

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
LABORATÓRIO INTERDISCIPLINAR DE BIOCÊNCIAS

INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE A
MICROBIOTA INTESTINAL NO HOSPEDEIRO MAMÍFERO

NAYRA SUÉLEN GOMES DIAS ALVES

BRASÍLIA-DF

2020

NAYRA SUÉLEN GOMES DIAS ALVES

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*
SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL NO HOSPEDEIRO MAMÍFERO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências da saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. (a) Dr. (a) Mariana Machado Hecht

BRASÍLIA

2020



**Universidade De Brasília
Faculdade De Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
Laboratório Interdisciplinar de Biociências**

Dissertação de Mestrado

NAYRA SUÉLEN GOMES DIAS ALVES

Título:

**Influência da Infecção por *Trypanosoma cruzi* sobre a microbiota
intestinal no hospedeiro mamífero**

Banca examinadora:

Prof. Dra. Mariana Machado Hecht
Presidente/Orientadora
PPGCM/UnB

Profa. Dra. Carla Nunes de Araújo
Membro Titular
PPGCM/UnB

Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago
Membro Titular
Externo

Prof. Dra. Laila Salmen Espíndola
Membro suplente
PPGMT/UnB

Brasília, 20 de Março de 2020

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Não abandone a sabedoria, e ela o protegerá; ame-a, e ela cuidará de você. O conselho da sabedoria é: procure obter sabedoria; use tudo que você possui para adquirir entendimento. Dedique alta estima à sabedoria, e ela o exaltará; abrace-a, e ela o honrará (Provérbios 4:6-8)

“É preciso que você se torne a mudança que deseja ver no mundo” (Gandhi)

DEDICATÓRIA

A meus pais (Abner e Silvania) e aos meus irmãos (Romantiezer e Efraym) e a todos que acreditam no poder da educação e que não desistem mesmo em tempos difíceis, como disse Issac Newton: “Construímos muitos muros e poucas pontes”. Porém bem-aventurado são aqueles que seguem na luta por um país melhor, que superam todos os desafios impostos.

AGRADECIMENTOS

“ O senhor é a minha força e o meu escudo; nele confio o meu coração” (Salmos 28.7 a).

Ao longo da jornada na UnB iniciada em 2012, adquiri muito crescimento pessoal e profissional, que foram enriquecidos pela presença, apoio e colaboração de pessoas que fizeram e fazem a diferença na minha vida, me ajudando a prosseguir nessa jornada.

Agradeço assim aos meus pais Abner e Silvania, que são minha base e exemplo e aos meus irmãos Romantiezer e Efraym, pois eles sempre apoiam as minhas decisões, são pacientes e são meu suporte.

Agradeço à minha orientadora Mariana Hecht que me acolheu em 2016, ainda na graduação e me acompanha até hoje, obrigado pela confiança, pelo exemplo de como ser docente e pela segurança que é passada em todos os momentos, me sinto muito privilegiada por ser sua orientanda.

À professora Nadjar Nitz que sempre está disposta a ajudar, orientar e a aconselhar e enriquecer o trabalho desenvolvido e por todo apoio a mim concedido. Agradeço também à professora Luciana Hagström-Bex, que sempre esteve disponível e disposta a ajudar, seja na qPCR seja na eutanásia ou compartilhando orientações e dicas. Vocês são muito importantes nessa jornada.

Aos demais professores que sempre me auxiliaram, ao professor Ricardo Pratesi, as professoras Eliana dos Santos, Juliana Lott.

Aos meus amigos Andressa Ribeiro, Gislane Ribeiro, Nélio Gomes e Thais Barros, que sempre estiverem presente me aconselhando, fortalecendo e animando nos bons momentos e nos momentos de maior estresse e por sempre acreditarem em mim, nessa amizade de 8 anos.

À Marina Dias que me acompanha no laboratório há um ano e meio, crescemos e a aprendemos muito juntas, obrigada pelo auxílio prestado pela eficiência e cuidado e pela paciência. Agradeço ao Carlito Junior por estar sempre disposto a me ajudar sendo sempre atencioso e eficiente. Agradeço à Sônia Frantz pelo zelo e cuidado e também à Clerrane que me ajudaram em diversos experimentos.

À Jaqueline Dias e Alessandro Wanzeller que sempre estiveram dispostos a me ouvir e sempre me apoiam e me incentivam. Agradeço a Vanessa Ribeiro, Yo Hwa, Daniela Alves, Tainara Pacheco e Letícia Leal pela amizade e apoio.

Aos meus companheiros de laboratório Aline, Bruna, Tamires, Ester, Cássia, Moisés e Tayane que me ensinaram muitas técnicas além de estar sempre disponíveis além de proporcionar bons momentos, são exemplo para mim. Agradeço também a Isabella, Marília, Maria Clara, Emanuella, Marcelle e Geysa pela ajuda, e pela companhia.

A colaboração externa foi fundamental nesse trabalho assim agradeço à professora Eliane Ferreira Noronha que disponibilizou seu laboratório e pela ajuda do Pedro Ricardo Vieira Hamann que dedicou seu tempo para me auxiliar no cultivo das bactérias anaeróbicas, de forma muito atenciosa e prestativa. Agradeço à Clênia Azevedo que me ensinou muito na parte inicial do mestrado sendo sempre gentil e prestativa. Agradeço a farmacêutica Leandra Sá e a Farmacotécnica Farmácia de manipulação pela doação dos *Lactobacillus*. Agradeço ao Veterinário da Faculdade de Medicina da UnB, Rafael, por sempre está disposto a ajudar e aos técnicos, principalmente ao Wilson e ao Derison por serem sempre prestativos.

RESUMO

A Doença de Chagas afeta milhões de pessoas e é uma das principais causas de morte na América Latina. A prevenção e o desenvolvimento de um tratamento eficaz para esta infecção podem ser favorecidos por uma compreensão mais aprofundada da interação do *Trypanosoma cruzi*, seu agente etiológico, com a microbiota intestinal de seus hospedeiros vertebrados. No presente estudo, realizamos revisão sistemática para estabelecer os conhecimentos produzidos sobre o tema pela comunidade científica. Também foram realizadas análises experimentais, por meio de PCR quantitativa (qPCR), para identificar os principais gêneros de bactérias (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Bacteroides* sp.) presentes no intestino de camundongos suscetíveis (BALB/c) ou resistentes (C57BL/6) à infecção. Ademais, a influência do parasito sobre a composição da microbiota intestinal foi investigada. A revisão sistemática revelou enorme escassez de artigos científicos que investigam o assunto, sendo apenas sete trabalhos selecionados pelos descritores e critérios de inclusão/exclusão estabelecidos. Os dados experimentais demonstraram que não há diferença significativa na composição da população microbiana intestinal das linhagens de camundongos estudadas, exceto para o gênero *Bacteroides*, que não foi identificado na linhagem C57BL/6. A infecção por *T. cruzi* não alterou o perfil de bactérias da microbiota intestinal de camundongos BALB/c, porém resultou em aumento significativo de *Bacteroides* sp. em C57BL/6. Desta forma, nossos resultados sugerem que a composição inicial da microbiota parece não ser o fator determinante de suscetibilidade/resistência dos animais, mas sim, a maneira como a microbiota é alterada na presença do *T. cruzi*. Assim, o enriquecimento populacional de *Bacteroides* pode ser o fator responsável pela maior resistência da linhagem C57BL/6 ao parasito. Entretanto, devido à carência de informações sobre o tema na literatura, mais estudos são necessários para esclarecer como a infecção por *T. cruzi* influencia o microbioma intestinal e quais as consequências de um possível desequilíbrio para seu hospedeiro.

Palavras chaves: Doença de Chagas; microbiota intestinal; *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

Chagas disease affects millions of people and is one of the leading causes of death in Latin America. The prevention and development of an effective treatment for this infection can be favored by a deeper understanding of the interaction of *Trypanosoma cruzi*, its etiological agent, with the intestinal microbiota of vertebrate hosts. In the present study, we carried out a systematic review to define the knowledge on the topic of the scientific community. Experimental analyses were also performed, using real time PCR (qPCR), to identify the main genera of bacteria (*Lactobacillus* sp, *Enterococcus* sp, *Escherichia coli*, *Clostridium* sp and *Bacteroides* sp) present in the intestine of *T. cruzi*-susceptible (BALB/c) or -resistant (C57BL/6) mice. In addition, the influence of the parasite on intestinal microbiota composition was investigated. The systematic review revealed an enormous lack of scientific articles investigating the subject, with only seven papers selected by the descriptors and inclusion/exclusion criteria. Was no significant difference in the composition of the gut microbiota population of the studied mice, except for the genus *Bacteroides*, which was not see in the C57BL/6 strain. Infection by *T. cruzi* did not change the bacteria profile in the gut of BALB/c mice, but resulted in a significant increase of *Bacteroides* sp in C57BL/6. Thus, our results suggest that the initial composition of the microbiota does not seem to be the determining factor of the susceptibility/resistance of the animals, but rather, the way how it is altered by the *T. cruzi*. Thus, *Bacteroides* enrichment may be the factor responsible for the greater resistance of the C57BL/6 strain to the parasite. However, due to the lack of information on this issue, further studies are needed to confirm our data and to clarify how *T. cruzi* infection affects the intestinal microbiome and what are the consequences of this disbiosis for the host.

Keywords: Chagas disease; gut microbiota; *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número estimado de imigrantes com infecção por <i>T. cruzi</i> em países não endêmicos.....	16
Figura 2: Situação do controle vetorial e transmissão da Doença de Chagas nas Américas.....	17
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 4- Grupos avaliados no estudo.....	30
Figura 5: Curva padrão para quantificação absoluta das bactérias analisadas no estudo.....	30
Figura 6: Fluxograma da seleção de artigos para a revisão sistemática.....	34
Figura 7: Seleção dos artigos da revisão sistemática a partir dos critérios de inclusão e exclusão.....	39
Figura 8: Análise qualitativa da presença de bactérias no intestino grosso de camundongos BALB/c e C57BL/6.....	42
Figura 9: Quantificação de bactérias totais da microbiota intestinal.....	43
Figura 10: Proporção de bactérias da microbiota intestinal em camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados ou não com o <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
Figura 11: Concentração de <i>Bacteroides</i> sp. na microbiota intestinal de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados ou não com o <i>Trypanosoma cruzi</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontos de interesse dos artigos selecionados na revisão sistemática.....	28
Tabela 2: Condições da PCR quantitativa para identificação de bactérias.....	33
Tabela 3: Artigos selecionados na revisão sistemática.....	38
Tabela 4: Quantidade de bactérias da microbiota intestinal murina.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Histórico	15
1.2 Epidemiologia.....	15
1.3 Vias de transmissão	17
1.4 Ciclo biológico	18
1.5 Manifestações clínicas	20
1.6 Patogênese da Doença de Chagas.....	21
1.7 A microbiota intestinal	22
1.8 Papel da microbiota intestinal em infecções parasitárias	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Revisão Sistemática	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Revisão Sistemática	29
6 MATERIAL E MÉTODOS- PARTE EXPERIMENTAL	34
6.1 Grupos experimentais	34
6.2 Cultivo de <i>T. cruzi</i> e infecção de camundongos	35
6.3 Coleta de amostras e extração de DNA	36
6.4 Cultivo de bactérias e extração de DNA.....	36
6.5 PCR quantitativa	37
6.6 Análise Estatística	40
7 RESULTADOS- PARTE EXPERIMENTAL	41

7.1	Caracterização da microbiota murina	41
7.1.1	Análise qualitativa de bactérias presentes no intestino	41
7.1.2	Quantificação de bactérias totais	42
7.1.3	Composição da microbiota intestinal	44
8	DISCUSSÃO	47
9	CONCLUSÕES	52
10	PERSPECTIVAS	53
11	Referências Bibliográficas	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro e sanitarista Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, na cidade Lassance, interior de Minas Gerais, que descreveu em fevereiro de 1909, o primeiro caso de um paciente diagnosticado com Doença de Chagas em uma criança de dois anos de idade chamada Berenice (CHAGAS, 1909). A infecção é transmitida a várias espécies de mamíferos, incluindo animais silvestres, domésticos e o homem, durante o repasto sanguíneo de insetos hematófagos pertencentes à família Reduviidae, popularmente conhecidos como barbeiro, fincão, chupança e bicudo (TEIXEIRA, Antonio; NASCIMENTO; STURM, 2011).

1.2 Epidemiologia

A Doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada e estima-se que existam cerca de 8 milhões de pessoas infectadas no mundo, com cerca de 10.000 mortes por ano, um elevado ônus para a saúde pública (TZIZIK; BORCHARDT, 2018). O maior número de pessoas infectadas está concentrado em áreas rurais da América Latina, associado ao baixo desenvolvimento socioeconômico dos países endêmicos, onde há moradias precárias e a alta incidência de vetores. Entretanto, os movimentos migratórios fizeram com que a infecção pelo *T. cruzi* se dispersasse por todo o mundo, sendo atualmente considerada uma doença emergente na América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, com uma alta morbidade e letalidade, gerando importante custo para a saúde pública mundial como demonstrado na Figura 1 (LIDANI et al., 2019; MARTINS-MELO et al., 2014).

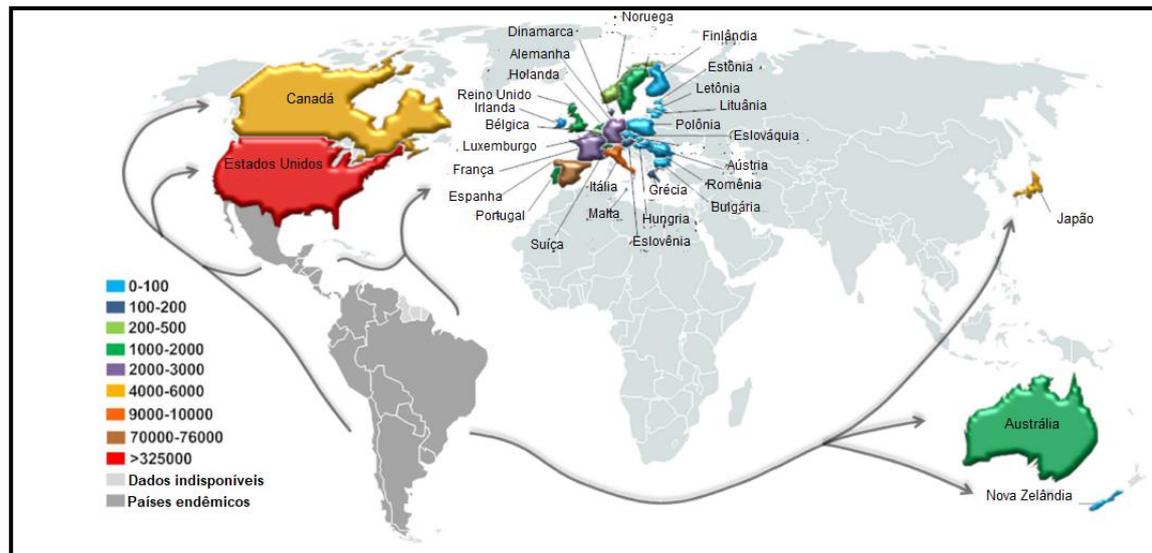


Figura 1. Número estimado de imigrantes com infecção por *T. cruzi* em países não endêmicos (Adaptado de Lidani et al, 2019).

