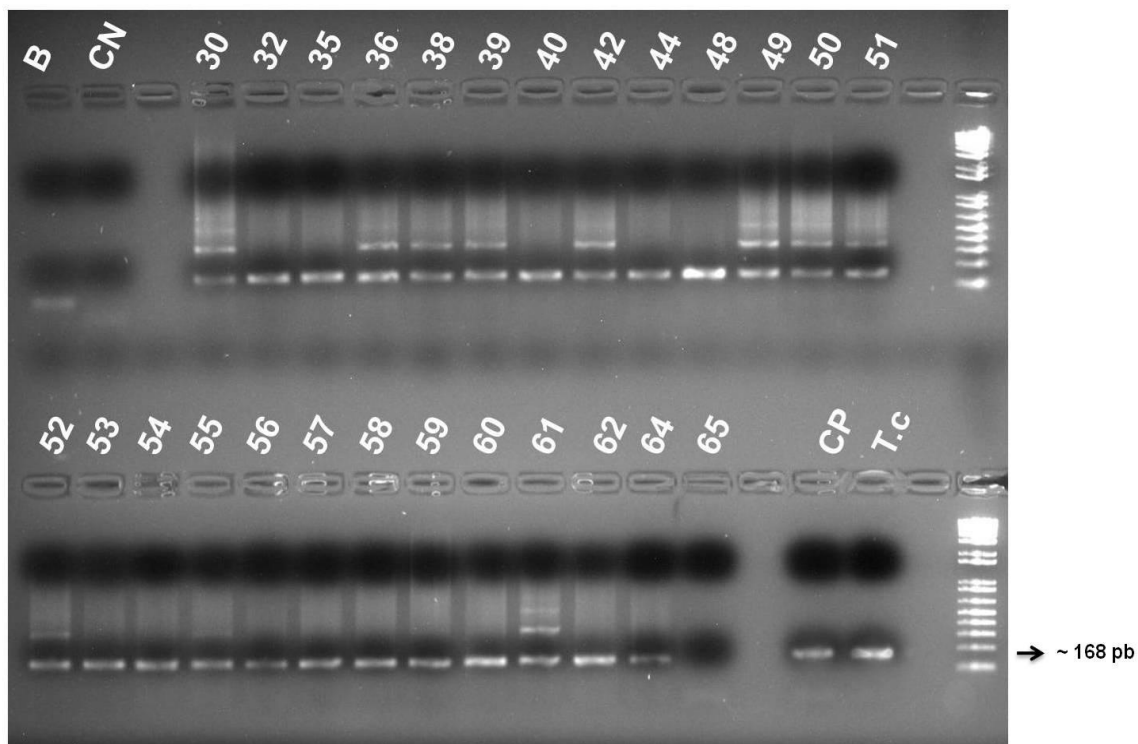


Figura 16. Amplificação de nDNA de *Trypanosoma cruzi* utilizando os primers TCZ3/TCZ4 nos camundongos do grupo E. Os produtos da PCR geraram bandas de aproximadamente 168 pares de base. Grupo E: 38 a 65; B: branco (sem DNA); NC: controle negativo; CP: controle positivo; T. c: *Trypanosoma cruzi*.

Todos os resultados obtidos nos testes de diagnóstico realizados nos animais do estudo estão sumarizados na tabela 3 (Anexo B).

VI. DISCUSSÃO

1. Avaliação dos testes de diagnóstico utilizados para detecção da transmissão sexual

A DC compreende uma fase aguda de curta duração, caracterizado por alta parasitemia e uma fase crônica, com baixa parasitemia e curso clínico imprevisível, que pode ir desde a ausência de sintomas a uma doença cardiovascular grave e/ou comprometimento gastrointestinal que pode levar à morte. No geral, o diagnóstico da infecção é baseado em sinais e sintomas clínicos, epidemiológicos e dos resultados de testes laboratoriais, incluindo parasitológicos, sorológicos e moleculares. O diagnóstico baseia-se principalmente em técnicas sorológicas, pois as parasitológicas apesar de serem extremamente específicas, são menos sensíveis, apresentam demora para liberação dos resultados, principalmente na fase crônica da infecção, e dificuldades na execução (Wendling *et al.*, 2011; Ferrer *et al.*, 2013; Sabino *et al.*, 2013). Em nossos resultados, foi apresentada a positividade no método parasitológico utilizado (esfregaço sanguíneo) em apenas 20% dos animais que inicialmente eram sadios e foram acasalados com animais infectados (Figura 7). Já nos animais infectados pela via intraperitoneal, após 7 dias de infecção, foi possível detectar o parasito no sangue periférico em todos os animais analisados.

O teste de hemocultura mostrou-se ineficiente, pois não foi possível observar a presença do crescimento do parasito na cultura mesmo após um ano de observação, tanto nos animais que foram infectados pela via intraperitoneal, como nos animais que se infectaram após o acasalamento. A falha na detecção do parasito por hemocultura pode ser justificada pela pouca quantidade de sangue inoculada (50 µl). Além disso, o exame foi realizado 120 dias após o primeiro contato sexual, ou seja, provavelmente esses animais foram infectados nos primeiros acasalamentos e já estariam na fase crônica da infecção no momento da coleta, o que dificulta a visualização do parasito no sangue periférico do animal (Pereira *et al.*, 2012; Coura *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos no diagnóstico sorológico (ELISA e IFI) demonstraram a presença de anticorpos específicos para *T. cruzi* em todos os animais analisados após o acasalamento com camundongos infectados. Em concordância, Farfán-García *et al.* (2012) observaram que as técnicas de ELISA e IFI apresentam uma boa correlação entre os resultados, apesar da preparação de antígenos serem diferentes. Os resultados de IFI (Figura 9) e de ELISA (Figura 8 e Tabela 1) sugerem a transmissão sexual do *T. cruzi*, já que o contato sexual foi o único meio que poderia ocasionar a transmissão do parasito.

Métodos de diagnóstico molecular têm permitido a identificação mais precisa de agentes patogênicos, por se apresentarem mais específicos. Contudo, a depender das condições utilizadas na PCR, são observados diversos níveis de sensibilidade, devido a variações no volume e qualidade das amostras, qualidades dos reagentes, quantidade de parasitos em circulação e condições dos ciclos térmicos. Ainda sim, a técnica é mais sensível que os métodos parasitológicos e sorológicos utilizados na rotina, apesar de ainda ser considerada um método auxiliar para o diagnóstico da DC em pacientes onde a sorologia foi inconclusiva (Ferrer *et al.*, 2013; Gilber *et al.*, 2013). Com o intuito de validar os resultados sorológicos, realizamos testes moleculares, PCR convencional e *Nested* PCR, para identificar o nDNA do *T. cruzi* nas amostras testadas. Os resultados das PCRs corroboraram os resultados dos testes sorológicos, demonstrando a presença de bandas específicas em todos os animais (Figuras 11 e 13). Variações da PCR vêm sendo descritas com o objetivo de tornar o diagnóstico mais sensível. A *Nested* PCR é uma técnica altamente sensível e já foi relatada por Marcon *et al.*, 2002, como diagnóstico complementar para a DC.

A qPCR utiliza marcadores fluorescentes para o monitoramento contínuo da amplificação ao longo da reação, possibilitando a quantificação em tempo real do DNA amplificado. A rápida obtenção dos resultados e a redução do risco de contaminação devido ao mínimo de manipulação das amostras são vantagens da utilização da qPCR (Pirón *et al.*, 2007; Enriquez *et al.*, 2014). Com o uso da *Nested* qPCR, conseguimos identificar a presença do nDNA em todos os camundongos avaliados. O coração foi o tecido que apresentou a maior carga parasitária, seguido por ovário, testículo e sangue (Figura 14). O mesmo resultado foi constatado por

Caldas *et al.* (2012) que traçou estratégias de PCR para quantificação do *T. cruzi* em amostras de sangue e tecidos de camundongos, na fase aguda e crônica da infecção. Os autores observaram que na qPCR, durante a fase aguda, a quantidade de parasitos no sangue era maior do que no coração, já na fase crônica os resultados foram similares aos nossos, com o coração apresentando maior carga parasitaria do que o sangue. As cargas parasitárias maiores encontradas nos camundongos fêmeas sexualmente infectadas sugerem uma infecção parasitária inicial mais elevada. Esses dados podem indicar que o sêmen é um veículo melhor para a transmissão do *T. cruzi* do que secreções vaginais, transportando grandes quantidades de parasitos.