A via vetorial é a principal forma de transmissão do *T. cruzi*, os governos então desde da década de 50 começaram a adotar estratégia de combate ao vetor nos países endêmicos Figura 2. No Brasil, o número de casos novos de Doença de Chagas vem decrescendo significativamente nas últimas décadas, em decorrência de ações efetivas de controle vetorial, que resultaram na interrupção da transmissão pelo principal vetor, o *Triatoma infestans* em 2006. Além disso, a implementação do programa de controle nos bancos de sangue resultou na diminuição significativa da transmissão pela via transfusional. Atualmente, casos de Doença de Chagas aguda estão sendo notificados principalmente na região amazônica, relacionados ao consumo de alimentos contaminados. Assim, é de fundamental importância a continuidade das ações de controle e vigilância entomológica para que este progresso seja mantido (MARTINS-MELO et al., 2014; SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015).

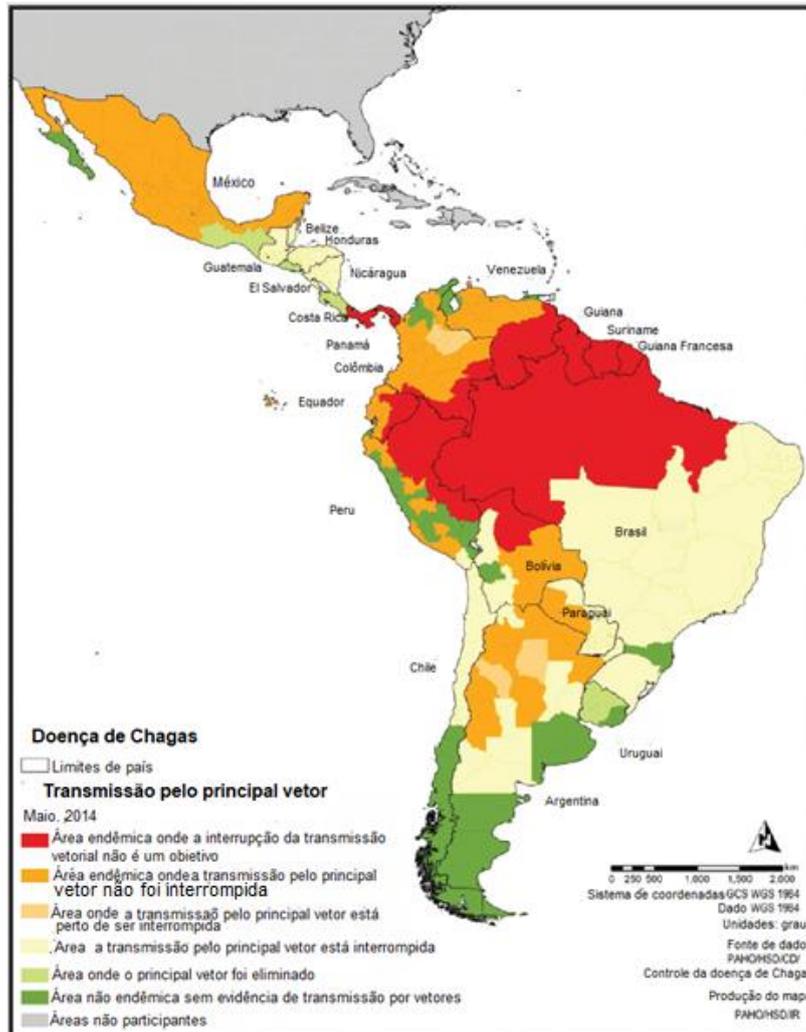


Figura 2. Situação do controle vetorial e transmissão da Doença de Chagas nas Américas. (Adaptado de SOSA-ESTANI & SEGURA, 2015).

1.3 Vias de transmissão

A principal forma de adquirir a infecção pelo *T. cruzi* é por meio da via vetorial, quando o inseto vetor elimina as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes, após o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero, por meio de fecação ou danos no local da inoculação a forma infectante entra em contato com a corrente sanguínea, ou quando a inoculação ocorre na região da mucosa, por exemplo na região ocular. Existem mais de 150 espécies de triatomíneos identificadas como transmissores da Doença de Chagas, agrupadas principalmente em três gêneros: *Panstrongylus*,

Rhodnius e *Triatoma* (VIEIRA et al., 2018). Além disso, diversas espécies de mamíferos silvestres e animais domésticos são reservatórios do protozoário (FERNANDES et al., 2008).

Além da via de transmissão vetorial, a infecção do *T. cruzi* pode ser adquirida de outras formas (COURA, 2015). A via transfusional apresenta grande importância epidemiológica e ocorre quando um paciente recebe a transfusão sanguínea proveniente de doadores infectados (CASTRO, 2009). Ainda, os bebês podem adquirir a infecção da mãe durante todo o período da gestação, caracterizando a transmissão vertical (DIAS et al., 2019). A transmissão pela via oral tem tido grande importância nos últimos anos, devido ao consumo de açaí e outros alimentos contaminados com fezes de triatomíneos ou com barbeiros contaminados triturados juntamente com alimentos, especialmente na Amazônia (BARBOSA et al., 2012; FRANCO-PAREDES et al., 2020) Adicionalmente, pode-se ainda adquirir a infecção por meio de transplante de órgãos, acidentes de laboratório e há comprovação experimental da transmissão do parasito pela via sexual (RIBEIRO, M et al., 2016; RIOS et al., 2018).

1.4 Ciclo biológico

O ciclo de vida do *T. cruzi* é heteroxênico e envolve diferentes formas do parasito, a forma amastigota se multiplica assexuadamente, alternando estágios intracelulares e extracelulares (tripomastigota sanguínea e amastigota), nos hospedeiros vertebrados, mamíferos em geral, e nos invertebrados, insetos da família Reduviidae, subfamília Triatominae formas extracelulares (tripomastigota metacíclica e epimastigota). O ciclo de vida no mamífero se inicia quando o vetor libera, após o repasto sanguíneo, fezes contendo as formas tripomastigotas metacíclicas próximo ao local da picada. Estas penetram no orifício causado pela picada ou em outros locais, como a mucosa ocular, e invadem as células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) mediante um mecanismo de fagocitose induzida. Uma vez dentro do vacúolo parasitóforo, o parasito se diferencia em formas amastigotas, que evadem o vacúolo e iniciam vários ciclos de multiplicação no citoplasma das células hospedeiras. Quando o citoplasma da célula está repleto de amastigotas, ocorre um novo processo de diferenciação, onde o parasito se transforma em formas

tripomastigotas, que rompem as células e são liberadas no meio extracelular, podendo iniciar novos ciclos de infecção nas células adjacentes ou ganhar a corrente sanguínea, dispersando a infecção pelo organismo. De interesse, o *T. cruzi* é capaz de parasitar qualquer célula nucleada, em especial células do sistema reticuloendotelial, tecido muscular liso e estriado, células endoteliais e células do sistema nervoso periférico e central do mamífero. O ciclo prossegue quando o mamífero infectado é picado por outro triatomíneo não infectado, que ingere as formas tripomastigotas sanguíneas. Ao chegar no intestino do vetor, as formas tripomastigotas se convertem em epimastigotas, que após vários ciclos de multiplicação, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas. O ciclo se completa quando o inseto infectado realiza um novo repasto sanguíneo, liberando as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes em suas fezes na pele do hospedeiro vertebrado, Figura 3 (BERN, 2015).

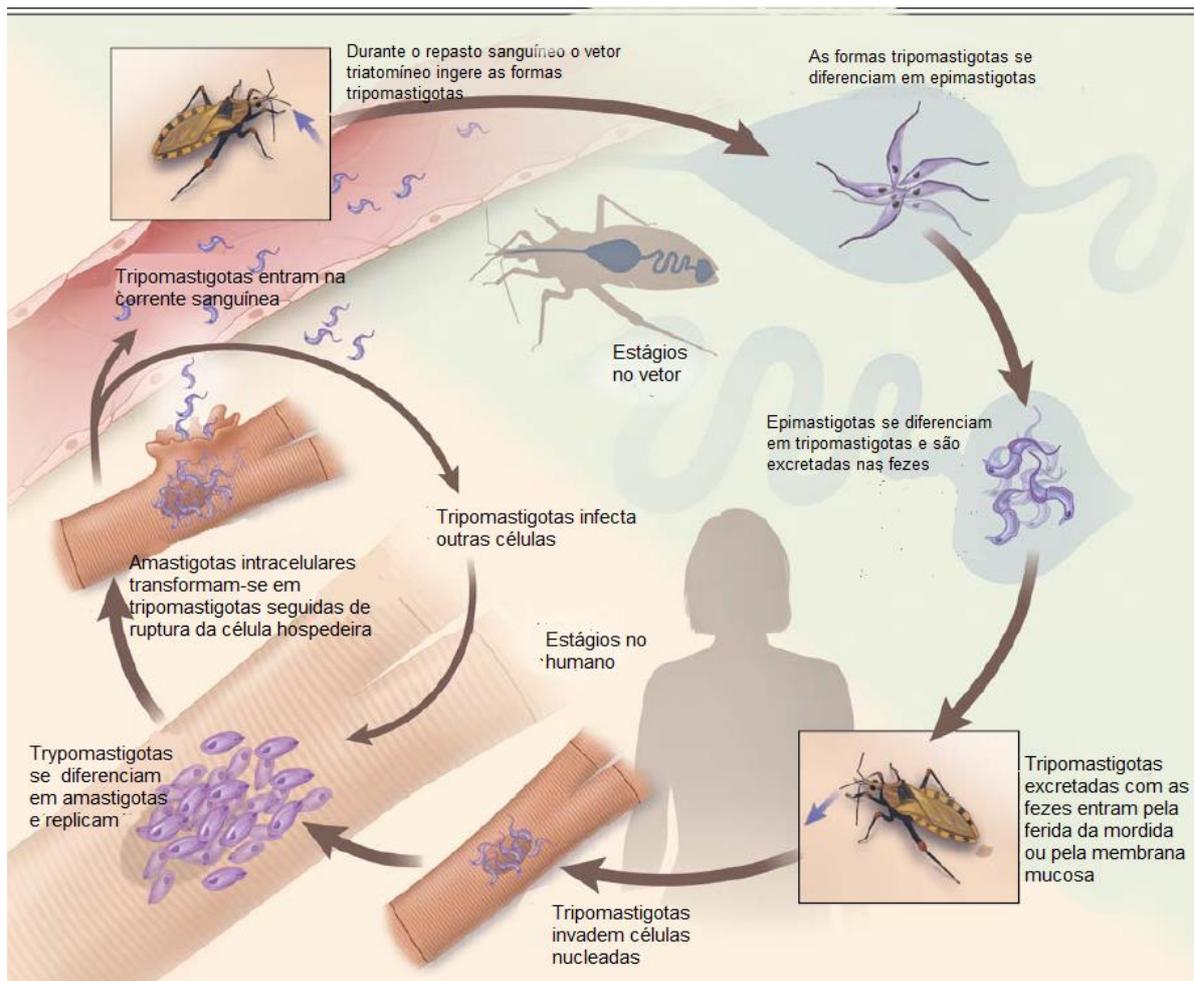


Figura 3. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. (Adaptado de Bern, 2015).

1.5 Manifestações clínicas

A Doença de Chagas apresenta um amplo espectro clínico que varia desde apresentação assintomática até as formas clínicas graves responsáveis por cerca de 10 mil mortes por ano (WHO, 2019). Logo após a infecção o indivíduo ingressa na fase aguda, que é geralmente assintomática, caracterizada por alta parasitemia com duração de até três meses. Menos de 5% dos pacientes apresentam sintomas nesta fase, e os principais sintomas observados são febre generalizada, mal-estar, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite e miocardite aguda. Os casos mais graves e letais estão relacionados com a infecção pela via oral; (Dias et al, 2016; ALARCÓN DE NOYA et al., 2016).

Após esse período, os pacientes progridem para a fase crônica da infecção, em que a maioria permanece assintomática durante toda a vida, caracterizando a forma indeterminada da Doença de Chagas, contudo, aproximadamente um terço dos indivíduos irão apresentar sintomas. Essa fase é marcada pela escassez de parasitos no sangue e nos tecidos e a alta concentração de anticorpos específicos anti-*T.cruzi* (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; SANTI-ROCCA et al., 2017).

A manifestação mais grave e frequente da Doença de Chagas crônica é a cardiomiopatia chagásica, que ocorre em 90% dos indivíduos crônicos sintomáticos, associada a arritmias e insuficiência cardíaca, causadas pela hipertrofia e fibrose do coração, caracterizando o cardiomegalia. A forma cardíaca apresenta alta taxa de morbidade e mortalidade, frequentemente, ocasionando a morte súbita do paciente (GROOM; PROTOPAPAS; ZOCHIOS, 2017; DIAS et al, 2016). Contudo, além da forma cardíaca, podem ser observados sintomas digestivos, que acometem órgãos do trato gastrointestinal, como o esôfago e o intestino grosso, levando ao surgimento de megaesôfago e megacólon, respectivamente. Os principais sintomas da forma digestiva da Doença de Chagas são a disfagia e constipação (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

O tratamento da Doença de Chagas é limitado e as drogas específicas disponíveis, Benzonidazol e o Nifurmitimox, apresentam muitos efeitos adversos, forçando a interrupção do tratamento em muitos casos. Durante a fase crônica, o tratamento se mostra ineficaz, sendo recomendado principalmente na fase aguda, na

qual o índice de cura gira em torno de 70%. Ainda não há vacinas, o que reforça a necessidade da continuidade de pesquisas básicas, visando o desenvolvimento de novos fármacos e buscando ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da Doença de Chagas (RIBEIRO, V et al., 2020).

1.6 Patogênese da Doença de Chagas

Os mecanismos envolvidos na patogênese da Doença de Chagas ainda não foram completamente elucidados. Acredita-se que o desenvolvimento das lesões características da fase crônica da doença seja de origem multifatorial, decorrentes de complexas interações entre o parasito e hospedeiro. Várias teorias tentam explicar os processos relacionados a patogênese, dentre elas estão a teoria da persistência do parasita e a teoria da autoimunidade (BONNEY et al., 2019; DE BONA et al., 2018).

A teoria de persistência do parasito está fundamentada no encontro do *T. cruzi* nos tecidos afetados, que durante a sua multiplicação intracelular, leva a ruptura das células parasitadas, com a exposição de antígenos e, conseqüentemente, sustentando a resposta imune adaptativa geradora dos infiltrados inflamatórios encontrados nas lesões. Entretanto, essa teoria não explica a baixa morbidade encontrada nos pacientes durante a fase aguda, quando a parasitemia é bastante alta. Por outro lado, durante a fase crônica, às vezes, mesmo após décadas de infecção, quando raramente o parasito é detectado, é que se desenvolve a cardiomiopatia crônica. Esses achados sugerem a participação de mecanismos autoimunes na patogênese da Doença de Chagas (BONNEY et al., 2019; DE BONA et al., 2018; TEIXEIRA, A R.L. et al., 2011).

Entre os mecanismos relacionados com a resposta autoimune na Doença de Chagas, destacam-se os processos decorrentes de mimetismo molecular (GIRONÈS; CUERVO; FRESNO, 2005) os mecanismos de ativação *bystander* (LEON; ENGMAN, 2003), por último, mecanismos ocasionados por mutações decorrentes da integração do kDNA de *T. cruzi* no genoma das células hospedeiras (HECHT et al., 2010; NITZ et al., 2004; TEIXEIRA, A R.L. et al., 2011).

Entretanto, esse ainda é um assunto bastante controverso que exige mais investimento em pesquisas, no sentido de garantir um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos na Doença de Chagas. Ademais, publicações

recentes têm mostrado que o surgimento das manifestações clínicas depende da interação entre diversos fatores relacionados ao parasito, ao hospedeiro e ao ambiente (SANTI-ROCCA et al., 2017; WESLEY et al., 2019). Neste contexto, a microbiota intestinal surge como um elemento de interesse por ser capaz de modular a relação parasito-hospedeiro.

1.7 A microbiota intestinal

Holobionte é o termo utilizado para designar a unidade constituída por um organismo macroscópico e seus simbioses microscópicos (MORRIS, 2018). A partir desse conceito, podemos dizer que todo animal é uma unidade holobionte, pois possui uma comunidade ecológica complexa, composta por trilhões de microrganismos, desde vírus até eucariotos unicelulares, que correspondem à microbiota do hospedeiro (PARTIDA-RODRÍGUEZ et al., 2017).

Dentre os diferentes nichos ecológicos de um organismo, o intestino é o que tem despertado maior interesse da comunidade científica por ser o habitat de trilhões de simbioses diversos, dentre os quais se encontram diversos filos bacterianos, sendo os principais: *Firmicutes*, Bacteroidetes, Proteobacterias e Actinobacterias (BENSON et al., 2010; HORNE et al., 2019). Ademais, diversos estudos têm demonstrado que a microbiota intestinal modula diversas funções no organismo, como a digestão dos alimentos, a síntese de vitaminas e a produção de metabólitos de natureza hormonal (KEENEY; FINLAY, 2011; LEVY; THAISS; ELINAV, 2016).

Devido ao fato de desempenhar diversos processos metabólicos essenciais, a microbiota influencia diretamente a homeostase, sua alteração contribui para a desregulação da resposta imune inflamatória, representando um fator crucial na modulação da resposta imunológica do hospedeiro. Inicialmente, essa modulação é executada através da regulação da imunidade da mucosa e, posteriormente, estendida para quase todas as partes do corpo (MONTALTO et al., 2009). Portanto, a microbiota intestinal pode influenciar o desenvolvimento e a progressão de várias patologias, incluindo as doenças infecto-parasitárias.

1.8 Papel da microbiota intestinal em infecções parasitárias

Ao longo de milhares de anos, os parasitos vieram se adaptando e coevoluindo com seus hospedeiros. Dentro desse contexto, merece especial atenção a convivência dos parasitos com os milhares de microrganismos que compõem a microbiota, visto que compartilham o habitat e competem por nutrientes em nichos ecológicos comuns. Desta forma, o microbioma pode contribuir tanto para o aumento da severidade da infecção quanto para a resistência do organismo ao patógeno (VILLARINO et al., 2016; YILMAZ et al., 2014).

Parasitos intestinais e a população bacteriana local, por exemplo, formam uma comunidade complexa que metaboliza os substratos de forma interativa e gera produtos que afetam uns aos outros (LEE et al., 2014), de maneira a determinar a progressão da infecção parasitária.

Existem diversos artigos que comprovam que a composição da microbiota intestinal é determinante para a patogenicidade de alguns parasitos intestinais, como descrito para *Entamoeba histolytica*, *Trichuris muris*, *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides* e *Giardia lamblia*. Ao mesmo tempo, os estudos vêm demonstrando que as infecções parasitárias podem alterar a composição e a diversidade da microbiota (FINK; SINGER, 2017; HOLM et al., 2015; JENKINS et al., 2018; LEON-CORIA; KUMAR; CHADEE, 2020; MIDHA et al., 2018; PARTIDA-RODRÍGUEZ et al., 2017). A esse respeito, já foi descrito que *E. histolytica* induz uma diminuição de *Lactobacillus*, uma bactéria benéfica ao hospedeiro (BURGESS; PETRI, 2016; KEDIA et al., 2016).

De interesse, infecções de parasitos extra-intestinais também são reguladas pela microbiota do hospedeiro. A prevalência de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* mostrou-se associada à proteção contra a malária, enquanto *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* foram associadas à susceptibilidade à infecção (VILLARINO et al., 2016; YOOSEPH et al., 2015). Já para leishmaniose, observou-se que diferenças na progressão da doença podem estar associadas aos diferentes perfis microbianos (LAMOUR et al., 2015).

Pouco se sabe sobre a modulação das infecções por *T. cruzi* pela microbiota intestinal, sendo que a maioria das pesquisas se concentram no estudo dos efeitos da microbiota intestinal do vetor sobre o protozoário. Essas pesquisas demonstram que

a interação parasita-microbiota é essencial para o controle da parasitemia no inseto. Assim, ampliar o conhecimento sobre o papel da microbiota intestinal do hospedeiro vertebrado nas infecções por *T. cruzi* faz-se necessário para que haja uma melhor compreensão de como a microbiota age sobre o parasito e de como ela pode influenciar na evolução clínica da Doença de Chagas.

1.9 Aspectos relacionados à microbiota humana quando comparada à microbiota murina

A microbiota intestinal humana é composta por cerca de 100 trilhões de microrganismo como bactérias, archaea, microrganismos eucariotos e vírus. A composição da microbiota varia ao longo da vida, sendo influenciada pelo tipo de parto seja natural ou por cesárea, tendo impacto na diversidade microbiana (CHUNG *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2016)

Alguns fatores estudados demonstram que a microbiota além de poder ser alterada ao longo da vida do indivíduo existe impacto por diferenças como a genética do indivíduo, uso de antibiótico, probióticos ou prebióticos, dieta, estado de saúde, exposição precoce à microrganismo e idade. Entretanto os filos de bactérias predominantes permanecem sendo *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, seguido de representantes dos filos *Proteobactrias*, *Actinobactérias*, *Verrucomicrobia* e *Fusobacterias* (HALL; TOLONEN; XAVIER, 2017; KUMAR *et al.*, 2016).

A maioria dos microrganismos residentes no intestino grosso humano são representante do filo *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, cerca de 90%, a maioria de microrganismo são anaeróbicos, o que é refletido nos estudos usando amostras fecais que é o tipo de amostra mais utilizada na maioria nos estudos realizados em humanos. De interesse a diversidade varia pelo local de análise, por exemplo as amostras de intestino delgado mostram maior diversidade das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (HALL; TOLONEN; XAVIER, 2017).

Ao considerar a dieta, ela é um dos principais fatores de modulação da microbiota humana, havendo diferença em relação a alimentação predominante nas comunidades e entre indivíduos vegetarianos ou onívoro (LAGIER *et al.*, 2012).

Ao analisar a microbiota de camundongos, estudo realizado por BENSON (2010), encontrou em camundongos AIL, (Advanced intercross line), população caracterizada por alto controle em relação a genética e obtenção de animais. Nesses animais foram encontrados por pirosequenciamento a maior presença de *Firmicutes* (30-70%), seguido por *Bacteroidetes* (10-40%), *Proteobactérias* e em menor proporção *Actinobacteria*.

O estudo de MCKNITE (2012) que realizou a avaliação por pirosequenciamento em outra linhagem de camundongos BXD (originada do cruzamento de C57BL/6J e DBA/2J com controles a nível molecular e fenótipo, novamente foi encontrado a predominância do filo *Firmicutes* (79,25%) e do filo *Bacteroidetes* (15,68%), no entanto também foi observada variabilidade quando analisados diferentes BXD, e impacto significativo em relação ao sexo dos animais, e alteração nas taxas de *Bacillales*, *Staphylococcaceae*, *Staphylococcus* quando considerada a variabilidade da idade.

Estudo avaliou por miRNA fecal a composição da microbiota de camundongos Balb/c e C56BL/6J, foram encontradas diferenças basais na diversidade alfa e beta entre as duas linhagens, assim foi então observada diferenças na composição bacteriana tanto a nível de *Operational taxonomic unit* (OTU) como de gênero. No entanto em ambas as linhagens a presença dos filios *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram predominantes (HORNE et al., 2019).

Recentemente pesquisadores criaram uma coleção bacteriana referente a cerca de 100 cepas encontradas no intestino de camundongos, englobando 76 espécies e 26 famílias, com representantes dos principais filios *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Verricomicrobia*, sendo 74% representantes do filo *Firmicutes*. Os autores encontraram 32 espécies compartilhadas entre intestino de camundongos e humanos, com 12 sendo dominantes, por exemplo a presença de *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium animalis*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (LAGKOUVARDOS et al., 2016).

O modelo animal, principalmente de roedores é importante para o avanço de estudos relativos a microbiota intestinal, ajudam a elucidar o papel da microbiota em doenças metabólica, intestinais e autoimunes como diabetes tipo 1, síndrome do intestino irritável e obesidade. No entanto é importante levar em considerações as alterações de habitat e genética que alteram também a microbiota murina além de

fatores como uso de animais *germfree* e gnotobiótico (BLEICH; FOX, 2015; NGUYEN *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

A Doença de Chagas representa um sério problema de saúde pública, principalmente na América Latina, gerando grande ônus econômico para os países da região. Estima-se que cerca de oito milhões de pessoas estejam infectadas por *T.cruzi*, das quais um terço deverá apresentar as manifestações clínicas da doença, sendo algumas incapacitantes e letais. Infelizmente, as drogas tripanocidas disponíveis não são eficientes na fase crônica da doença. A dificuldade em se desenvolver drogas ou vacinas eficientes para o tratamento da Doença de Chagas está muito relacionada às lacunas de conhecimento que ainda existem na compreensão da patogênese dessa doença. De interesse, estudos recentes sugerem que o surgimento das manifestações clínicas está relacionado à interação de múltiplos fatores, tanto do parasito quanto do hospedeiro.

Dessa forma, trabalhos que identifiquem os elementos envolvidos no desenvolvimento dos sintomas presentes na fase aguda da doença podem auxiliar na criação de novas estratégias de tratamento para a Doença de Chagas. Neste contexto, a microbiota intestinal representa um elemento modulador da relação parasito-hospedeiro que pode ter grande influência sobre a resposta imune de um organismo e sobre a maneira como uma infecção pode progredir. Assim, ampliar o conhecimento relacionado às interações entre o *T. cruzi* e a microbiota intestinal possibilitará, além de uma compreensão ecológica das interações polimicrobianas, que se avalie como a presença do *T. cruzi* pode alterar a eubiose, tema ainda pouco explorado por pesquisadores da área.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da infecção por *T. cruzi* sobre a microbiota intestinal do hospedeiro vertebrado.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar, por meio de revisão sistemática, estudos que avaliem a composição e a importância da microbiota intestinal de mamíferos infectados com o *T. cruzi*.
- Comparar a composição da microbiota de camundongos suscetíveis ou não à Doença de Chagas.
- Avaliar as alterações na quantidade das principais populações microbianas, em decorrência da infecção por *T. cruzi*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Revisão Sistemática

A identificação de estudos que avaliaram a composição da microbiota intestinal de mamíferos infectados com o *T. cruzi* foi realizado por revisão sistemática da literatura. Assim, foram identificados e avaliados criticamente todos os estudos sobre o assunto publicados até janeiro de 2020. Os pontos avaliados em cada estudo estão descritos na Tabela 1:

Tabela 1: Pontos de interesse dos artigos selecionados na revisão sistemática

P	Amostras de hospedeiros vertebrados
I	Infecção pelo <i>T. cruzi</i>
C	Microbiota de mamíferos sadios
D	Alteração da microbiota

* P: população. I: intervenção. C: controle. D: desfecho.

A partir desses pontos de interesse, os critérios de inclusão (publicações científicas, em língua inglesa, que avaliam a microbiota de seres humanos ou animais experimentais infectados com o *T. cruzi*) e as perguntas norteadoras foram estabelecidas:

- a) O estudo trata de microbiota na Doença de Chagas?
- b) O estudo utiliza animais experimentais?
- c) O estudo foi realizado com humanos?
- d) Os trabalhos foram escritos em inglês?

Os critérios de exclusão foram: estudos de revisão, trabalhos sem ligação com a avaliação da microbiota intestinal na Doença de Chagas, trabalhos que avaliam apenas a microbiota do hospedeiro invertebrado e, por fim, publicações com a metodologia incompleta ou não descrita. Desta forma, os critérios de exclusão foram definidos de acordo com as seguintes perguntas:

- a) A publicação é uma revisão?
- b) O trabalho avalia apenas a microbiota dos insetos vetores?