2. Avaliação da análise Histopatológica e imunohistoquímica na identificação do *Trypanosoma cruzi* em tecidos de camundongos infectados

A análise histopatológica e imunohistoquímica do coração, músculo e órgãos sexuais, dos camundongos estudados não foi capaz de demonstrar ninhos de amastigotas em nenhum dos tecidos examinados. Entretanto, foi verificada a presença de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, com destruição celular em 4 animais infectados pela via intraperitoneal. Durante a fase aguda da DC, o parasitismo celular pode ser amplamente encontrado. No entanto, na infecção crônica, os parasitos tornam-se escassos nos tecidos, e são raramente encontrados no coração, músculo esquelético, intestino e esôfago. Lospes *et al.* (2006) afirmam que é extremamente rara a presença de formas amastigotas do *T. cruzi* nos tecidos durante a fase crônica da infecção. Vários estudos demonstram a presença de infiltrado inflamatório na ausência do parasito (Gironès e cols, 2007; Teixeira *et al.*, 2011; Bonney e Engman, 2015) . A presença de inflamação em resposta à infecção é essencial para à resistência do hospedeiro, mas também é responsável pela patologia observada na DC, pode ser destrutiva não só para células parasitadas, mas também para células não parasitadas (Brener *et al.*, 2000; Montéon-Padilha *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2002).

3. Avaliação de transmissão congênita como ferramenta de confirmação da transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi*

Em nosso estudo, realizamos testes sorológicos e moleculares nos animais que nasceram de mãe que adquiriu a infecção pelo *T. cruzi* após o acasalamento com camundongos infectados. Os resultados inconclusivos podem ter ocorrido devido a dificuldade de padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgM, sendo impossível encontrar a condição ideal, em que os controles negativos e branco fossem significativamente mais baixos que os controles positivos. Nossos resultados revelaram a positividade em 38,4% (10/26) dos filhotes no teste de ELISA para a pesquisa de anticorpos específicos IgM (Tabela 2), o resultado foi considerado relevante já que essa classe de anticorpos não poderia ser proveniente da progenitora, pois não é capaz de ultrapassar a barreira transplacentária (Abbas *et al.*, 2012). Realizamos, também, o diagnóstico molecular desses animais através da PCR convencional e da *Nested* PCR. A análise revelou discrepância entre os resultados com 53,84% de positividade na PCR convencional (Figura 15) e 96,15% na *Nested* PCR (Figura 16). Estes resultados estão de acordo com os dados disponíveis na literatura que apresentam a *Nested* PCR como uma técnica mais sensível que a PCR tradicional. Além disso, os *primers* TCZ1/2 e TCZ3/4 amplificam uma região repetitiva nuclear correspondente a 9% do genoma do *T. cruzi*. Já os *primers* PON1/2 amplificam outra região de microssatélite que corresponde a 7% do genoma nuclear do parasito (Virreira *et al.*, 2003; Pirón *et al.*, 2007). Apesar dos testes moleculares serem considerados potentes ferramentas para o diagnóstico da DC congênita, a amplificação do DNA do *T. cruzi* é considerada “sob avaliação” pela OMS, pois a presença do DNA do parasito no sangue do recém-nascido não indica, necessariamente, infecção ativa, uma vez que não prova que os parasitos são viáveis (Cevallos e Hernández, 2014).

4. Transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi*

Em nosso estudo, identificamos a transmissão sexual por meio do diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular em todos os animais avaliados. A transmissão de fêmeas infectadas para machos se deu, provavelmente, pelo contato com fluidos vaginais contaminados e dependentes da presença de microfissuras no pênis. A

transmissão de macho infectado para fêmeas deve ter acontecido através do sêmen contaminado. De interesse, a uretra masculina é o canal por onde passam o esperma e a urina, a qual já foi apresentada como suplemento para meios de cultura de *T. cruzi* em estudo realizado por Ferreira *et al.* (2007). No estudo, os autores partem do princípio, observado em estudos anteriores, que a adição da urina em meios de cultura para *Leishmania* sp. foi utilizada com sucesso para cultivo de várias cepas do parasito, no lugar da utilização do soro fetal bovino. A adição de 3 % de urina ao meio LIT não alterou o crescimento das espécies de *Leishmania*, onde o crescimento, sendo equivalente tanto em meio tradicional quanto em meio suplementado com urina (Armstrong e Patterson, 1994; Shamsuzzaman *et al.*, 1999). Entretanto, o crescimento do *T. cruzi* foi significativamente maior em meio acrescido de urina.

O único protozoário, reconhecido pela OMS, capaz de ser transmitido sexualmente é o *Trichomonas vaginalis*, ainda que existam relatos de outros protozoários transmitidos pelo contato sexual. Dubey e Sharna, 1980 e Teale *et al.*, 1982, demonstraram a presença do *Toxoplasma gondii* no sêmen de cabrinos e bovinos. Também foi relatada a transmissão do *T. gondii* pelo sêmen em coelhos (Liu *et al.*, 2006). A transmissão venérea da leishmaniose já foi descrita em cães com leishmaniose visceral que apresentaram lesões genitais e a presença do parasito no sêmen (Diniz *et al.*, 2005). Igualmente, em estudo realizado com cães de Ribeirão das Neves, MG, foi descrita a transmissão sexual de *Leishmania* sp.. Silva *et al.* (2009), observaram que três das doze cadelas que acasalaram com cães positivos para leishmaniose passaram a apresentar títulos de anticorpos específicos.

Nosso estudo representa a primeira demonstração experimental da transmissão sexual do *T. cruzi* na fase crônica da infecção. A via sexual pode ser um agente potencial de dispersão da Doença de Chagas no mundo. Contudo, para se conhecer a real importância epidemiológica da via sexual serão necessárias pesquisas mais aprofundadas.

VII. CONCLUSÕES

Dessa forma, podemos concluir em nosso trabalho, que:

1. 20% dos animais inicialmente sadios apresentaram o parasito no sangue periférico após copular com parceiros infectados;
2. Todos os casais produziram anticorpos específicos contra o *T. cruzi*, inclusive os animais infectados pela via sexual;
3. Todos os animais apresentaram o do DNA do parasito no sangue em diferentes tecidos, confirmando a transmissão através do contato sexual;
4. A transmissão sexual das fêmeas inicialmente sadias foi confirmada mediante a identificação da transmissão congênita dos seus filhotes.

VIII. PERSPECTIVAS

- i. Verificar a transmissão sexual do *T. cruzi* a partir da inseminação artificial em cães
- ii. Avaliar a transmissão sexual do *T. cruzi* em modelo experimental mais e menos suscetível a infecção
- iii. Avaliar a transmissão sexual de diferentes tipos de cepas do *T. cruzi*.
- iiii. Avaliar a transmissão sexual em casais de regiões não endêmicas, onde um dos parceiros tem histórico da Doença de Chagas.

IX. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Editora Elsevier Ltda, edição 7, Cap. 5 (anticorpos e antígenos) pag. 96. 2012.

AFONSO, A. M; EBELL, M. H; TARLETON, R.L. **A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease**. PLoS Negl Trop Dis 6(11), 1881. 2012.

ALBAJAR-VIÑAS, P; DIAS, J. C. P. **Advancing the Treatment for Chagas' Disease**. N engl j med, 370, 20. 2014.

ALENCAR, A. A.; BRITO, C. M. M., AZEVEDO, B. A. **Estudo sobre a infectividade do sêmen de camundongos inoculados com *Trypanosoma cruzi*. Comprometimento do aparelho genital masculino na Doença de Chagas experimental. Alteração dos plexos nervosos com destruição neural**. *Rev. Bras. Neurol.* 27: 51-56. 1991.

ANDRADE, D. V; GOLLOB, K.J; DUTRA, W.O. **Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease**. PLoS Negl Trop Dis, 8(7): e3010. 2014

ARMSTRONG, T. C; PATTERSON, J. L. **Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine**. J Parasitol, 80, 1030–1032. 1994.

BARRETO-SANTANA, D; STARLING, J; GURGEL-GONÇALVES, R; CUBA, C. A. **Biologia comparativa e comportamento alimentar de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* (Triatominae) sob condições de laboratório**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(4), 490-495. 2011.

BIOLO, A; RIBEIRO, A. L; CLAUSELL, N. **Chagas cardiomyopathy—where do we stand after a hundred years?** Prog. Cardiovasc Dis, 52(4), 300-316. 2010.

BONNEY, K. M; ENGMAN, D. M. **Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease: Looking Back, Looking Ahead.** Am J Pathol, 185 (6): 1537 – 1547. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Doenças infecciosas e parasitárias.** Guia de bolso. Ed. 8, Brasília. 2010

BRENER Z. **Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentallyinfected with *Trypanosoma cruzi*.** Rev Inst Med. Trop, 4: 389-396.1962.