- c) O estudo avalia apenas aspectos não relacionados à microbiota intestinal de hospedeiros vertebrados infectados com o *T. cruzi*

A estratégia de coleta de dados se deu por meio de pesquisa eletrônica por periódicos indexados nas bases de dados *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE) e *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO). Tanto no MEDLINE quanto no SCIELO, a pesquisa foi realizada no dia 06/02/2020 com os seguintes termos: “*Chagas disease and microbiota*”, “*Chagas disease and microbiome*”, “*Trypanosoma cruzi and microbiota*”, “*Trypanosoma cruzi and microbiome*”.

A identificação dos critérios de inclusão e exclusão de cada artigo foi feita, inicialmente, pela leitura dos respectivos resumos. Quando apenas a leitura do resumo não possibilitava a identificação de tais critérios, o artigo foi lido integralmente para se estabelecer se seria incluído ou não na revisão sistemática. Após seleção dos artigos, foi criado um arquivo no programa *Excel for Windows* para organizar itens importantes para a análise, como: autor (es), títulos, ano, nome do periódico no qual o artigo foi publicado e principais resultados alcançados.

5 RESULTADOS

5.1 Revisão Sistemática

Os resultados das buscas de todas as bases e com todos os descritores foram somados, resultando em um total de 183 artigos. Os artigos duplicados foram removidos, restando 56 publicações, todas presentes na base de dados MEDLINE, exceto uma que foi encontrada no SCIELO. Após leitura dos resumos, 49 artigos (87,5%) foram eliminados pelos nossos critérios de exclusão, sendo os motivos: 12 artigos (21,5%) não tratavam sobre Doença de Chagas; 6 publicações (10,7%) não abordavam o tema microbiota, 2 publicações (3,5%) avaliavam a microbiota de outras partes do corpo que não o intestino, 24 artigos (42,8%) avaliavam a microbiota do vetor triatomíneo, e 5 artigos (8,9%) referiam-se a revisões bibliográficas. As etapas

de seleção dos artigos para a revisão sistemática e os motivos de exclusão das publicações estão representados nas Figuras 4 e 5, respectivamente:

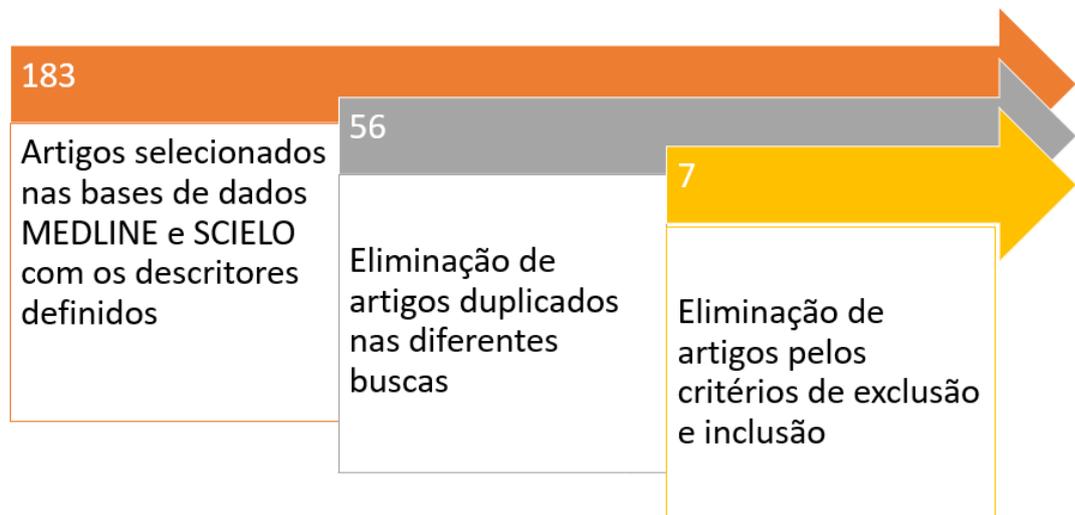


Figura 4: Fluxograma da seleção de artigos para a revisão sistemática. Na busca inicial, foram selecionados 183 artigos científicos. Após exclusão de artigos duplicados que apareciam nas buscas com os diferentes descritores, restaram 56 artigos cujos resumos foram avaliados quanto aos critérios de inclusão e exclusão. Apenas 7 artigos foram selecionados para leitura completa.

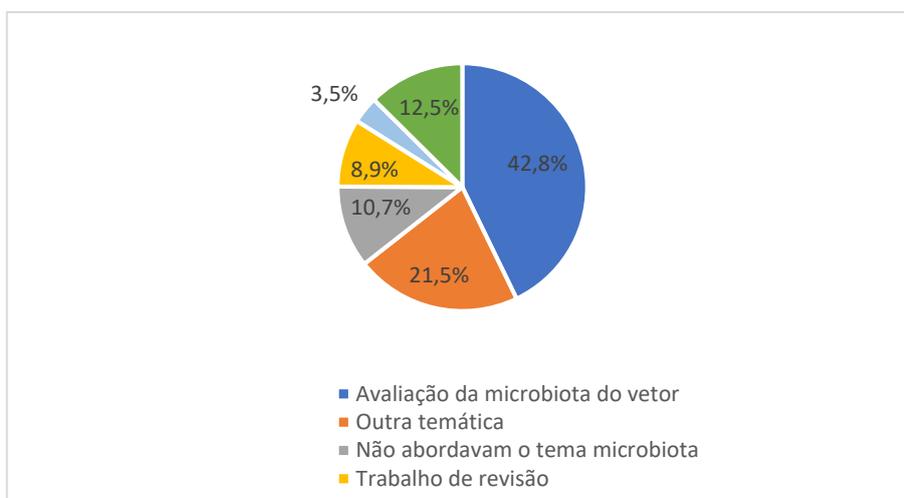


Figura 5: Distribuição dos artigos da revisão sistemática a partir dos critérios de inclusão e exclusão.

Desta forma, apenas sete artigos foram selecionados após avaliação pelos critérios de inclusão e exclusão (Tabela 2). O primeiro artigo que estudou a importância da microbiota intestinal na doença de Chagas foi publicado em 1987 por pesquisadores brasileiros (SILVA et al., 1987), os quais verificaram que camundongos isentos de germes apresentavam uma forma mais grave da doença que os camundongos com uma microbiota convencional, evidenciada por uma parasitemia mais intensa, sinais de insuficiência cardíaca e uma mortalidade precoce.

Somente 13 anos após essa primeira publicação, um novo estudo foi publicado (GUIMARÃES QUINTANILHA et al., 2000) e trouxe informações sobre a composição da microbiota de pacientes chagásicos com megacólon, antes e após serem submetidos ao tratamento cirúrgico. Os autores verificaram que houve um aumento da população bacteriana no jejuno de pacientes com megacólon, principalmente de microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos. A realização da cirurgia promoveu uma diminuição desses organismos de maneira significativa.

Em 2004 e 2005, Duarte e colaboradores publicaram dois artigos sobre o tema. O primeiro trabalho avaliou a influência da microbiota sobre a resposta imune de camundongos infectados com o *T. cruzi*. Apesar de não se observar diferenças significativas de parasitemia e mortalidade ao se comparar camundongos isentos de germes e camundongos com microbiota convencional, estes últimos apresentavam uma maior produção de óxido nítrico e de citocinas IFN-gama e TNF-alfa e maiores concentrações de imunoglobulinas da classe IgG. No segundo artigo, o grupo de pesquisadores recolonizou a microbiota de camundongos isentos de germes com as bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides vulgatus* ou *Peptostreptococcus* sp, cada uma separadamente, e em seguida, realizou a infecção com o *T. cruzi*. Tal recolonização reduziu a taxa de mortalidade dos animais e promoveu um aumento na produção de IFN-gama e TNF-alfa (DUARTE, R. et al., 2005; DUARTE, Rinaldo et al., 2004)

Após um intervalo de 11 anos sem publicações no tema, Santiago-Rodriguez et al. (2016) publicaram artigo intitulado “Taxonomic and predicted metabolic profiles of the human gut microbiome in pre-Columbian mummies” em uma revista com fator de impacto importante, utilizando tecnologia de metagenômica para caracterização da microbiota intestinal de múmias infectadas com o *T. cruzi*. Nesse estudo, os autores puderam avaliar o intestino. O sequenciamento de amplicon do gene 16SrRNA

revelou uma maior prevalência de bactérias pertencentes às ordens *Clostridiales* e *Bacillales*, com representantes de outras ordens sendo encontrados em quantidades bem inferiores (SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2016).

Completando o conjunto de estudos no tema, dois artigos foram publicados no prestigiado grupo PLOS em 2018 e 2019. McCall et al., 2018, associaram o perfil de bactérias fecais a alterações metabólicas em camundongos infectados com o *T. cruzi*. A presença do parasito causou um desequilíbrio da microbiota, principalmente nas populações de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Listeria*, acarretando alterações na produção de ácido linoleico e ácidos biliares (MCCALL et al., 2018). Já Robello et al., 2019, avaliaram a microbiota fecal de crianças com Doença de Chagas e tratadas com benzonidazol. As crianças infectadas com o *T. cruzi* apresentavam uma quantidade maior das bactérias *Streptococcus*, *Roseburia*, *Butyrivibrio* e *Blautia*, e uma quantidade menor de *Bacteroides*. O tratamento com a droga tripanocida conseguiu aproximar a composição da microbiota fecal das crianças infectadas daquelas sadias (ROBELLO et al., 2019)

Tabela 2: Artigos selecionados na revisão sistemática

Título	Autor	Ano	Periódico	Principais resultados	N experimental
American trypanosomiasis (Chagas' disease) in conventional and germfree rats and mice	Silva et al	1987	Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo	A Doença de Chagas se apresenta de maneira mais grave em camundongos isentos de germes quando comparados a animais com a microbiota convencional.	Mice: 6 <i>germfree</i> e 4 convencionais 5 ratos Wistar <i>germfree</i> e 6 convencionais
Chagasic megacolon and proximal jejunum microbiota.	Guimarães Quintanilha et al	2000	Scandinavian Journal of Gastroenterology	A microbiota jejunal de pacientes chagásicos com megacólon apresenta um maior número de fungos bactérias e bactérias anaeróbias. Essa disbiose pode ser parcialmente revertida através do procedimento cirúrgico.	12 pacientes adultos
Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with <i>Trypanosoma cruzi</i> in mice	Duarte et al	2004	Journal of Medical Microbiology	Camundongos isentos de germes e infectados com o <i>T. cruzi</i> apresentam uma menor resposta pró-inflamatória e menor produção de anticorpos que camundongos com a microbiota convencional	Camundongos Swiss, 5 à 10 animais em cada grupo <i>germfree</i> e convencional
<i>Trypanosoma cruzi</i> : influence of predominant bacteria from indigenous digestive microbiota on experimental infection in mice	Duarte et al	2005	Experimental Parasitology	Camundongos isentos de germes e recolonizados com bactérias em mono associação, apresentaram maior sobrevivência e um perfil de citocinas pró-inflamatório	Camundongos 5 à 10 animais em cada um dos 5 grupos
Taxonomic and predicted metabolic profiles of the human gut microbiome in pre-Columbian mummies	Santiago-Rodriguez et al	2016	FEMS Microbiology Ecology	Avaliação metagenômica da microbiota intestinal de múmias infectadas com o <i>T. cruzi</i> revelou uma predominância de bactérias anaeróbias.	2 múmias
Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome	McCall	2018	PLOS Neglected Tropical Diseases	A infecção experimental por <i>T. cruzi</i> promoveu alteração na composição de membros específicos das famílias Ruminococcaceae e Lachnospiraceae e de membros da ordem Clostridiales, causando alterações metabólicas.	40 camundongos
The fecal, oral, and skin microbiota of children with Chagas disease treated with benznidazole	Robello et al	2019	PLOS One	Crianças infectadas com o <i>T. cruzi</i> apresentam uma maior quantidade de <i>Firmicutes</i> e diminuição de <i>Bacteroides</i> em sua microbiota fecal. O tratamento com Benzonidazol diminui a disbiose.	20 infectados e 35 controles

6 MATERIAL E MÉTODOS- PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Grupos experimentais

Foi realizado estudo experimental utilizando duas linhagens de camundongos: BALB/c, suscetível à infecção pelo *T. cruzi* (TRISCHMANN, T. M.; BLOOM, 1982), e C57BL/6, resistente à infecção (TRISCHMANN, T. M.; BLOOM, 1982; TRISCHMANN, Thomas M., 1986). Um total de 20 camundongos fêmeas, com sete semanas de vida e com peso uniforme, foi distribuído em quatro grupos, com cinco animais em cada (Figura 4): 1) camundongos BALB/c infectados, 2) camundongos BALB/c saudáveis, não infectados (controle negativo), 3) camundongos C57BL/6 infectados, 4) camundongos C57BL/6 saudáveis, não infectados (controle negativo). A infecção se deu com 1×10^5 tripomastigotas de *T.cruzi* da cepa Colombiana diluído em PBS. Os animais dos grupos infectados foram eutanasiados 30 dias após a infecção (dpi). Os camundongos pertencentes aos grupos controle negativo foram acompanhados por igual período (Figura 6).

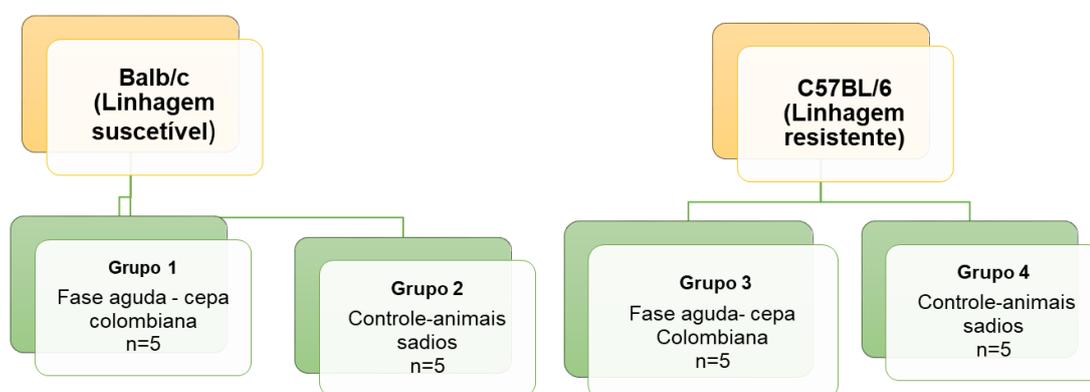


Figura 6: Grupos avaliados no estudo. Os camundongos foram divididos em 4 diferentes grupos, sendo cada grupo composto por 5 animais. Nos grupos 1 e 3, os animais foram infectados 1×10^5 tripomastigota de *T.cruzi* da cepa Colombiana. Os grupos 2 e 4 se referem aos grupos controle negativo, onde animais saudáveis foram acompanhados pelo mesmo tempo de vida dos animais dos grupos infectado.

A utilização dos animais nesta pesquisa foi devidamente autorizada pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, com o número de Protocolo 52/2017.

Os camundongos foram obtidos do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, tendo sido acompanhados e monitorados durante todo o período experimental. Cada gaiola continha entre 2 e 3 animais para manutenção da convivência em comunidade. Os camundongos foram mantidos em ambiente de 12h/12h claro/escuro, sendo que, tanto a ração como a água foram fornecidas *ad libitum*. A ração foi da marca Presence®, indicada para ratos e camundongos de laboratório, a qual possui registro no Ministério da Agricultura.

6.2 Cultivo de *T. cruzi* e infecção de camundongos

Formas tripomastigotas da cepa Colombiana foram cultivadas em fibroblastos murinos da linhagem L6, utilizando o Meio Mínimo Essencial (DMEM), pH 7,2, acrescido de Soro Fetal Bovino (SFB) 5%.

Inicialmente, a cultura foi mantida por uma semana para a transformação das diferentes formas, isto é, epimastigota para amastigota, seguida de tripomastigota. Na fase tripomastigota, foi realizada a passagem do parasito em camundongo BALB/c para manutenção da virulência, inoculando-se 1×10^5 parasitos. A avaliação da parasitemia foi realizada por meio de visualização em microscópio óptico, na objetiva 40X, a partir de 7dpi e, depois, diariamente até a detecção do parasito no sangue. Para tanto, era realizada uma pequena secção na cauda do animal e uma gota de sangue era colocada em lâmina contendo 10 μ l de citrato de sódio.

Após detecção da parasitemia, o camundongo era eutanasiado e tinha seu sangue coletado para realização de um novo inóculo (200 μ l de sangue) em outro animal. Novamente, após 7 a 14 dias de infecção, ao se observar parasitemia positiva, coletava-se 1mL de sangue para iniciar a cultura em células L6.

A cultura contendo o sangue de camundongos foi mantida entre 4-10 dias, tempo necessário para ocorrer a infecção das células. Ao se observar a presença de formas tripomastigotas, a cultura foi submetida a centrifugação por 5 minutos a

1500rpm, retirando-se o sobrenadante e submetendo-o à contagem imediata dos parasitos em câmara de Neubauer, utilizando Azul de Trypan.

Os camundongos foram, então, inoculados por via intraperitoneal com 1×10^5 de tripomastigotas obtidas de cultura.

6.3 Coleta de amostras e extração de DNA

Após o intervalo de tempo determinado para cada grupo experimental, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Forane®) e submetidos à eutanásia. Foi então coletada a metade distal do intestino grosso para extração de DNA.

A extração foi realizada imediatamente após a coleta do material com o kit Wizard® Genomic DNA da Promega. Para melhor qualidade do DNA, foi escolhido a opção de kit sem uso de coluna, sendo a extração realizada conforme o protocolo do kit.

6.4 Cultivo de bactérias e extração de DNA

Para análise da microbiota intestinal dos diferentes animais, cinco bactérias foram selecionadas por representar as espécies com maior presença naquele ambiente, além de seu papel na saúde, a saber: *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis* (HAKANSSON; MOLIN, 2011; WEXLER, Aaron G.; GOODMAN, 2017).

As bactérias foram obtidas de diferentes fontes. *Lactobacillus casei* foi doado pela empresa Farmacotécnica de Brasília. As demais espécies foram adquiridas da coleção de microrganismos Norte americana ATCC (American Type Culture Collection), sendo *E. coli* ATCC 25922; *B. fragilis* ATCC 25285; *C. perfringens* ATCC 13124 e *E. faecalis* ATCC 19433.

Para as culturas das bactérias *E.coli* e *E. faecalis*, foi utilizado Caldo Nutriente Líquido. Já para o cultivo de *Lactobacillus casei*, utilizou-se meio líquido MRS. Em relação às duas bactérias anaeróbicas, *C.perfringens* e *B.fragilis*, elas foram cultivadas em meio ágar base M837 em garrafas que mantinham a atmosfera anaeróbica. Para todas as bactérias, o cultivo ocorreu por 24h à 37°C.

Após o cultivo, foi realizada a extração de DNA das bactérias, seguindo o protocolo do kit Wizard® Genomic DNA da Promega.

6.5 PCR quantitativa

Com o objetivo de quantificar as bactérias presentes nos diferentes grupos, foi realizada PCR quantitativa (qPCR) para cada bactéria de interesse, bem como para a sequência universal dos genes de domínio específico 16S rRNA. As sequências dos *primers* e as condições da qPCR estão apresentadas na Tabela 2 (FERRIS; MUYZER; WARD, 1996; HUIJSDENS *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2009; NAKAYAMA; OISHI, 2013).

Após a extração do DNA de cada uma das bactérias, foi realizada a padronização das curvas utilizando-se 100 ng de DNA e 10 µL de GoTaq® qPCR Master mix da Promega, em um volume final de 20µL. A quantidade de *primer* variou para cada bactéria e encontra-se descrita na Tabela 3. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), em duplicata, no termociclador 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). Para avaliação de bactérias totais, foi escolhido um primer universal e a padronização foi realizada com um *pool* de DNA de *B.bifidum*, *L.casei*, *L.acidophilus*, *E.coli* e *B.fragilis*.

A construção da curva padrão foi feita a partir de diluições seriadas de DNA de cada bactéria (de 100 a 0,0001 ng de DNA). Todas as curvas padrões apresentaram eficiência entre 90,6% e 104,97% e R² entre 0,991 e 0,999 (Figura 7).

Tabela 3: Condições da PCR quantitativa para identificação de bactérias

Nome	Gene alvo	Sequência	Programação	Quantidade de primer padronizado	Referência
Bactérias totais	16S rRNA	Forward: 5'- ATG GCT GTC GTC AGC T-3' Reverse: 5'- ACG GGC GGT GTG TAC-3'	95°C-20s 55°C-30s 40x 72°C- 30s	0,8ul F de primer à 10µm 0,8ul R de primer à 10µm	Ferris et al. (1996)
<i>E.coli</i>	16S rRNA	Forward: 5' CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA-3' Reverse: 5'- CGG GTA ACG TCA ATG AGC AAA- 3'	95°C-15s 60°C-60s 40x 72°C- 30s		
<i>Lactobacillus</i> spp.	16S rRNA	Forward: 5'- TGG AAA CAG ATG CTA ATA CCG-3' Reverse: 5'- GTC CAT TGT GGA AGA TTC CC-3'	95°C-15s 60°C- 20s 40x 72°C- 10s	0,6ul F de primer à 10µm 0,6ul R de primer à 10µm	Kang et al. (2009)
<i>Enterococcus</i> spp.	16S rRNA	Forward: 5'- CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT-3' Reverse: 5'-ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT-3'	95°C-15s 61°C- 20s 40x 72°C- 45s	0,4ul F de primer à 10µm 0,4ul R de primer à 10µm	Nakayama T and Oishi K(2013)
<i>Bacteroides</i> spp.	16S rRNA	Forward: 5' AGT AAC ACG TAT CCA ACC TG-3' Reverse: 5'GAC CAA TAT TCC TCA CTG CT-3'	94°C-15s 61°C- 60s 40x 72°C- 30s	0,6ul F de primer à 10µm 0,6ul R de primer à 10µm	Nakayama T and Oishi K(2013)
<i>Clostridium</i> spp.	16S rRNA	Forward: 5'-AAA GGA AGA TTA ATA CCG CAT AA-3' Reverse: 5'-TGG ACC GTG TCT CAG TTC C-3'	94°C-15s 55°C- 60s 40x 72°C- 30s	0,6ul F de primer à 10µm 0,6ul R de primer à 10µm	Nakayama T and Oishi K(2013)

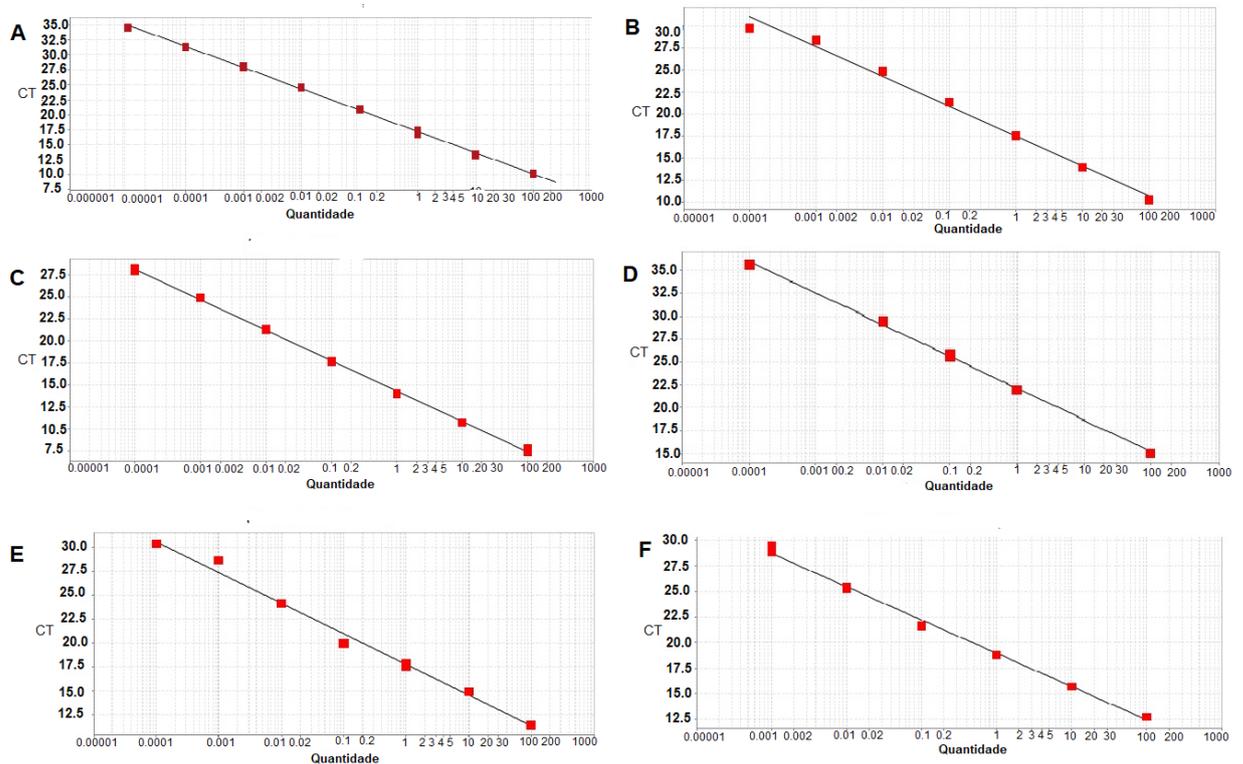


Figura 7: Curva padrão para quantificação absoluta das bactérias analisadas no estudo.

No eixo X, está representada a quantidade de parasitos equivalentes, enquanto no eixo Y, está representado o CT, que corresponde ao número do ciclo da qPCR em que a fluorescência do *amplicon* pode ser detectada acima do sinal de fundo. **(A)** Curva padrão para Bactérias totais, eficiência obtida de 90,6% e R² 0,999; **(B)**. Curva padrão para *Lactobacillus* sp com eficiência obtida de 97,4% e R² de 0,991; **(C)**. Curva padrão para quantificação absoluta de *E. coli* com eficiência obtida de 97,4% e R² de 0,991; **(D)** Curva padrão para quantificação absoluta de *Enterococcus* sp com eficiência obtida de 94,35% e R² 0,998; **(E)** Curva padrão para quantificação absoluta de *Bacteroides* sp com eficiência obtida de 104,97% e R² 0,999;**(F)** Curva padrão para quantificação absoluta de *Clostridium* sp com eficiência obtida de 102,47% e R² de 0,996.

6.6 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado seguiu um modelo casualizado em esquema fatorial com quatro tratamentos referentes às combinações dos fatores: linhagem do camundongo (suscetível ou resistente) e infecção (não infectados e infectados). Foram utilizadas 05 repetições por tratamento. As variáveis dependentes foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk.

Uma vez constatado que os dados apresentaram distribuição não-normal, os resultados foram, então, submetidos à análise de variância pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Em seguida, as variáveis cujos resultados apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliadas pelo teste Wilcoxon em nível de significância de 5%.

Não obstante, os grupos experimentais foram submetidos à análise de frequência e teste Qui-quadrado utilizando o procedimento PROC FREQ. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS®(versão 9.3, Cary, North Carolina).

7 RESULTADOS- PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Caracterização da microbiota murina

7.1.1 Análise qualitativa de bactérias presentes no intestino

A análise da microbiota intestinal de murinos foi realizada por PCR quantitativa usando *primers* específicos para cinco gêneros de bactérias, o que possibilitou uma análise qualitativa (positivo ou negativo) (Figura 8) e quantitativa (quantidades absolutas) das amostras.

Em relação à porcentagem de animais que se mostraram positivos para as bactérias estudadas, verificamos que 60% (3/5) dos animais do grupo suscetível não infectado (S) apresentavam a bactéria *E.coli*, enquanto no grupo resistente não infectado (R), apenas 40% (2/5) dos animais foram positivos. Ao se infectar esses animais, verificamos uma redução do número de animais positivos para essa bactéria. A diminuição foi mais expressiva em camundongos BALB/c, visto que a *E. coli* não foi detectada em nenhum animal.

Ao se avaliar a presença de *Lactobacillus* sp., observou-se que todos os animais (5/5) dos grupos controle, S e R, foram positivos. Nos grupos infectados, verificou-se uma pequena queda na porcentagem de positividade no grupo RI, chegando a 80%, uma redução sem significância estatística.