BRENER, Z; ANDRADE, Z. A; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p. 2000

BRITTO, C. C. **Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 104(Suppl. I), 122-135. 2009.

CABRINE-SANTOS, M; SANTOS, V. M; LIMA, M. A; ABREU, M. E. A; LAGES-SILVA, E; RAMÍREZ, L. E. **Genitourinary Changes in Hamsters Infected and Reinfected with *Trypanosoma cruzi*.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 98(4), 523-528. 2003.

CALDAS, S; CALDAS, I. S; FIGUEIREDO, L. D; LIMA, W. G; OLIVEIRA, R. P; CECÍLIO, A. B; RIBEIRO, I; TALVANI, A; BAHIA, M. T. **Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** Acta Tropica, 123(3), 170–177. 2012

CARLIER, Y; SOSA-ESTANI, S; LUQUETTI, A. O; BUEKENS, P. **Congenital Chagas disease: an update.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 110. 2015.

CARVALHO, L. O; ABREU-SILVA, A. L; HARDOIM, D. J; TEDESCO, R. C; MENDES, V. G; DA COSTA, S. C; CALABRESE, K. S. ***Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease.** Int J Exp Pathol, 90(1): 52-57. 2009.

CARVALHO, T.L; RIBEIRO, R.D; LOPES, R.A. **The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. I. Morphometric study of the vas deferens in the acute phase of the disease.** *Exp Pathol* 41(4):203-14. 1991.

CASTRO, E. **Chagas' disease: lessons from routine donation testing.** *Transfusion Medicine*, 19, 16–23. 2009

CEVALLOS, A. M; HERNÁNDEZ, R. **Chagas' Disease: Pregnancy and Congenital Transmission.** *BioMed Research International*, 2014, 10. 2014.

CHIARI, E.;DIAS, J. C.;LANA, M.;CHIARI, C. A. **Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease.** *Rev Soc Bras Med Trop*, 22(1):19-23. 1989.

COSTA, J; TOWNSEND PETERSON, A; BEARD, C.B. **Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* neiva, 1911, the most important Chagas' disease vector in northeastern brazil (hemiptera, Reduviidae, triatominae).** *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 67(5), 516–520, 2002.

COURA, J.R. **The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1-6. 2015.

COURA, J. R; MARQUEZ, M. H. P; GUERRA, J. A. O; ZAUZA, P. L; MIGUEL, J. C; PEREIRA, J. B. **A new survey of the serology of human *Trypanosoma cruzi* infection in the Rio Negro microregion, Brazilian Amazon: a critical analysis.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 108(7), 909-913. 2013.

COURA, J.R; BORGES-PEREIRA, J. **Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review.** *Acta Tropica*, 115, 5–13. 2010.

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

CUNHA-NETO, E. **Estudo da Ativação e Inativação de Linfocitos T Com Clones Murinos Ativado Quimicamente.** In: XI CONGRESSO DA SOC. BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA. RESUMOS. CAXAMBU. 1986.

CURA, C.I; LATTES, R; NAGEL, C; GIMENEZ, M. J; BLANES, M; CALABUIG, E; IRANZO, A; BARCAN, L. A; ANDERS, M; SCHIJMAN, A. G. **Early Molecular Diagnosis of Acute Chagas disease After Transplantation With Organs From *Trypanosoma cruzi* – Infected Donors.** American Journal of Transplantation, 13: 3253–3261. 2013.

DE SOUZA R. M; AMATO N. V. **Discrepancies and consequences of indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence and ELISA tests for the diagnosis of Chagas disease.** Rev Inst Med Trop, 54(3), 141-3. 2012.

DIAS J. C. P. **Mecanismos de transmissão.** In: BRENER Z. e ANDRARE Z. O. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 4, p.152-174. 1979.

DIAS, G. B. M; GRUENDLING, A. P; ARAÚJO, S. M; GOMES, M. L; TOLEDO, M. J. O. **Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II.** Experimental Parasitology, 135, 511–517. 2013.

DIAS, J. C. P. **Chagas' disease and blood transfusion in endemic areas.** In: WENDEL, S.,BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A., eds. *Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.* ISBT Brazil' 92. SBHH, Brazil. 1992

DIAS, J. C. P. **Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristcs with agents of the transmission by meals.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39 (4), 370-375. 2006.

DIAS, J. C. P; NETO, V. A; LUNA, E. J. A. **Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44(3), 375-379. 2011.

DINIZ, S. A; MELO, M. S; BORGES, A. M; BUENO, R; REIS, B. P; TAFURI, W. L; NASCIMENTO, E. F; SANTOS, R. L. **Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs.** Vet. Pathol, 42(5), 650-658. 2005.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. **Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man.** Nat Rev Microbiol, 3(3): 251-261. 2005.

DUARTE, L. F; FLÓREZ, O; RINCÓN, G; GONZÁLEZ, C. I. **Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease.** Colombia Médica, 45(2). 2014.

DUBEY, J. P; SHARMA, S. P. **Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats.** Am. J. Vet. Res, 41(5), 794- 795. 1980.

ENRIQUEZ, G. F; BUA, J; OROZCO, M. M; WIRTH, S; SCHIJMAN, A. G; GÜRTLER, R. E; CARDINAL, M. V. **High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission.** Infection, Genetics and Evolution, 25, 36–43. 2014

FARFÁN-GARCÍA, A. E; CASTELLANOS-DOMÍNGUEZ, Y.Z; LUNA-MARÍN, K. P; ANGULO-SILVA, V. M. **Concordancia de dos pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.** Rev. salud pública, 15 (2), 208 - 219. 2013.

FEARON, M. A; SCALIA, V; HUANG, M; DINES, I; NDAO, M; LAGACÉ-WIENS, P. **A case of vertical transmission of Chagas disease contracted via blood transfusion in Canada.** Can J Infect Dis Med Microbiol, 24(1), 32–34. 2013.

FERREIRA, K. A. M; LEMOS-JÚNIOR, P. E. S; LAGES-SILVA, E; RAMÍREZ, L. E; PEDROSA, A. L. **Human urine stimulates in vitro growth of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*.** Parasitol Res (2007) 101:1383–1388

FERRER, E; LARES, M; VIETTRI, M; MEDINA, M. **Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.** Enferm Infecc Microbiol Clin, 31(5):277–282. 2013.

FREITAS, J. L. P; BIANCALANA, A; AMATO NETO, V; NUSSENZWEIG, V; SONNTAG, R; BARRETO, J. G. **Moléstia de Chagas em bancos de sangue na capital de São Paulo.** O Hospital, 41, 229-283. 1952.

GALVÃO, L. M. C; CHIARI, E; MACEDO, A. M; LUQUETTI A. O, SILVA, ANDRADE, S. A. A. L. S. S. **PCR Assay for Monitoring *Trypanosoma cruzi* Parasitemia in Childhood after Specific Chemotherapy.** Journal of clinical microbiology, 5066–5070. 2003.

GILBER, S. R; ALBAN, S. M; GOBOR, L; BESCROVAINE, J. O; MYIAZAKI, M. I; THOMAZ-SOCCOL, V. **Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 46(3), 310-315. 2013.

GIRONÈS, N; CARRASCO-MARIN, E; CUERVO, H; GUERRERO, N.A; SANOJA, C; JOHN, S; FLORES-HERRÁEZ, R; FERNÁNDEZ-PRIETO, L; CHICO-CALERO, I; SALGADO, H; CARRIÓN, J; FRESNO, M. **Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology.** Ann N Y Acad Sci, 1107:434-44. 2007

GONÇALVES DA COSTA, S. C; CALABRESE, K. S; ALENCAR, A. A; ANGRANGE, P.H. ***Trypanosoma cruzi* invasion of structure related to development and central nervous system.** Rev. Bras. Neur., 22:183–190. 1986.

GURGEL-GONÇALVES, R; GALVÃO, C; COSTA, J; PETERSON, A. T. **Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling.** Journal of Tropical Medicine, 2012, 705326, 15. 2012.

HABERLAND, A; SARAIVA, S. G. M; WALLUKAT, G; ZIEBIG, R; SCHIMKE, I. **Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine.** Clin Chem Lab Med, 51(2), 271–294. 2013.

HECHT, M. M; NITZ, N; ARAUJO, P. F; SOUSA, A. O; ROSA, A. C; GOMES, D. A; LEONARDECZ, E; TEIXEIRA, A. R. **Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts.** PLoS One, 5(2): e9181. 2010.

Higuchi, M.L; Benvenuti, L. A; Reis, M. M; Metzger, M. **Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments.** Cardiovascular Research, 60, 96–107. 2003.