Quanto à positividade para a presença de bactérias anaeróbicas *Clostridium* sp., todos os animais (5/5) dos grupos suscetíveis à infecção, S e SI, foram negativos, enquanto 40% do grupo R e 20% do grupo RI foram positivos.

Para o segundo grupo de bactérias anaeróbicas avaliado, *Bacteroides* sp., verificamos que todos os animais (100%) suscetíveis (S e SI) foram positivos, bem como todos os animais do grupo RI. Entretanto, nenhum animal do grupo R foi positivo para *Bacteroides*, diferindo significativamente dos demais grupos ($p=0,0002$).

Por fim, foi avaliada a presença de *Enterococcus* sp., porém nenhum animal, independente do grupo, foi positivo para essas bactérias.

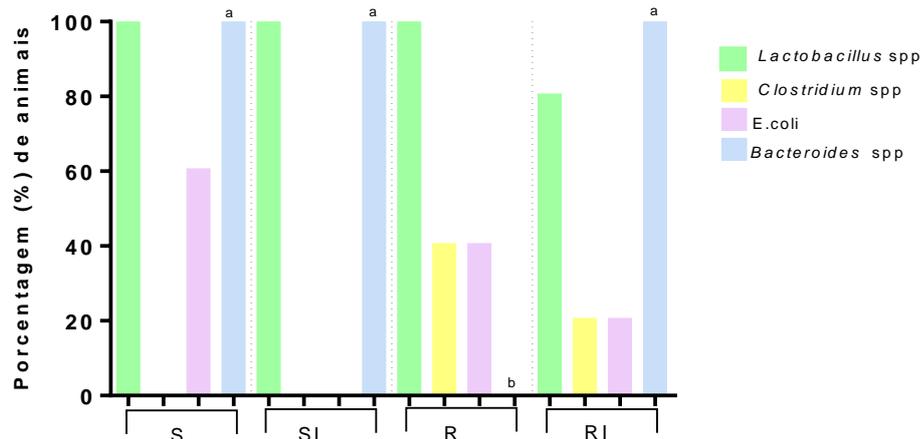


Figura 8: Análise qualitativa da presença de bactérias no intestino grosso de camundongos BALB/c e C57BL/6. Os grupos são representados por suscetível (S), suscetível infectado (SI), resistente (R) e resistente infectado (RI). No grupo R, verificou-se diferença estatística, representada pelas letras a e b, em relação aos demais grupos ao se avaliar o gênero *Bacteroides* ($p=0,0002$).

7.1.2 Quantificação de bactérias totais

A análise da concentração de bactérias totais de cada grupo experimental foi realizada mediante o emprego de *primer* universal para o gene 16S rRNA em PCR quantitativa. Como esperado, todos os animais foram positivos, sendo a distribuição das bactérias entre os grupos demonstrados na Figura 9, com resultados representados pelas respectivas médias e desvios padrão. No grupo S, verificou-se uma média de 0.058 ± 0.044 bactérias equivalentes/ 100ng de DNA. No grupo SI, quantificou-se $0.32 \pm 0,37$ bactérias equivalentes/ 100ng de DNA. Já no grupo RI, detectou-se 0.60 ± 0.28 bactérias equivalentes/ 100ng de DNA, enquanto no grupo R, 0.43 ± 0.17 bactérias equivalentes/ 100ng de DNA.

Ao aplicar o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido da aplicação do teste Willcoxon para análise dois a dois, observou-se três diferenças estatisticamente significante ($p<0,05$) entre os grupos controle S e R, onde os animais suscetíveis saudáveis apresentaram menor concentração de bactéria encontradas em relação aos animais resistente ($p=0,0354$). A segunda diferença detectada se deu entre o

grupo S e o grupo SI, onde este último apresentou um aumento importante de sua população bacteriana quando comparado aos seus pares não infectados ($p= 0,0167$). A terceira diferença foi entre o grupo S e o grupo RI($p=0,0127$), no entanto devido não ter significância biológica os dados não foram discutidos, devido ao fato de se comparar um grupo suscetível saudável com um grupo resistente infectado.

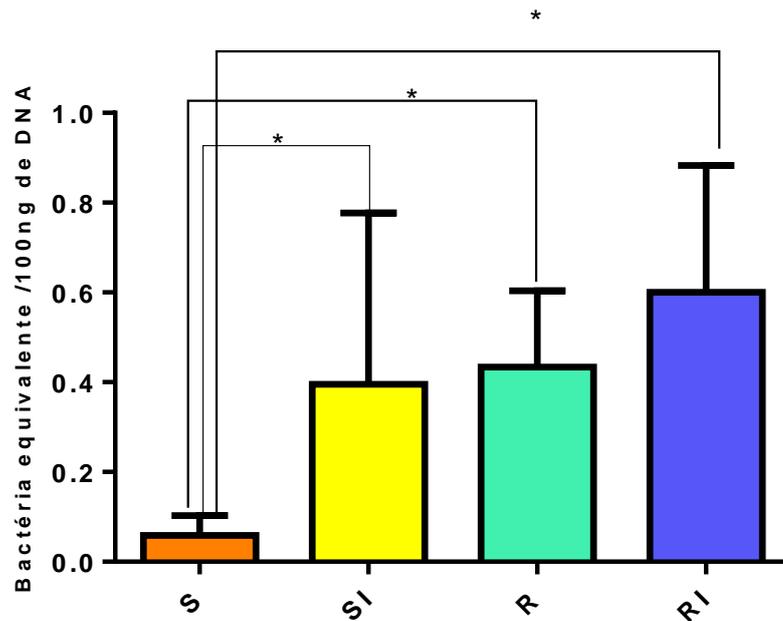


Figura 9: Quantificação de bactérias totais da microbiota intestinal. A determinação da quantidade total de bactérias totais presentes no intestino dos camundongos dos diferentes grupos experimentais foi realizada por qPCR com o *primer* do gene 16S rRNA. S: suscetível (BALB/c) sadio. S': suscetível (BALB/c) e infectado. R: resistente (C57BL/6) sadio. R': resistente (C57BL/6) infectado. Foi verificada diferença estatística ao se comparar os grupos S versus S' ($p = 0,0354$), os grupos S versus R ($p = 0,0167$) e os grupos S versus R' ($p=0,0127$).

7.1.3 Composição da microbiota intestinal

Alterações da composição da microbiota de camundongos suscetíveis e resistentes ao *T. cruzi* foram avaliadas pela presença de bactérias pertencentes aos quatro principais gêneros presentes no intestino e também de *E. coli*. A proporção dessas bactérias pode ser observada na Figura 10. Destaca-se a predominância de *Bacteroides* em relação às demais bactérias analisadas, notadamente no grupo de camundongos resistentes (C57BL/6) e infectados com o parasito.

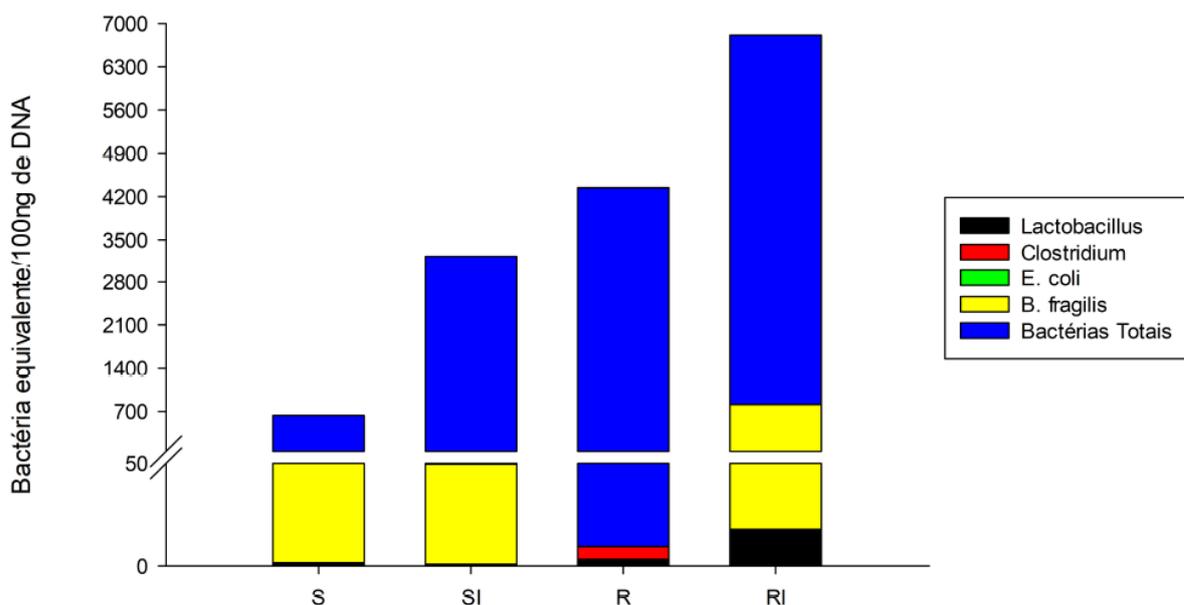


Figura 10. Proporção de bactérias da microbiota intestinal em camundongos Balb/C e C57BL/6, infectados ou não com o *Trypanosoma cruzi*. O gráfico representa a quantidade média das bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* e *E. coli*, em relação à quantidade total de bactérias. S: suscetível (BALB/c) sadio. SI: suscetível (BALB/c) e infectado. R: resistente (C57BL/6) sadio. RI: resistente (C57BL/6) infectado. O valor foi multiplicado por 10 para facilitar a visualização.

A comparação da composição da microbiota intestinal dos grupos suscetíveis e resistentes, infectados ou não pelo *T. cruzi*, demonstrou não haver uma grande alteração do perfil de bactérias, exceto para o grupo *Bacteroides*. A Tabela 4

disponibiliza a média e desvio padrão da quantidade de bactérias encontradas em cada um dos grupos experimentais.

Tabela 4: Quantidade de bactérias da microbiota intestinal murina.

Bactérias	S	SI	R	RI
	Média/DP	Média/DP	Média/DP	Média/DP
<i>Lactobacillus</i> sp.	0,000141 ± 0,000144	0,0000875 ± 0,0000878	0,000141 ± 0,000144	0,0017 ± 0,0015
<i>Clostridium</i> sp.	0	0	0	0,00004 ± 0,00010
<i>E.coli</i>	0.000023 ± 0.000029	0	0,000023 ± 0,000029	9.94E-7 ± 2.2226516E-6
<i>Bacteroides</i> sp.	0,00489 ± 0,00394	0,31808 ± 0,37309	0	0,07933 ± 0,04234
Bactérias totais	0.0585 ± 0.0444	0.395 ± 0.381	0.433 ± 0.170	0.600 ± 0.283

S: suscetível (Balb/C) sadio. SI: suscetível (Balb/C) e infectado. R: resistente (C57BL/6) sadio. RI: resistente (C57BL/6) infectado.
DV: desvio padrão

Analisando de maneira mais detalhada o gênero *Bacteroides* (Figura 11), verificamos que o grupo saudável suscetível infecção apresentou uma quantidade maior dessa população bacteriana quando comparado ao grupo saudável de camundongos resistentes ($p = 0,0171$). Ao se avaliar o papel da infecção, notamos que a presença infecção não foi capaz de alterar significativamente a quantidade de *Bacteroides* nos animais da linhagem BALB/c ($p > 0,05$). Entretanto, a infecção pelo *T.cruzi* pode ter sido responsável por um aumento expressivo dessa bactéria no grupo infectado resistente C57BL/6 quando comparado ao grupo resistente saudável ($p=0,0171$). De interesse, também observamos diferença significativa entre os grupos SI e RI ($p=0,0242$) e diferença entre o grupo S e RI ($p=0,0336$). A diferença encontrada no grupo S versus o grupo RI, não tem relevância biológica devido as diferenças de linhagens e presença de infecção em apenas um dos grupos.

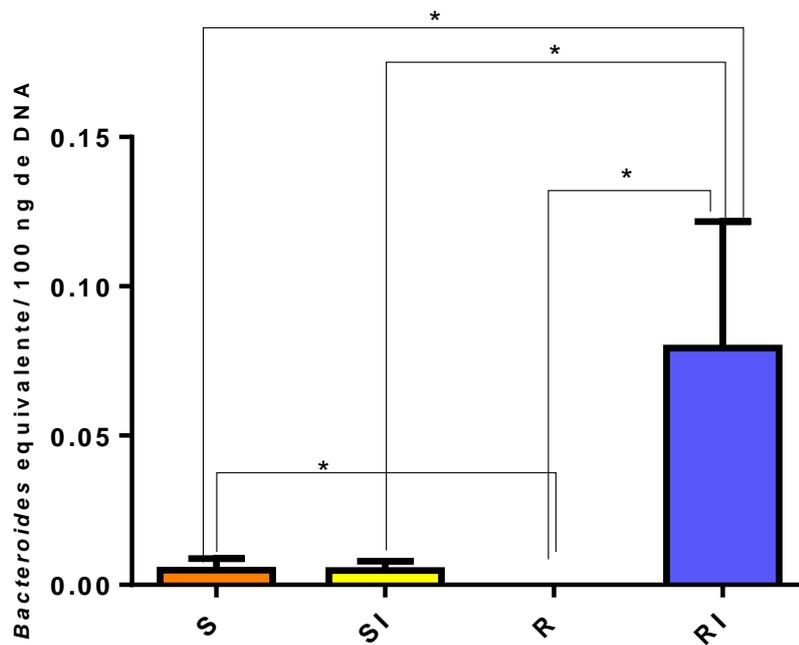


Figura 11. Concentração de *Bacteroides* sp. na microbiota intestinal de camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados ou não com o *Trypanosoma cruzi*. O gráfico representa a média e o desvio padrão de cada grupo experimental. S: suscetível (BALB/c) sadio. SI: suscetível (BALB/c) e infectado. R: resistente (C57BL/6) sadio. RI: resistente (C57BL/6) infectado. Grupo S versus R ($p=0,0171$), grupo SI versus RI ($p=0,0242$), grupo R versus RI ($p=0,0171$) e grupo S versus RI ($p=0,0336$).