HOWARD, E. J; XIONG, X; CARLIER, Y; SOSA-ESTANI, S; BUEKENS, P. **Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis.** BJOG, 121(1), 22–33. 2014

HUPRIKAR, S; BOSSERMAN, E; PATEL, G; MOORE, A; PINNEY, S; ANYANWU, A; NEOFYTOS, D; KETTERER, D; STRIKER, R; SILVEIRA, F; QVARNSTROM, Y; STEURER, F; HERWALDT, B; MONTGOMERY, S. **Donor-Derived *Trypanosoma cruzi* Infection in Solid Organ Recipients in the United States, 2001–2011.** American Journal of Transplantation, 13: 2418–2425. 2013.

JORG, M. E; OLIVA, R. **Presencia de tripomastigotes en sangre menstrual de mujeres con tripanosomiasis cruzi.** Rev. Arg. Parasitol. 1, 28–30. 1980.

JUSTI, S. A; RUSSO, C. A; MALLET, J. R; OBARA, M. T; GALVÃO, C. **Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).** Parasit Vectors, 7:149. 2014.

KRANSDORFA, E. P; ZAKOWSKIC, P. C; KOBASHIGAWA, J. A. **Chagas disease in solid organ and heart transplantation.** Curr Opin Infect Dis, 27(5), 418-24. 2014.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M. S.; VEXENAT, A. C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D. L.; TEIXEIRA, A. R. L. **Progressive chronic Chagas Heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma* nitroderivatives.** Am J Trop Med Hyg, 63 (3-4): 111-118. 2000.

LENZI, H. L; MORGANA, T. L; CASTELO-BRANCO; PELAJO-MACHADO, M; OLIVEIRA, D. N; GATTASS, C. R. ***Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection.** Acta Tropica, 71: 117-129. 1998.

LENZI, H. L; OLIVEIRA, D. N; LIMA, M. T; GATTASS, C. R. ***Trypanosoma cruzi*: Paninfectivity of CL strain during murine acute infection.** Exp Parasitol 84: 16-27.1996.

LEON, J. S; ENGMAN, D. M. **The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease.** Front. Biosci, 8, 315-322. 2003.

LIU, S. G; QUIN, C; YAO, Z. J; WANG, D. **Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits.** Chinese J. Parasitol Parasitic Dis, 24(3), 166- 170. 2006.

LOPES, E. R; PRATA, A; CHAPADEIRO, E; TAFURI, W. L; ROCHA, A. **Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Doença de Chagas** In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo-Patologia. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 1320-1337.

LUCIANO, R.M; LUCHEIS, S. B; TRONCARELLI, M. Z; LUCIANO, D. M; LANGONI, H. **Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI).** Braz. J. vet. Res. anim. Sci, 46, 181-187. 2009.

MACHADO, F. S; JELICKS, L. A; KIRCHHOFF, L. V; SHIRANI, J; NAGAJYOTHI, F; MUKHERJEE, S; NELSON, R; COYLE, CM; SPRAY, D. C; CARVALHO, A. C. C; GUAN, F; PRADO, C. M; LISANTI, M.P; WEISS, L.M; MONTGOMERY, S. P; TANOWITZ, H. B. **Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments.** Cardiol Rev. 20(2), 53–65. 2012.

MARCON, G. E. B; ANDRADE, P. D; ALBUQUERQUE, WANDERLEY, J; ALMEIDA, S. E. A; GUARIENTO, M. E; COSTA, S. C. B. **Use of a *Nested* polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis, 43 (2002), pp. 39–43. 2002.

MARTINS-MELO, F. R; LIMA, M. S; RAMOS JR, A. N; ALENCAR, C. H; HEUKELBACH, J. **Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis.** Tropical Medicine and International Health, 19 (8), 943–957. 2014.

MARTINS-MELO, F.R, RAMOS, A. N. J; ALENCAR, C.H; HEUKELBACH, J. **Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences.** J Infect Dev Ctries, 6(11), 817-824. 2012

MONTEÓN-PADILHA, V; HERNÁNDEZ-BECERRIL, N; ALLINASVERDUGO, M. A; ARANDA- FRAUSTRO, A; REYES, P. A. **Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients.** Arch. Med. Res, 32(1), 39- 9. 2001.

MORAES-SOUZA, H; FERREIRA-SILVA, M. M. **O controle da transmissão transfusional.** História sobre a Doença de Chagas no Brasil, 44, Suplemento II. 2011.

MORETTI, E; BASSO, B; CASTRO, I; PAEZ, M. C; CHAUL, M; BARBIERI, G; FEIJOO, D. C; SARTORI, M. J; PAEZ, R. C. **Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38(1), 53-55. 2005.

MOSER, D. R; KIRCHHOFF, L. V; DONELSON, J. **Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction.** Jornal Clinic Microbiol, 27, 1477 – 1482. 1989.

MOYA, P. R; MORETTI, E. R. A. **Doença de chagas congênita.** In: DIAS, J. C. P; COURA, JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 486. 1997.

MURCIA, L; CARRILERO, B; SAURAC, D; IBORRA, M. A; SEGOVIA, M. **Enferm Infecç Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas.** Microbiol Clin, 31(Supl 1), 26-34. 2013

NDAO, M; KELLY, N; NORMANDIN, D; MACLEAN, J. D; WHITEMAN, A; KOKOSKIN, E; AREVALO, I; WARD, B.J. ***Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: Comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked Immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as Screening tests for evaluation of monkey-related injuries.** Comp Med, 50(6), 658–665. 2000.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** Ed. 11, São Paulo: Atheneu, 2004.

NÓBREGA, A. A; GARCIA, M. H; TATTO, E; OBARA, M. T; COSTA, E; SOBEL, J; ARAUJO, W. N. **Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açai Palm Fruit, Brazil.** Emerging Infectious Diseases, 15 (4). 2009.

NOIREAU, F. **Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 104(Suppl. I), 60-64. 2009.

NORMAN, F. F; LÓPEZ-VÉLEZ, R. **Mother-to-child transmission of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas disease): a neglected problem.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Advance. 2014.

NOYA, B. A; COLMENARES, C; RUIZ-GUEVARA, R; DÍAZ-BELLO, Z; NOYA, O. **La transmisión oral en la enfermedad de Chagas.** Revista de la Facultad de Medicina, 33(2). 2010.

NYBO, K. **BioTechniques.** 49(2), 555–556. 2010

O'BRIEN, S. F; SCALIA, V; GOLDMAN, M; FAN, W; YI, Q; DINES, I. R; HUANG, M; NDAO, M; FEARON, M. A. **Selective testing for *Trypanosoma cruzi*: the first year after implementation at Canadian Blood Services.** Transfusion, 53. 2013.

OLIVEIRA, M. F; NAGAO-DIAS, A. T; PONTES, V. M. O; JÚNIOR, A. S. S; COELHO, H. L. L; COELHO, I. C. B. **Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil.** Revista de patologia tropical, 37 (3), 209-228. 2008.

PAVIA, P. X; MONTILLA, M; HERRERA, C. G; OSPINA, J. M; MANRIQUE, F; NICHOLLS, R. S; PUERTA, C. **Reporte del primer caso de enfermedad de Chagas transplacentaria analizado por AP-PCR en Moniquirá, Boyacá.** Biomédica, 29, 513-22. 2009.

PEREIRA, B. I; NAZARETH, C; MALCATA, L; ALVES, H; FERNÁNDEZ, J. R; SARGENTO, C; CUNHA, S. **Infecções parasitárias transmitidas por transfusão de sangue.** Infecções parasitárias transmitidas por transfusão de sangue , Acta Med Port, 24(S4), 897-906. 2011.

PEREIRA, G. A; LOUZADA-NETO, F; BARBOSA, V. F; FERREIRA-SILVA, M. M; MORAES-SOUZA, H. **Performance of six diagnostic tests to screen for Chagas disease in blood banks and prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among donors with inconclusive serology screening based on the analysis of epidemiological variables.** Rev Bras Hematol Hemoter, 34(4), 292 - 297. 2012

PIRÓN , M; FISA , R; CASAMITJANA , N; LÓPEZ-CHEJADE , P; PUIG , L; VERGÉS , M; GASCÓN , J; PRAT , J. G. I; PORTÚS , M; SAULEDA, S. **Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples.** Acta Tropica, 103(3), 195-200. 2007.

RASSI, A. J; RASSI, A; MARIN-NETO, J.A. **Chagas disease.** Lancet, 375, 1388–1402. 2010

RASSI, A.J; RASSI, A; REZENDE, J.M. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease).** Infect Dis Clin N Am 26, 275–291. 2012

RIBEIRO dos SANTOS, R; ROSSI, MA; LAUS, JL; SANTANA SILVA, J; SAVINO, W; MENGEL, J. **Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*.** J. exp. Med, 175, 29-39. 1992.