8 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, observou-se um aumento expressivo de estudos que avaliam o papel da microbiota intestinal na saúde e na doença, seja animal ou humana, permitindo a compreensão de sua importância no comportamento, metabolismo e defesa imunológica do hospedeiro (BARKO et al., 2018; CRESCI; BAWDEN, 2015; SCHMIDT; RAES; BORK, 2018). No contexto de nosso estudo, merece destaque o conhecimento construído em relação à relevância da microbiota intestinal em doenças parasitárias, como em infecções por helmintos e por *Plasmodium*, visto que esse microbioma se mostra relevante tanto em aspectos evolutivos da relação parasito-hospedeiro quanto de controle da severidade da infecção (IPPOLITO et al., 2018).

Ainda que diversos estudos tenham descrito o intestino como sítio preferencial de ocupação do *T. cruzi* (LEWIS et al., 2014; SILBERSTEIN et al., 2018), local onde ele poderia interagir com milhares de bactérias comensais de maneira direta ou indireta (TEOTÔNIO, I.M.S.N. et al., 2019), apenas sete artigos selecionados na revisão sistemática avaliaram a microbiota intestinal de mamíferos infectados com o *T. cruzi*. Isso demonstra claramente que a comunidade científica ainda não se mobilizou para compreender mais profundamente a tríade *T. cruzi*-microbiota-hospedeiro. A esse respeito, os quatro primeiros artigos (DUARTE, R. et al., 2005; DUARTE, Rinaldo et al., 2004; GUIMARÃES QUINTANILHA et al., 2000; SILVA et al., 1987) foram publicados em revistas com fator de impacto < 2,5, reforçando o desinteresse pelo assunto. Já os últimos artigos (MCCALL et al., 2018; ROBELLO et al., 2019; SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2016) alcançaram maior visibilidade, possivelmente devido à utilização de metodologias mais robustas para a caracterização da população bacteriana, como a metagenômica.

Os artigos selecionados abordavam dois pontos básicos do estudo da microbiota: o perfil populacional ou seu papel na modulação da Doença de Chagas. Entretanto, muitas lacunas de conhecimento ainda precisam ser preenchidas, sendo necessário se ampliar os dados sobre a interação da microbiota com diferentes cepas do *T. cruzi*, a flutuação populacional das bactérias ao longo do processo de cronificação da doença, a correlação da microbiota com os diversos fatores envolvidos na patogênese da doença, entre outros. Em síntese, a revisão sistemática evidenciou

a necessidade de se expandir o conhecimento sobre como a infecção por *T. cruzi* influencia o microbioma intestinal e quais as consequências de uma possível disbiose para seu hospedeiro.

Visando contribuir com a ampliação de informações a respeito do tema, o estudo também desenvolveu etapas experimentais. Inicialmente, foi investigada a presença de bactérias de diferentes filos (*Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobactéria*) e que são mais prevalentes na microbiota de mamíferos. Sabe-se que, dentre as bactérias avaliadas em nosso estudo, algumas são capazes de gerar benefícios ao hospedeiro, sendo, inclusive, utilizadas como probióticos (*Lactobacillus* e *Enterococcus*) (DUBIN; PAMER, 2017; GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015; HANCHI et al., 2018), enquanto outras, apesar de comensais, podem atuar como patógenos oportunistas (*Bacteroides*, *E. coli*, *Clostridium*) (KIU; HALL, 2018; ROSSI et al., 2018; WEXLER, Aaron G.; GOODMAN, 2017; WEXLER, Hannah M., 2007). Para tanto, camundongos com diferentes *backgrounds* genéticos e diferentes graus de suscetibilidade ao protozoário tiveram seus intestinos coletados para realização de extração de DNA e posteriormente qPCR.

Preliminarmente, foi realizada a avaliação da microbiota dos animais saudáveis, não infectados. A determinação da composição da população microbiana do grupo controle se mostra de fundamental importância, visto que a quantidade total e a diversidade relativa das bactérias da microbiota intestinal murina variam entre diferentes estudos. Por exemplo, Su et al. (2018) e Nogacka et al. (2019) relatam uma maior prevalência de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Clostridium* e uma quantidade reduzida de *Bacteroides* em camundongos BALB/c (NOGACKA et al., 2019; SU et al., 2018). Entretanto, Becker et al. (2017) observaram uma maior quantidade de *Bacteroides* em relação aos *Firmicutes*, usando essa mesma linhagem murina (BECKER et al., 2017). Em nosso estudo, foi demonstrado que os animais controles da linhagem BALB/c apresentaram uma maior quantidade de *Bacteroides* que *Lactobacillus*.

Para C57BL/6, essa mesma variação de populações bacterianas é relatada na literatura. Enquanto Safari et al. (2020) detectaram uma maior proporção de *Firmicutes* em relação a *Bacteroidetes*, Coretti et al. (2017) encontraram a relação inversa, com uma maior quantidade de *Bacteroides* do que de *Lactobacillus* (CORETTI et al., 2017; SAFARI et al., 2020). Interessantemente, apenas *Lactobacillus*

foram identificados em nossas amostras. Isso demonstra que a influência do ambiente (alojamento, ração, cuidador, etc) sobre a microbiota parece se sobrepor à genética do hospedeiro (VILLARINO et al., 2016).

Levando em consideração as análises qualitativas, destaca-se o fato de as bactérias do gênero *Lactobacillus* terem sido detectadas em quase todos (95%) os animais, independentemente do grupo avaliado. Isso provavelmente reflete a importância de *Lactobacillus* autóctones na manutenção da saúde do hospedeiro, contribuindo para o controle de doenças metabólicas e infecciosas (HEENEY; GAREAU; MARCO, 2018).

Ao compararmos as duas linhagens de camundongos utilizadas, pudemos observar que os animais BALB/c, suscetíveis à infecção (TANOWITZ et al., 1981), apresentavam uma quantidade total de bactérias significativamente inferior à quantidade detectada em camundongos C57BL/6, mais resistentes à infecção (TRISCHMANN, T. M.; BLOOM, 1982; TRISCHMANN, Thomas M., 1986). Em contrapartida, o grupo resistente saudável apresentou uma menor quantidade de *Bacteroides sp.*

Interessantemente, a infecção com o protozoário *T. cruzi* resultou em aumento significativo de *Bacteroides sp.* em C57BL/6. Sabe-se que, quando confinada ao intestino, essa bactéria apresenta propriedades benéficas ao hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), para ativação de linfócitos T CD4+ e para o aumento da variabilidade do repertório de anticorpos pré-ímmunes, o estudo demonstrou em coelhos que combinação de *Bacteroides fragilis* e *Bacillus subtilis* estava envolvidos diretamente no desenvolvimento da GALT que é e responsável auxilia em diversas imunológicas do hospedeiro, como a imunidade à mucosa e a tolerância oral. (BÄCKHED et al., 2005; RHEE et al., 2004). Ademais, *Bacteroides* produzem diferentes tipos de toxinas que podem inibir o crescimento de outras bactérias da microbiota e de patógenos (CHATZIDAKI-LIVANIS et al., 2017; CHATZIDAKI-LIVANIS; COYNE; COMSTOCK, 2014; WEXLER, Hannah M., 2007).

Assim, o aumento populacional de *bacteroides* pode ser o fator responsável pela maior resistência da linhagem C57BL/6 ao parasito, fato que poderia ser explicado pela associação direta do enriquecimento dessa bactéria à uma maior produção de TNF- α (LIN et al., 2019). Desta forma, esse grupo bacteriano poderia ser

utilizado como biomarcador generalista para se avaliar o grau de suscetibilidade de um paciente à infecção ao *T. cruzi* desde que analisados seu impacto global e selecionado espécies mais representativas. A esse respeito, *Bacteroides* sp já têm sido avaliadas como sinalizadoras de determinadas condições do hospedeiro, como estilo de vida e adoção de determinadas dietas (GORVITOVSKAIA; HOLMES; HUSE, 2016).

Como contraponto ao aparente papel benéfico do enriquecimento de *Bacteroides* na microbiota de animais resistentes está o fato de que o aumento de bactérias desse gênero já foi associado ao desenvolvimento de câncer de cólon (WANG et al., 2012) e a uma maior predisposição a desenvolver uma severa intolerância à glicose em amostras de indivíduos que demonstrou alterações relativa a *B.fragilis* e ácido glicocodesodesoxicólico do ácido biliar (GUDCA) que levaram a inibição do receptor X farnesóide intestinal (FXR) inibido, essa inibição era suprimida quando era administrado o tratamento com metformina(SUN et al., 2018). Portanto, o aumento de bactérias do gênero *Bacteroides* nem sempre terá uma repercussão positiva no organismo do hospedeiro. A saber, a disbiose na Doença de Chagas também já foi correlacionada ao surgimento de doenças secundárias, como infecções pulmonares, displasia da mucosa esofágica e câncer (CINTRA et al., 1998; ELINAV et al., 2011; RAYMANN et al., 2017).

Em relação ao papel da microbiota intestinal nas infecções por *T. cruzi*, as pesquisas ainda precisam avançar muito, notadamente no papel da população de microrganismos intestinais sobre a saúde do hospedeiro vertebrado. Em nossa revisão sistemática, verificamos que a maior parte dos artigos publicados avaliaram a composição e o papel da microbiota intestinal dos vetores, fato possivelmente associado a uma maior facilidade de aquisição de amostras e impulsionado pela existência de uma gama de estudos que avaliam as populações bacterianas do intestino de outros insetos. Tais estudos revelam prejuízos à condição física dos vetores e a conseqüente diminuição de prevalência de diferentes doenças transmitidas por insetos, como as arboviroses (STRAND, 2018; WU et al., 2018). Igualmente, os estudos com triatomíneos trazem informações sobre a diversidade ecológica da microbiota e de como elas podem influenciar a quantidade de parasitos e a competência vetorial (TEOTÔNIO, IMSN et al., 2019).

Em síntese, nossos resultados sugerem que a composição inicial da microbiota parece não ser o fator determinante de suscetibilidade/resistência dos animais, mas sim, a maneira como a microbiota pode sofrer alteração na presença da infecção pelo *T. cruzi*, o que corrobora estudos com infecções por outros parasitos. Por exemplo, murinos da linhagem BALB/c que após infecção com *Plasmodium berghei* apresentaram diminuição de Firmicutes e aumento de Proteobacterias mostraram-se mais suscetíveis ao desenvolvimento de malária cerebral (TANIGUCHI et al., 2015). Ademais, mais estudos são necessários para se avaliar o papel do aumento de bacteroides e da disbiose intestinal como um todo na fase crônica da Doença de Chagas.

9 CONCLUSÕES

- A revisão sistemática demonstrou haver uma escassez de estudos que caracterizam a microbiota intestinal de mamíferos infectados com o *T.cruzi*, bem como de estudos que avaliam a repercussão da interação parasito-microbiota na saúde do hospedeiro vertebrado.
- Não se verificou diferenças significativas na composição da população microbiana intestinal de linhagens de camundongos suscetíveis ou resistentes ao *T. cruzi*, exceto para o gênero *Bacteroides*, que não foi identificado na linhagem C57BL/6.
- A infecção por *T. cruzi* não alterou o perfil de bactérias da microbiota intestinal de camundongos BALB/c, porém resultou em aumento significativo de bactérias do gênero *Bacteroides* em C57BL/6.

10 PERSPECTIVAS

Nossos resultados evidenciam a necessidade de se ampliar os conhecimentos sobre a interação do *T. cruzi* com a microbiota intestinal e como ela influencia a evolução da Doença de Chagas. Assim, podemos apontar como perspectivas deste trabalho:

- Determinar a composição da microbiota intestinal em camundongos na fase crônica da infecção;
- Avaliar o papel da microbiota intestinal na modulação do sistema imune e na evolução das manifestações clínicas da Doença de Chagas;
- Avaliar a influência de tratamentos com antimicrobianos na resposta imune e na evolução das manifestações clínicas de camundongos infectados com o *T. cruzi*;
- Avaliar a influência de tratamentos com probióticos a nível de espécie, na resposta imune e na evolução das manifestações clínicas de camundongos infectados com o *T. cruzi*;

11 Referências Bibliográficas

ALARCÓN DE NOYA, B. et al. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiology and Control*, 2016. DOI 10.1016/j.parepi.2016.02.005.

BÄCKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, 2005. DOI 10.1126/science.1104816.

BARBOSA, R. L. et al. Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute chagas disease. **Journal of Food Protection**, 2012. DOI 10.4315/0362-028X.JFP-11-233.

BARCO, P. C. et al. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2018. DOI 10.1111/jvim.14875.

BECKER, E. et al. Effects of oral antibiotics and isotretinoin on the murine gut microbiota. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2017. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.017.

BENSON, A. K. et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 44, p. 18933–18938, 2010. DOI 10.1073/pnas.1007028107.

BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015. DOI 10.1056/NEJMra1410150 .

BLEICH, A.; FOX, J. G. The mammalian microbiome and its importance in laboratory animal research. **ILAR Journal**, v. 56, n. 2, p. 153–158, 2015. DOI 10.1093/ilar/ilv031.

BONNEY, K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 2019. DOI 10.1146/annurev-pathol-020117-043711.

BURGESS, S. L.; PETRI, W. A. The Intestinal Bacterial Microbiome and *E. histolytica* Infection. **Current Tropical Medicine Reports**, 2016. DOI 10.1007/s40475-016-0083-1.

CASTRO, E. Chagas' disease: Lessons from routine donation testing. **Transfusion Medicine**, 2009. DOI 10.1111/j.1365-3148.2009.00915.x.

CECCARELLI, S. *et al.* Data Descriptor: DataTri, a database of American triatomine species occurrence. **Scientific Data**, 2018. DOI 10.1038/sdata.2018.71.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909. DOI 10.1590/s0074-02761909000200008.

CHATZIDAKI-LIVANIS, M. *et al.* Gut symbiont *Bacteroides fragilis* secretes a eukaryotic-like ubiquitin protein that mediates intraspecies antagonism. **mBio**, 2017. DOI 10.1128/mBio.01902-17.

CHATZIDAKI-LIVANIS, M.; COYNE, M. J.; COMSTOCK, L. E. An antimicrobial protein of the gut symbiont *Bacteroides fragilis* with a MACPF domain of host immune proteins. **Molecular Microbiology**, 2014. DOI 10.1111/mmi.12839.

CHUNG, H. J. *et al.* Gut microbiota as a missing link between nutrients and traits of human. **Frontiers in Microbiology**, 2018. DOI 10.3389/fmicb.2018.01510.

CINTRA, I. P. *et al.* Influence of dietary protein content on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 1998. DOI 10.1590/S0036-46651998000600004.

CORETTI, L. *et al.* Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. **Scientific Reports**, 2017. DOI 10.1038/srep45356.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2015. DOI 10.1590/0074-0276140362.

CRESCI, G. A.; BAWDEN, E. Gut microbiome: What we do and don't know. **Nutrition in Clinical Practice**, 2015. DOI 10.1177/0884533615609899.

DE BONA, E. *et al.* Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.01842.

DIAS, N. *et al.* Congenital chagas disease: Alert of research negligence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019. DOI 10.1590/0037-8682-0069-2018.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil**, v. 25, n. spe, p. 7–86, 2016. DOI 10.5123/S1679-49742016000500002.

DUARTE, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Influence of predominant bacteria from indigenous digestive microbiota on experimental infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 87–96, 2005. DOI 10.1016/j.exppara.2005.06.002.

DUARTE, Rinaldo *et al.* Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 741–748, 2004. DOI 10.1099/jmm.0.45657-0.

DUBIN, K.; PAMER, E. G. *Enterococci* and Their Interactions with the Intestinal Microbiome. **Bugs as Drugs**, p. 309–330, 2017. DOI 10.1128/microbiolspec.bad-0014-2016.

ELINAV, E. *et al.* Regulation of the Antimicrobial Response by NLR Proteins. **Immunity**, 2011. DOI 10.1016/j.immuni.2011.05.007.

FERNANDES, A. *et al.* Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 514–516, 2008. DOI 10.1590/S0074-02762008000500021.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996. DOI 10.1128/aem.62.2.340-346.1996.

FINK, M. Y.; SINGER, S. M. The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. **Trends in Parasitology**, 2017. DOI 10.1016/j.pt.2017.08.001.

FRANCO-PAREDES, C. *et al.* A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine

importance. **Travel Medicine and Infectious Disease**, p. 101565, 2020. DOI 10.1016/j.tmaid.2020.101565. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101565>.

GIRONÈS, N.; CUERVO, H.; FRESNO, M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2005. DOI 10.1007/3-540-30791-5_6.

GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. Suppl 2, p. S98–S107, 2015. DOI 10.1093/cid/civ072.

GORVITOVSKAIA, A.; HOLMES, S. P.; HUSE, S. M. Interpreting prevotella and bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. **Microbiome**, 2016. DOI 10.1186/s40168-016-0160-7.

GROOM, Z. C.; PROTOPAPAS, A. D.; ZOCHIOS, V. Tropical diseases of the myocardium: A review. *International Journal of General Medicine*, 2017. DOI 10.2147/IJGM.S130828.

GUIMARÃES QUINTANILHA, A. *et al.* Chagasic megacolon and proximal jejunum microbiota. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 2000. DOI 10.1080/003655200750023606.

HAKANSSON, A.; MOLIN, G. Gut microbiota and inflammation. **Nutrients**, 2011. DOI 10.3390/nu3060637.

HALL, A. B.; TOLONEN, A. C.; XAVIER, R. J. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. **Nature Reviews Genetics**, 2017. DOI 10.1038/nrg.2017.63.

HANCHI, H. *et al.* The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-an update. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–16, 2018. DOI 10.3389/fmicb.2018.01791.

HECHT, M. M. *et al.* Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. **PLoS ONE**, 2010. DOI 10.1371/journal.pone.0009181.

HEENEY, D. D.; GAREAU, M. G.; MARCO, M. L. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? **Current Opinion in Biotechnology**, 2018. DOI 10.1016/j.copbio.2017.08.004.

HOLM, J. B. *et al.* Chronic *Trichuris muris* infection decreases diversity of the intestinal microbiota and concomitantly increases the abundance of *Lactobacilli*. **PLoS ONE**, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0125495.

HORNE, R. *et al.* Microbe and host interaction in gastrointestinal homeostasis. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 5, p. 1623–1640, 2019. DOI 10.1007/s00213-019-05218-y.

HUIJSDENS, X. W. *et al.* Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002. DOI 10.1128/JCM.40.12.4423-4427.2002.

IPPOLITO, M. M. *et al.* Malaria and the microbiome: A systematic review. **Clinical Infectious Diseases**, 2018. DOI 10.1093/cid/ciy374.

JENKINS, T. P. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. **Scientific Reports**, 2018. DOI 10.1038/s41598-018-30412-x.

KANG, M. S. *et al.* Prevalence of oral microbes in the saliva of oncological patients. **Journal of Bacteriology and Virology**, 2009. DOI 10.4167/jbv.2009.39.4.277.

KEDIA, S. *et al.* Gut microbiome diversity in acute infective and chronic inflammatory gastrointestinal diseases in North India. **Journal of Gastroenterology**, 2016. DOI 10.1007/s00535-016-1193-1.

KEENEY, K. M.; FINLAY, B. B. Enteric pathogen exploitation of the microbiota-generated nutrient environment of the gut. **Current Opinion in Microbiology**, 2011. DOI 10.1016/j.mib.2010.12.012.

KIU, R.; HALL, L. J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018. DOI 10.1038/s41426-018-0144-8.

KUMAR, M. *et al.* Human gut microbiota and healthy aging: Recent developments and future prospective. **Nutrition and Healthy Aging**, 2016. DOI 10.3233/nha-150002.

LAGIER, J. C. *et al.* Human gut microbiota: repertoire and variations. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2012. DOI 10.3389/fcimb.2012.00136

LAGKOUVARDOS, I. *et al.* The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. **Nature Microbiology**, 2016. DOI 10.1038/nmicrobiol.2016.131.

LAMOUR, S. D. *et al.* Metabolic, immune, and gut microbial signals mount a systems response to *Leishmania major* infection. **Journal of Proteome Research**, 2015. DOI 10.1021/pr5008202.

LEE, S. C. *et al.* Helminth Colonization Is Associated with Increased Diversity of the Gut Microbiota. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014. DOI 10.1371/journal.pntd.0002880.

LEON-CORIA, A.; KUMAR, M.; CHADEE, K. The delicate balance between *Entamoeba histolytica*, mucus and microbiota. **Gut Microbes**, 2020. DOI 10.1080/19490976.2019.1614363.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of chagas heart disease. **Frontiers in Bioscience**, 2003. DOI 10.2741/1023.

LEVY, M.; THAISS, C. A.; ELINAV, E. Metabolites: Messengers between the microbiota and the immune system. **Genes and Development**, v. 30, n. 14, p. 1589–1597, 2016. DOI 10.1101/gad.284091.116.

LEWIS, M. D. *et al.* Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. v. 16, n. May, p. 1285–1300, 2014. DOI 10.1111/cmi.12297.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. **Journal of Physical Oceanography**, 2019. DOI 10.3389/fpubh.2019.00166.

LIN, C. H. *et al.* Altered gut microbiota and inflammatory cytokine responses in patients with Parkinson's disease. **Journal of Neuroinflammation**, 2019. DOI 10.1186/s12974-019-1528-y.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 167–174, 2014. DOI 10.1016/j.actatropica.2013.10.002.

Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.002>.

MCCALL, L. I. *et al.* Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2018. DOI 10.1371/journal.pntd.0006344. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006344>.

MCKNITE, A. M. *et al.* Murine gut microbiota is defined by host genetics and modulates variation of metabolic traits. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0039191.

MIDHA, A. *et al.* The intestinal roundworm *Ascaris suum* releases antimicrobial factors which interfere with bacterial growth and biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2018. DOI 10.3389/fcimb.2018.00271.

MONTALTO, M. *et al.* Intestinal microbiota and its functions. **Digestive and Liver Disease Supplements**, 2009. DOI 10.1016/S1594-5804(09)60016-4.

MORRIS, J. J. What is the hologenome concept of evolution? **F1000Research**, 2018. DOI 10.12688/f1000research.14385.1.

NAKAYAMA, T.; OISHI, K. Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galacto-oligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses. **FEMS Microbiology Letters**, v. 343, n. 2, p. 161–168, 2013. DOI 10.1111/1574-6968.12142.

NITZ, N. *et al.* Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: Insights into human Chagas disease. **Cell**, 2004. DOI 10.1016/j.cell.2004.07.001.

NGUYEN, T. L. A. *et al.* How informative is the mouse for human gut microbiota research? **DMM Disease Models and Mechanisms**, 2015. DOI 10.1242/dmm.017400.

NOGACKA, A. M. *et al.* Intestinal Immunomodulation and Shifts on the Gut Microbiota of BALB/c Mice Promoted by Two *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Strains Isolated from Human Samples. **BioMed Research International**, 2019. DOI 10.1155/2019/2323540.

PARTIDA-RODRÍGUEZ, O. *et al.* Human Intestinal Microbiota: Interaction Between Parasites and the Host Immune Response. **Archives of Medical Research**, 2017. DOI 10.1016/j.arcmed.2017.11.015.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018. DOI 10.1016/S0140-6736(17)31612-4.

RAYMANN, K. *et al.* Unexplored Archaeal Diversity in the Great Ape Gut Microbiome. **mSphere**, 2017. DOI 10.1128/msphere.00026-17. .

RHEE, K.-J. *et al.* Role of Commensal Bacteria in Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues and Preimmune Antibody Repertoire. **The Journal of Immunology**, 2004. DOI 10.4049/jimmunol.172.2.1118.

RIBEIRO, M. *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Experimental Parasitology**, 2016. DOI 10.1016/j.exppara.2015.12.017.

RIBEIRO, V. *et al.* Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2020. DOI 10.1016/j.ijpddr.2019.11.004.

RIOS, A. *et al.* Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2018. DOI 10.1590/0074-02760170025.

ROBELLO, C. *et al.* The fecal, oral, and skin microbiota of children with Chagas disease treated with benznidazole. **PLoS ONE**, 2019. DOI 10.1371/journal.pone.0212593.

ROSSI, E. *et al.* “It’s a gut feeling”—*Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 1–30, 2018. DOI 10.1080/1040841X.2017.1303660.

SAFARI, Z. *et al.* Murine genetic background overcomes gut microbiota changes to explain metabolic response to high-fat diet. **Nutrients**, 2020. DOI 10.3390/nu12020287.

SANTI-ROCCA, J. *et al.* A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: Common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI 10.1038/s41598-017-08086-8.

SANTIAGO-RODRIGUEZ, T. M. *et al.* Taxonomic and predicted metabolic profiles of

the human gut microbiome in pre-Columbian mummies. n. May, p. 1–13, 2016. DOI 10.1093/femsec/fiw182.

SCHMIDT, T. S. B.; RAES, J.; BORK, P. The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. **Cell**, 2018. DOI 10.1016/j.cell.2018.02.044.

SILBERSTEIN, E. *et al.* A novel nanoluciferase-based system to monitor *Trypanosoma cruzi* infection in mice by bioluminescence imaging. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–21, 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0195879.

SILVA, M. E. *et al.* American trypanosomiasis (Chagas' disease) in conventional and germfree rats and mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n. 5, p. 284–288, 1987. DOI 10.1590/S0036-46651987000500004.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Integrated control of chagas disease - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 289–298, 2015. DOI 10.1590/0074-02. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 289–298, 2015. DOI 10.1590/0074-02760140408.

STRAND, M. R. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. **Current Opinion in Insect Science**, 2018. DOI 10.1016/j.cois.2018.05.008.

SU, C. *et al.* Helminth-induced alterations of the gut microbiota exacerbate bacterial colitis. **Mucosal Immunology**, 2018. DOI 10.1038/mi.2017.20.

SUN, L. *et al.* Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. **Nature Medicine**, 2018. DOI 10.1038/s41591-018-0222-4.

TANIGUCHI, T. *et al.* *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Scientific Reports**, 2015. DOI 10.1038/srep15699.

TANOWITZ, H. B. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Correlation of resistance and susceptibility in infected inbred mice with the in vivo primary antibody response to sheep red blood cells. **Experimental Parasitology**, 1981. DOI 10.1016/0014-4894(81)90078-3.

TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURM, N. R. Endemic chagas disease*. **Emerging Chagas Disease**. [s.l.: s.n.], 2011. DOI 10.2174/978160805041310901010010.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, 2011. DOI 10.1128/CMR.00063-10.

TEOTÔNIO, I.M.S.N. *et al.* Intestinal microbiota – A modulator of the *Trypanosoma cruzi*-vector-host triad. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, 2019. DOI 10.1016/j.micpath.2019.103711.

TRISCHMANN, T. M.; BLOOM, B. R. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 546–551, 1982.

TRISCHMANN, Thomas M. *Trypanosoma cruzi*: Early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. **Experimental Parasitology**, v. 62, n. 2, p. 194–201, 1986. DOI 10.1016/0014-4894(86)90023-8 .

TZIZIK, D. M.; BORCHARDT, R. A. Chagas disease: An underrecognized diagnosis. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, 2018. DOI 10.1097/01.JAA.0000547749.92933.6a.

VIEIRA, C. B. *et al.* Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2018. DOI 10.3389/fcimb.2018.00405. .

VILLARINO, N. F. *et al.* Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 8, p. 2235–2240, 2016. DOI 10.1073/pnas.1504887113.

WANG, T. *et al.* Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. **ISME Journal**, 2012. DOI 10.1038/ismej.2011.109.

WESLEY, M. *et al.* Correlation of parasite burden, kdna integration, autoreactive antibodies, and cytokine pattern in the pathophysiology of Chagas disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. AUG, 2019. DOI 10.3389/fmicb.2019.01856.

WEXLER, A. G.; GOODMAN, A. L. An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. **Nature Microbiology**, v. 2, n. April, p. 1–11, 2017. DOI 10.1038/nmicrobiol.2017.26. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>.

WEXLER, H. M. *Bacteroides*: The good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, 2007. DOI 10.1128/CMR.00008-07.

WORLD HEALTH ORGANIZATION(WHO) Epidemiology, 2019. Acesso em 20-jan-2020. disponível em : <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>

WU, P. *et al.* A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. **SSRN Electronic Journal**, 2018. DOI 10.2139/ssrn.3204563.

YILMAZ, B. *et al.* Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. **Cell**, 2014. DOI 10.1016/j.cell.2014.10.053.

YOOSEPH, S. *et al.* Stool microbiota composition is associated with the prospective risk of *Plasmodium falciparum* infection. **BMC Genomics**, 2015. DOI 10.1186/s12864-015-1819-3.