REQUENA, J.M; JIMENEZ-RUIZ, A; SOTO, M; LOPEZ, M.C; ALONSO, C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. Mol Biochem Parasitol, 51, 271 – 280. 1992

RUEDA, K; TRUJILLO, J. E; CARRANZA, J. C; VALLEJO, G. A. **Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* : una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos.** Biomédica, 34 (4). 2014.

SABINO, E.C; LEE, T.H; MONTALVO, L; NGUYEN, M.L; LEIBY, D.A; CARRICK, D.M; OTANI, M.M; VINELLI, E; WRIGHT, D; STRAMER, S.L; BUSCH, M. **Antibody levels correlate with detection of *Trypanosoma cruzi* DNA by sensitive PCR assays in seropositive blood donors and possible resolution of infection over time.** Transfusion, 53(6), 1257–1265. 2013.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, 3^a ed. 2001.

SANTOS-BUCH, C. A; TEIXEIRA, A. R. L. **The immunology of experimental Chagas disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro.** J. exp. Med, 140, 38-53. 1974.

SATHLER-AVELAR, R; VITELLI-AVELAR, D. M; ELÓI-SANTOS, S. M; GONTIJO, E. D; TEIXEIRA-CARVALHO, A; MARTINS-FILHO, O. A. **Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens.** BMC Infectious Diseases, 12,123. 2012.

SCHIJMAN, A. G; BISIO, M; ORELLANA, L; SUED, M; DUFFY, T; MEJIAJARAMILLO, A. M; CURA, C; AUTER, F; VERON, V; QVARNSTROM, Y; DEBORGGRAEVE, S; HIJAR, G; ZULANTAY, I; LUCERO, R. H; VELAZQUEZ, E; TELLEZ, T; SANCHEZ LEON, Z; GALVÃO, L; NOLDER, D; MONJE RUMI, M; LEVI, J. E; RAMIREZ, J. D; ZORRILLA, P; FLORES, M; JERCIC, M. I; CRISANTE, G; AÑEZ, N; DE CASTRO, A. M; GONZALEZ, C. I; ACOSTA VIANA, K; YACHELINI, P; TORRICO, F; ROBELLO, C; DIOSQUE, P; TRIANA CHAVEZ, O; AZNAR, C; RUSSOMANDO, G; BÜSCHER, P; ASSAL, A; GUHL, F; SOSA ESTANI, S; DA SILVA, A; BRITTO, C; LUQUETTI, A; LADZINS, J. **International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients.** PLoS Negl Trop Dis, 5(1): e931. 2011.

SHAMSUZZAMAN, S. M; FURUYA, M; KORENAGA, M; IMAMURA, K; HASHIGUCHI, Y. **Use of urine samples from healthy humans, nephritis patients or other animals as an alternative to foetal calf serum in the culture of *Leishmania (L.) donovani* in vitro.** Ann Trop Med Parasitol, 93, 613–620. 1999.

SHIKANAI-YASUDA, M. A; BRISOLA MARCONDES, C; GUEDES, L. A; SIQUEIRA, G. S; BARONE, A. A; DIAS, J. C. P; AMATO NETO, V; TOLEZANO, J. E; PERES, B. A; ARRUDA JR, E. R; LOPES, M. H; SHIROMA, M; CHAPADEIRO, E. **Possible oral transmission of acute Chagas' Disease in Brazil.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 33 (5). 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M. A; CARVALHO, N. B. **Oral Transmission of Chagas Disease.** Emerging Infections d Cid, 54. 2012

SILVA, A. R. **Transmissão Sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*.** 2013. 94 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas, Universidade de Brasília.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis.** Veterinary Parasitology, 160(2009), 55–59. 2009.

SIRACUSANO, S; SILVESTRI, T; CASOTTO, D. **Sexually transmitted diseases: epidemiological and clinical aspects in adults.** Urologia, 81(4), 200 – 208. 2014.

STORINO R, JÖRG ME. **Vías de infección y aspectos clínicos.** In R Storino, J Milei (orgs). Enfermedad de Chagas, Bayma, Buenos Aires. 1994.

STURM, N. R; DEGRAV, W; MOREL, C; SIMPSON, L. **Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplastide minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease.** Mol Biochem Parasitol, 33, 205 – 214. 1989.

TEALE, A. J; BLEWETT, D. A; MILLER, J. K. **Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and semen secretion of *Toxoplasma*.** Vet. Rec, 111(3), 53-55. 1982.

TEIXEIRA, A. R. L; HECHT, M.M; GUIMARO, M.C; SOUSA, A.O; NITZ, N. **Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and autoimmunity.** Clinical microbiology reviews, 24, 592–630. 2011

TEIXEIRA, A. R. L; NITZ, N; GUIMARO, M. C; GOMES, C; SANTOS-BUCH, C. A. **Chagas disease.** Postgrad Med J, 82, 788–798. 2006.

TEIXEIRA, A. R; NITZ, N; BERNAL, F.M; HECHT, M.M. **Parasite induced genetically driven autoimmune Chagas heart disease in the chicken model.** J Vis Exp, 29(65): 3716. 2012

TEIXEIRA, A. R. L; ROTERS, F; MOTT, K. E. **Acute Chagas de disease.** Gazeta Médica da Bahia, 70: 176-186. 1970

TEIXEIRA, D. E; BENCHIMOL, M; CREPALDI, P. H; SOUZA, W. **Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease.** Plos Neglected Tropical Disease, 6 (8), 1749. 2012.

- TEIXEIRA, M. M; GAZZINELLI, R. T; SILVA, J. S. **Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection.** Trends Parasitol, 18 (6), 262-265. 2002.
- TOSO, A. M; VIAL, F. U; GALANTI, N. **Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral.** Rev Med Chile, 139, 258-266. 2011.
- VEXENAT, A. C. **Diagnóstico sorológico diferencial de infecções causadas por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania chagasi* e outras doenças crônicas.** Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 1993.
- VEXENAT, A. C; SANTANA, J. M; TEIXEIRA, A. R. **Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38: 177-185. 1996.
- VIANNA, G. **Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 3: 276-294. 1911.
- VINHAES, M. C; OLIVEIRA, S. V; REIS, P. O; SOUSAB, A. C. L; SILVA, R. A; OBARA, M. T; BEZERRA, C. M; COSTA, V. M; ALVES, R. V; GURGEL-GONÇALVES, R. **Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis.** Acta Tropica, 137(2014), 105–110. 2014.
- VIRREIRA, M; TORRICO, F; TRUYENS, C; ALONSO-VEJA, C; SOLANO, M; CARLIER, Y; SVOBODA, M. **Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection.** Am. J. Trop. Med, 68(5), 574-582. 2003.
- WENDLING, A. P. B; VITELLI-AVELAR, D. M; SATHLER-AVELAR, R; GEIGER, S. M; TEIXEIRA-CARVALHO, A; GONTIJO, E. D; ELÓI-SANTOS, S. M; MARTINS-FILHO, O. A. **The use of IgG antibodies in conventional and non-conventional immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease.** Journal of Immunological Methods, 370(2011), 24–34. 2011.

WERNER, A. P. T. B; INÉZ ZULANTAY, A. **Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.** Rev Med Chile, 139, 247-257. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Fact sheet N°340. 2015. Acceso em: 04 de maio de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Sexually transmitted infections (STIs).** Fact sheet N°110. 2013. Acceso em: 18 de abril de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis.** World Health Organ Tech Rep Ser (975), XII: 1-100. 2012.



Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM

Brasília, 22 de fevereiro de 2011

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “ Avaliação de Possível Transmissão Sexual do T. Cruzi em M masculino”, UnBDoc 10411/2011, sob responsabilidade da Mariana Machado Hecht, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM

Anexo B

Tabela 3. Resultados dos testes parasitológicos, sorológicos, moleculares e imunohistológicos, dos camundongos estudados.

| Resultados Transmissão sexual | | | | | | | |
|-------------------------------|----------|-------------|-----------|-------------------------------|---------------------|------------------------|----------|
| Amostras | Grupo | Hemocultura | Esfregaço | Diagnóstico sorológico | | Diagnóstico molecular | |
| | C | | | ELISA (IgG) | IFI | PCR (PON 1/2 e TCZ) | qPCR |
| IP - CM 1 | | Negativo | Negativo | Reagente (33,3 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CF 2 | | Negativo | Negativo | Reagente (1,9 U/ μ L) | Reagente (1/80) | Positivo | Positivo |
| IP - CM 3 | | Negativo | Negativo | Reagente (28,7 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CF 4 | | Negativo | Negativo | Reagente (2,5 U/ μ L) | Reagente (1/80) | Positivo | Positivo |
| IP - CM 5 | | Negativo | Negativo | Reagente (28,4 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CF 6 | | Negativo | Negativo | Reagente (2,7 U/ μ L) | Reagente (1/40) | Positivo | Positivo |
| IP - CM 7 | | Negativo | Negativo | Reagente (34,8 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CF 8 | | Negativo | Negativo | Reagente (2,9 U/ μ L) | Reagente (1/160) | Positivo | Positivo |
| IP - CM 9 | | Negativo | Negativo | Reagente (32,4 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CF 10 | | Negativo | Positivo | Reagente (1,5 U/ μ L) | Reagente (1/80) | Positivo | Positivo |

| | | | | | | | |
|------------|----------|-----------------|-----------------|----------------------------------|---------------------|----------|----------|
| IP - CF 11 | D | Negativo | Negativo | Reagente (43,5 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CM 12 | | Negativo | Positivo | Reagente (4,6 U/ μ L) | Reagente (1/40) | Positivo | Positivo |
| IP - CF 13 | | Negativo | Negativo | Reagente (47,8 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CM 14 | | Negativo | Negativo | Reagente (2,7 U/ μ L) | Reagente (1/40) | Positivo | Positivo |
| IP - CF 15 | | Negativo | Negativo | Reagente (46,1 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CM 16 | | Negativo | Negativo | Reagente (2,3 U/ μ L) | Reagente (1/40) | Positivo | Positivo |
| IP - CF 17 | | Negativo | Negativo | Reagente (49,2 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CM 18 | | Negativo | Negativo | Reagente (1,7 U/ μ L) | Reagente (1/80) | Positivo | Positivo |
| IP - CF 19 | | Negativo | Negativo | Reagente (37,8 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| IS - CM 20 | | Negativo | Negativo | Reagente (1,6 U/ μ L) | Reagente (1/80) | Positivo | Positivo |
| CP - CF 21 | | Negativo | Negativo | Reagente (36,7 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| CP - CM 23 | | Negativo | Negativo | Reagente (35,8 U/ μ L) | Reagente (1/320) | Positivo | Positivo |
| CN - CM 22 | | Negativo | Negativo | Não Reagente (0,8 U/ μ L) | Não Reagente | Negativo | Negativo |
| CN - CF 24 | | Negativo | Negativo | Não Reagente (0,8 U/ μ L) | Não Reagente | Negativo | Negativo |

Resultados transmissão congênita

| Amostra | Grupo | Elisa | PCR convencional | <i>Nested</i> PCR |
|---------|----------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| | E | IgM | (PON 1/2) | (TCZ) |
| 30 | | Indeterminado (0,9 U/μL) | Negativo | Positivo |
| 32 | | Não reagente (0,8 U/μL) | Positivo | Positivo |
| 35 | | Indeterminado (0,9 U/μL) | Positivo | Positivo |
| 36 | | Reagente (1,2 U/μL) | Positivo | Positivo |
| 38 | | Reagente (1,1 U/μL) | Negativo | Positivo |
| 39 | | Indeterminado (1,0 U/μL) | Negativo | Positivo |
| 40 | | Indeterminado (0,9 U/μL) | Positivo | Positivo |
| 42 | | Indeterminado (0,9 U/μL) | Negativo | Positivo |
| 44 | | Não reagente (0,8 U/μL) | Positivo | Positivo |
| 48 | | Não reagente (0,8 U/μL) | Negativo | Positivo |
| 49 | | Não reagente (0,7 U/μL) | Negativo | Positivo |
| 50 | | Reagente (1,2 U/μL) | Positivo | Positivo |

| | | | | |
|-----------|--|-----------------------------------|----------|----------|
| 51 | | Reagente (1,2 U/ μ L) | Positivo | Positivo |
| 52 | | Indeterminado (0,9 U/ μ L) | Negativo | Positivo |
| 53 | | Indeterminado (0,9 U/ μ L) | Positivo | Positivo |
| 54 | | Reagente (1,2 U/ μ L) | Negativo | Positivo |
| 55 | | Indeterminado (1,0 U/ μ L) | Negativo | Positivo |
| 56 | | Indeterminado (0,9 U/ μ L) | Positivo | Positivo |
| 57 | | Indeterminado (1,0 U/ μ L) | Positivo | Positivo |
| 58 | | Reagente (1,2 U/ μ L) | Positivo | Positivo |
| 59 | | Reagente (1,3 U/ μ L) | Negativo | Positivo |
| 60 | | Indeterminado (1,0 U/ μ L) | Negativo | Positivo |
| 61 | | Indeterminado (1,0 U/ μ L) | Positivo | Positivo |
| 62 | | Reagente (1,1 U/ μ L) | Negativo | Positivo |
| 64 | | Reagente (1,1 U/ μ L) | Positivo | Positivo |
| 65 | | Reagente (1,1 U/ μ L) | Positivo | Negativo |

Anexo C

ARTIGO SUBMETIDO

'*Succintus*'

Sexual Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Murine Model

Marcelle Ribeiro^a, Nadjar Nitz^a, Camilla Santana^a, Aline Moraes^a, Luciana Hagström^a, Rafael Andrade^a, Adriano Rios^a, Alessandro Sousa^a, Bruno Dallago^b,
Rodrigo Gurgel-Gonçalves^c, Mariana Hecht^{*a}

^a Interdisciplinary Laboratory of Biosciences, Faculty of Medicine, University of Brasilia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, ^bLaboratory of Animal Welfare, ^cLaboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, Faculty of Medicine, University of Brasilia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Federal District, Brazil. Zip Code: 70.910-900.

* Phone number: +55 61 3107-1898; Fax number: + 55 61 3107-4645

* E-mail address: marianahecht@gmail.com

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is mainly transmitted by blood-sucking triatomines, but other routes also have epidemiological importance, such as blood transfusion and congenital transmission. Although the possibility of sexual transmission of *T. cruzi* has been suggested since its discovery, few studies have been published on this subject. We investigated acquisition of *T. cruzi* by sexual intercourse in an experimental murine model. Male and female mice in the chronic phase of Chagas disease were mated with naive partners. Parasitological, serological and molecular

tests demonstrated the parasites in tissues and blood of partners. These results confirm the sexual transmission of *T. cruzi* in mice.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chronic Chagas disease; Sexual transmission; Murine model

Sexually transmitted infections (STIs) place a heavy economic burden on health care systems worldwide. Several organisms are classified as causative agents of STIs, including viruses, bacteria, fungi and others parasitic pathogens. Among the pathologic protozoa, the main species transmitted through sexual intercourse is *Trichomonas vaginalis*, the etiological agent of trichomoniasis, with 248 million new cases per year (WHO, 2005). In addition, parasites such as amoebas and *Giardia* spp. can be transmitted by anal-oral intercourse (Levine, 1991). Some reports also have considered the possibility of venereal transmission of other protozoans, especially trypanosomatids. Studies in horses have demonstrated that transmission of *Trypanosoma equiperdum* occurs directly from animal to animal during coitus (Katz, 2008). Furthermore, other studies have demonstrated sexual transmission of *Leishmania* spp. in dogs (Silva et al., 2008; Turchetti et al., 2014), showing the possibility of venereal transmission of this flagellate without the participation of the insect vector. Thus, further research should be conducted to determine the sexual transmission of other protozoans.

Chagas disease (CD), caused by *Trypanosoma cruzi*, is a major parasitic disease in Latin America. It is estimated that about 8 million people infected with the parasite worldwide, and 100 million are at risk of acquiring infection (WHO, 2014). Initially considered a rural endemic disease, CD has spread to cities due to urban migration. Some countries free of vector transmission have also been affected by this

disease due to immigration, a process that has been described in Australia, Canada, United States and Europe. Therefore, CD can be considered an emerging disease in developed countries ([WHO, 2014](#)).

CD consists of two clinical phases: acute and chronic. Acute infection is often asymptomatic and self-limited, but some symptoms may arise, such as fever, fatigue, body aches, headache, rash, loss of appetite, diarrhea and vomiting. The chronic phase lasts several years and can remain asymptomatic. In 20-30% of cases, however, clinical changes can be observed in many organ systems and tissues, including the heart and digestive system (causing the so-called “mega syndromes” of megacolon and megaesophagus), and lead to premature death, usually due to cardiac dysfunction. Unfortunately, Chagas remains a neglected disease. There are no vaccines available; few anti parasitic drugs are effective; and, even so, can only mitigate the manifestations of the acute phase of the disease, leaving millions of individuals who have been infected for decades without appropriate care ([Teixeira et al., 2011](#)). The best way to fight CD is thus to interrupt the various routes of parasite transmission.

T. cruzi is mainly transmitted through contaminated feces of blood-sucking bugs after haematophagy. These insects belong to the family Reduviidae, subfamily Triatominae, which contains more than 150 species ([Justi et al., 2014](#)). Most are capable of transmitting the infection. The range of triatomines extends from the southern United States to southern Patagonia, and they are common throughout Latin America ([WHO, 2014](#)). *T. cruzi* endemicity is also associated to other modes of transmission, such as blood transfusions, laboratory accidents, organ transplantation, and congenital and oral transmissions. In non-endemic areas, blood transfusion is

the major route of transmission in countries with substantial populations of Latin American immigrants, including the United States, Spain, France, Switzerland and Canada. Vertical transmission of *T. cruzi* is also an important route for the spread of CD, even in non-endemic countries. It is estimated that congenital transmission of *T. cruzi* occurs in 5-10% of pregnancies of patients with CD. Oral transmission has been implicated in outbreaks of acute human CD often associated with severe illness (Sánchez and Ramirez, 2013).

The possibility of sexual transmission of *T. cruzi* has been discussed since the discovery of CD. However, few studies on the subject have been published. The first report was made by Vianna (1911), who observed the parasite in testes and found it to cause a series of histological changes therein. Amastigotes were also identified in histopathological sections of seminiferous tubes and ovarian theca cells of children who succumbed to acute CD (Teixeira et al., 1970). The presence of *T. cruzi* in menstrual blood has been demonstrated and is evidence in favor of sexual transmission (Jörg and Oliva, 1980). Other studies reported colonization of the urogenital tract of guinea pigs with the parasite: mice infected with different strains of *T. cruzi* showed a heavy parasite burden in ovaries, testes, interstitial cells, and seminiferous tubules (Carvalho et al., 1991; Carvalho et al., 2009). Additionally, inoculation of semen from infected mice into the peritoneal cavity of healthy animals has been found to generate amastigote nests in various tissues (Carvalho et al., 2009). Of interest, molecular tests have detected the presence of *T. cruzi* nuclear DNA in the semen of infected individuals, strengthening the hypothesis of sexual transmission of the parasite (Hecht et al., 2010). Nevertheless, sexual transmission of the *T. cruzi* has not been proven conclusively to date.

Within this context, we sought to investigate sexual transmission of *T. cruzi* in a murine model by mating chronically infected mice with healthy partners. Ten sexually mature BALB/c mice (five males and five females) were inoculated intraperitoneally with 1×10^3 *T. cruzi* Berenice trypomastigote forms. These animals were mated with naive partners 90 days post infection and twice more in subsequent fertile periods. In total, were used 28 BALB/c mice, homogeneous with respect to weight and age, which were allocated into groups as follows: A) five *T. cruzi*-infected males mated with five naive females (animals 1 to 10); B) five *T. cruzi*-infected females mated with five naive males (animals 11 to 20); C) two negative couple (non-infected); and D) two positive couple (infected by intraperitoneal route). To confirm the occurrence of sexual transmission, we also assessed 26 mice from group A progeny (Group E). All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (UnB Protocol 10411/2011) and conducted in accordance with international guidelines. The presence of *T. cruzi* in mice peripheral blood was evaluated by microscopic examination of blood smear. Detection of anti- *T. cruzi* antibodies was performed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence (IFI), following protocols previously standardized in our laboratory (Hecht et al., 2010). For molecular experiments, 200 μ L of blood from each animal was obtained by cardiac puncture and DNA extraction was conducted using Wizard Genomic DNA Purification Kit[®] (Promega, USA) according to manufacturer instructions. Tissues from heart and testicles/ovary were also collected and DNA extraction was performed by Phenol/Chloroform method. DNA samples were quantitated in a NanoVue[®] system (GE Life Science, USA) and their quality evaluated by β -actin PCR. *T. cruzi* nuclear DNA from blood samples was amplified using PON1/2 primers (Requena et al., 1992) and TCZ primers, using a nested PCR

assay (Moser et al., 1989). PCR products were electrophoretic analyzed in a 1.3% agarose gel (Hecht et al., 2010). Nested quantitative PCR (qPCR) was employed to determine parasite load in blood, heart and testes/ovary (Marcon et al., 2002). Histological sections were examined for the presence of amastigote nests and tissue injury. Tissue sections from heart, skeletal muscle, intestine and testes or ovary were prepared for hematoxylin-eosin (HE) staining as described in Teixeira et al., 2012. Tissues sections were also used for immunochemical analysis after incubation with mouse serum followed by peroxidase-conjugated anti-mouse IgG.

Initially, we evaluated the occurrence of *T. cruzi* sexual transmission by identification of tripomastigotes in peripheral blood of naive mice crossbred with an intraperitoneally infected partner. In two cases, one female from Group A (20%) and one male from Group B (20%), it was possible to see the parasite in animal's blood by optical microscopy. After that, we determined *T. cruzi* sexual transmission by detection of specific anti-*T. cruzi* antibodies in naive partners. In groups A and B, ELISA and IFI demonstrated seroconversion in all mice (100%). Of interest, antibody titers detected in animals infected by intraperitoneal route were higher than those detected in groups infected through sex intercourse, showing no differences among male and females. Parasite load at the acute phase of *T. cruzi* infection influences the activation of the immune system at the late chronic phase of the disease (Marinho et al., 1999) and this could explain why infections acquired by sexual intercourse with chronically infected partners generates low antibodies production. The positivity rate and the plot of optical density (OD) readings obtained by ELISA for each group are shown in Fig.1A. IFI positivity is presented in Fig. 1B.

Infection was also evaluated by molecular techniques. PCRs yielded 250-bp using PON1/2 and 168-bp in nested TCZ PCR corresponding to parasite nuclear fragments in samples from all animals inoculated with *T. cruzi* intraperitoneally, while no bands were observed in non-infected animals before crossing with infected partners (Fig. 2A and 2B). In contrast, PCR performed with DNA extracted from animals after two pregnancies showed the presence of *T. cruzi* DNA in initially non infected sexual partners, indicating that naive female or male mice had acquired the infection through coitus. Corroborating serological results, the molecular diagnosis identified *T. cruzi* DNA in all animals of groups A and B, corresponding to a sexual transmission rate of 100%.

Since several studies have shown that *T. cruzi* also exhibits tropism to testicular tissue (Vianna, 1911; Carvalho et al., 2009) we employed a qPCR to compare parasite loads in testes, ovary, heart and blood. In intraperitoneally infected mice, the highest parasite load was identified in heart followed by testicles and ovary. Peripheral blood yielded smaller amounts of parasites. (Fig. 3). Thus, this confirms the presence of *T. cruzi* in reproductive system, but, at least in later parasitemias, *T. cruzi* has a preferential tropism for cardiac muscle cells (Caldas et al., 2012). In sexually infected mice, male and female showed differences in tissue parasite loads. Sexually infected females showed the same patterns found in intraperitoneally infected mice. However, sexually infected males demonstrated a reduced parasite load in heart, similar to testicles and blood loads. The higher parasite load observed in sexually infected female suggests a higher initial parasite infection. These data may indicate that semen is a better vehicle for *T. cruzi* transmission than vaginal secretions, carrying large quantities of parasites.

Histopathological analysis of heart, intestine, skeletal muscle and testicles/ovaries samples were performed to investigate the presence of amastigote nests in tissues of mice infected intraperitoneally or through coitus. No parasite was detected in cardiac tissue, although we noted the presence of moderate inflammation and destruction of cardiac fibers in mice infected by intraperitoneal route. The presence of inflammatory infiltrate in absence of amastigotes in tissues during the chronic phase of infection was already described. Of interest, inflammation in response to infection is essential for host resistance, but is also responsible for the pathology observed in chronic CD ([Teixeira et al., 2011](#)).

Finally, analysis of samples collected from group E was carried out to confirm sexual transmission, since congenital infection could only occur through previous infection of the mother (group A) by coitus. Of the 26 descendants, 14 (53.8%) animals were positive using PON1/2 primers, while 25 (96.2 %) yielded positive bands in Nested TCZ ([Fig. 2C](#)). This discrepancy in molecular diagnosis is probably due differences of probes and methodologies sensibility ([Marcon et al., 2002](#)). In contrast, serological tests confirmed the presence of IgM specific antibodies in 10 mice (38%). The higher rate of infected animals identified by PCR compared to serological tests may be also associated with the presence of a low parasite load ([Velázquez et al., 2014](#)). A similar event is found in patients infected with *T. cruzi* and treated with benznidazole: the reduction in parasitemia results in negative serological tests, although qPCR remains positive ([Duffy et al., 2013](#)). However, another aspect should be taken into account in any study of congenital transmission: immune tolerance to parasite antigens. This phenomenon can happen when a fetus is infected early during embryogenesis and infectious agents access the embryo before maturation of the immune system. In consequence, they are recognized as "self" and

do no specific antibodies against them are produced ([Malhotra et al., 2009](#)). Thus, our findings establish the use of PCR as advantageous in relation to immunoassays for the diagnosis of *T. cruzi* infection in transplacental infections.

In conclusion, parasitological, serological, and molecular assays showed that *T. cruzi* chronically infected mice transmitted the parasite to naive mates after sexual intercourse. To the best of our knowledge, this is the first confirmation of sexual transmission of *T. cruzi*, a route with great potential for spreading CD worldwide. This finding thus raises the possibility that a much larger number of people than estimated by the World Health Organization ([2014](#)) may be at risk of acquiring *T. cruzi*. The determination of this pathway in chronically infected animals is of paramount importance, since most individuals with CD are in the chronic phase. In addition, epidemiological surveys in triatomine-free areas are required to determine the infectivity rate in couples in which only one partner has a history of CD, thus helping to clarify the importance of this mode of transmission in human populations.

Acknowledgements

We thank: Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto for histopathological analysis. Ana de Cássia Rosa and Tércia Maria M. L. de Castro for technical assistance. INCT-Pecuária/MCT/CNPq/FAPEMIG for providing qPCR system.

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

[Caldas, S., Caldas, I.S., Figueiredo, L.D., Lima, W.G., Oliveira, R.P., Cecílio, A.B., Ribeiro, I., Talvani, A., Bahia, M.T., 2012. Real-time PCR strategy for parasite](#)

- quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Acta Tropica.123 (3), 170–177
- Carvalho, L.O., Abreu-Silva, A.L., Hardoim, D.J., Tedesco, R.C., Mendes, V.G., da Costa, S.C., Calabrese, K.S., 2009. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 90, 52-57.
- Carvalho, T.L., Ribeiro, R.D., Lopes, R.A., 1991. The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. I. Morphometric study of the vas deferens in the acute phase of the disease. *Exp. Pathol.* 41, 203-214.
- Duffy, T., Cura C.I., Ramirez, J.C., Abate, T., Cayo, N.M., Parrado, R., Bello, Z.D., Velazquez, E., Muñoz-Calderon, A., Juiz, N.A., Basile, J., Garcia, L., Riarte, A., Nasser, J.R., Ocampo, S.B., Yadon, Z.E., Torrico, F., de Noya, B.A., Ribeiro, I., Schijman, A.G., 2013. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7,e2000.
- Hecht, M.M., Nitz, N., Araujo, P.F., Sousa, A.O., Rosa, A.C., Gomes, D.A., Leonardecz, E., Teixeira, A.R., 2010. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. *PLoS One.* 5, e9181.
- Jörg, M.E., Oliva, R., 1980. Presencia de tripomastigotes en sangre menstrual de mujeres con tripanosomiasis cruzi. *Rev. Arg. Parasitol.* 1, 28–30.
- Justi S.A., Russo C.A., Mallet J.R., Obara M.T., Galvão C. 2014.Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).*Parasit Vectors.*;7:149.
- Katz, J.B., 2008. Dourine. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.* OIE, Paris. 845–851.

- Levine, G.I., 1991. Sexually transmitted parasitic diseases. *Prim Care*. 18,101-128.
- Malhotra, I., Dent, A., Mungai, P., Wamachi, A., Ouma, J.H., Narum, D.L., Muchiri, E., Tisch, D.J., King, C.L., 2009. Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med*. 6, e1000116.
- Marcon, G.E., Andrade, P.D., de Albuquerque, D.M., Wanderley, J. S., de Almeida, E.A., Guariento, M.E., Costa, S.C. , 2002. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43: 39-43.
- Marinho, C.R., Lima, M.R.D., Grisotto, M.G., Alvarez, J.M., 1999. Influence of Acute-Phase Parasite Load on Pathology, Parasitism, and Activation of the Immune System at the Late Chronic Phase of Chagas' Disease. *Infection and Immunity*. 67 (1), 308–318.
- Moser, D.R., Kirchoff, L.V., Donelson, J.E., 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. ClinMicrobiol*. 27, 1477-1482.
- Nybo, K., 2010. Immunology and Immunochemistry: ELISA. *BioTechniques*. 49(2), 555–556.
- Requena, J.M., Jimenez-Ruiz, A., Soto, M., Lopez, M.C., Alonso, C., 1992. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol*. 51, 271 – 280.

- Sánchez, L.V., Ramirez, J.D., 2013. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology*. 140, 147-159.
- Silva, F.L., Rodrigues, A.A., Rego, I.O., Santos, R.L., Oliveira, R.G. Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L., 2008. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.* 151, 86-90.
- Teixeira, A.R., Hecht, M.M., Guimaro, M.C., Sousa, A.O., Nitz, N., 2011. Pathogenesis of Chaga's disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 592-630.
- Teixeira, A.R., Nitz, N., Bernal, F.M., Hecht, M.M., 2012. Parasite induced genetically driven autoimmune Chagas heart disease in the chicken model. *J. Vis. Exp.* 29, 3716.
- Teixeira, A.R., Roters, F., Mott, K. E., 1970. Acute Chagas disease. *Gaz. Méd. Bahia.* 70, 176-186.
- Turchetti, A.P., Souza, T.D., Paixão, T.A., Santos, R.L., 2014. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J.Infect. Dev.Ctries.* 8, 403-407.
- Velázquez E.B., Rivero R., De Rissio A.M., Malagrino N., Esteva M.I., Riarte A.R., Ruiz A.M., 2014. Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop.* 137:195-200.
- Vianna, G., 1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 3, 276-294.
- WHO., 2005. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, syphilis and *Trichomonas*

vaginalis: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates. W. Press, Editor 2011: Geneva, Switzerland

WHO., 2014. Chagas disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet N°340

Figure Legends:

Figure 1. Identification of specific anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in naive mice mated with partners in the chronic phase of Chagas disease.

(A) Antibody titers (IgG) determined by ELISA in each group. Optical densities (OD) were read at 490 nm. Test and control serum assays were run in triplicate. Antibodies titration is represented by individual values and the mean (bar). Statistical significance was determined by Tukey's test (* = $p \leq 0.05$). Reference values were determined according [Nybo, 2010](#). Negative ≤ 0.8 ; Indetermined = 0.9 – 1.1; Positive ≥ 1.2 . **(B)**. IFI consisted of incubation of serially diluted sera (1:20 – 1:320). Fluorescein-labeled anti-mouse IgG was diluted 1:200. Positive green fluorescence was deemed indicative of infection in serum dilutions of 1:40 and above. Bars, 20 μm . PC, positive control; NC, negative control; IPF, intraperitoneally infected female; IPM, intraperitoneally infected male; SF, sexually infected female; SM, sexually infected male.

Figure 2. Presence of *Trypanosoma cruzi* nuclear DNA in blood collected from couples and progeny.

(A) Top panel shows 250-bp bands amplified with *T. cruzi* PON1/2 primers only in mice infected with trypomastigote forms intraperitoneally before mating with healthy animals (odd numbers). Bottom panel shows specific bands formed by PCR in partners after breeding (even numbers). **(B)** Top panel shows PCR products generated using TCZ 3/4 primers with 168-bp in animals infected intraperitoneally before mating with

naive partners. Bottom panel shows the specific band in all animals after mating. **(C)** Identification of *T. cruzi* nuclear DNA in offspring confirms infection of females by the sexual route, with subsequent congenital transmission. Top panel shows 250-bp bands, amplified with *T. cruzi* PON1/2 primers (odd numbers). Bottom panel shows specific bands using TCZ 3/4 primers with 168-bp in progeny. B, Blank; NC; negative controls; PC; positive controls; Group A; infected males mated with healthy females; Group B; healthy males mated with infected females; Group C; healthy male mated with healthy females; Group D; infected male mated with infected female; Group E, group A progeny.

Figure 3. Determination of parasite load in different tissues. Nested qPCR was performed using TCZ primers to estimate parasite burden in heart, blood and testicles/ovary of mice from groups A, B, C and D. Protocol details can be found in [Marcon et al., 2002](#). Graphic represents *Trypanosoma cruzi* load (parasites U / 100 ng DNA, mean \pm standard deviation) in different tissues of infected animals. PI, intraperitoneally infected mice; SI, sexually infected mice. Data were analyzed using Two-Way ANOVA and the complementary Tukey's test, * = $p \leq 0.05$.