



**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Mestrado em Biologia Parasitária



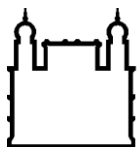
**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE  
CAMUNDONGOS SUÍÇOS INFECTADOS COM UM  
ISOLADO DE *Trypanosoma cruzi* PROVENIENTE DE  
SURTO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS EM SANTA  
CATARINA, BRASIL**

*CAROLINA SALLES DOMINGUES*



**RIO DE JANEIRO – RJ**

**Abril/2013**



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CAROLINA SALLES DOMINGUES

**AVALIAÇÃO DA INFEÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS  
SUÍÇOS INFECTADOS COM UM ISOLADO DE *Trypanosoma cruzi*  
PROVENIENTE DE SURTO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS EM  
SANTA CATARINA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências

**Orientadora:** Dra. Kátia da Silva Calabrese

**RIO DE JANEIRO – RJ**

**2013**



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

D671 Domingues, Carolina Salles

Avaliação da infecção experimental de camundongos suíços infectados com um isolado de *Trypanosoma cruzi* proveniente de surto oral da Doença de Chagas em Santa Catarina, Brasil / Carolina Salles Domingues. – Rio de Janeiro, 2013.

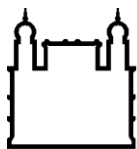
xvi, 154 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.

Bibliografia: f. 151-170

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Infecção oral. 3. Infecção intraperitoneal. 4. Camundongo. 5. Histopatologia. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AUTOR:** CAROLINA SALLES DOMINGUES

**AVALIAÇÃO DA INFEÇÃO EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGOS  
SUÍÇOS INFECTADOS COM UM ISOLADO DE *Trypanosoma cruzi*  
PROVENIENTE DE SURTO ORAL DA DOENÇA DE CHAGAS EM  
SANTA CATARINA, BRASIL**

**Orientador:** Dra. Kátia da Silva Calabrese

Aprovada em:04/Abril/2013

Examinadores:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado (Presidente)

Prof. Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet

Prof. Dra. Maria Aparecida de Souza

Suplentes:

Prof. Dra. Constança Felicia de Paoli e Carvalho Britto

Prof. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

Rio de Janeiro, **04 de Abril de 2013**

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmã e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, por me proporcionar a companhia e o amor de pessoas maravilhosas que estão a minha volta. Pela minha família que é o sentido da minha vida, minha força e o que desperta o melhor de mim. Pelas pessoas que colocou na minha vida, que me ajudam a seguir o meu caminho com mais alegria. Pelas oportunidades, pela presença em minha vida, pela saúde, pela vida.

Agradeço aos meus pais, Andréia e Celso, por serem maravilhosos, por demonstrarem o que significa a palavra família, pelo amor, pelo apoio, pela presença, pela preocupação, ouvindo as minhas dúvidas e comemorando as minhas conquistas, por tudo que já fizeram e fazem por mim até hoje.

À minha irmã, Bárbara, por poder contar com a sua amizade, seu apoio, seu carinho. Por estar sempre comigo, me ajudando e apoiando.

Aos meus tios, Gilton e Márcia, e primos Larissa e Tiago, por me acolherem em sua casa nestes dois anos de mestrado, um dos momentos mais importantes da minha vida. Por demonstrarem seu interesse, sua preocupação e carinho comigo.

Ao meu namorado Victor, pela força, amor e companheirismo e amizade que me ajudou a prosseguir e alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos Fernanda, Fernanda Rodrigues, Sumaya e Gabriel que participaram de momentos importantes da minha vida e que torcem por mim. Pela amizade e momentos maravilhosos, apesar de menos frequentes.

Às minhas amigas de turma do mestrado, Clara, Thais, Leilane e Renata por compartilharem momentos alucinantes nas disciplinas, pelas conversas, apoio, por momentos maravilhosos e pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Caroline, Daiana, Fernando, Flávia, Henrique, Mariana e Sandy por me ajudarem na realização do experimento, pois sem a ajuda deles a realização deste seria inviável. Pela amizade, pelo ambiente maravilhoso de cooperação e dedicação. Pelas risadas, conversas e conselhos. Ao Luis Otávio pela ajuda na coloração das lâminas e pela preocupação. Agradeço também à minha orientadora, Dra. Kátia Calabrese, e à minha conselheira, Dra. Celeste Freitas, que me ajudaram no desenvolvimento do

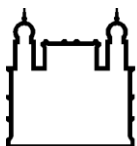
trabalho e permitiram a realização deste. Por serem amigas, carinhosas e preocupadas com o meu sucesso.

Aos pesquisadores Dra. Ana Abreu, Dr. Adeilton e Dr. Marcelo Pelajo, por me ajudarem na análise e interpretação de alguns resultados.

Aos membros da banca por aceitarem o convite, se prontificando a contribuir para mais um passo da minha formação profissional.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

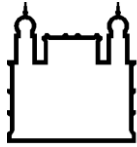
Chico Xavier



## RESUMO

A doença de Chagas é um problema de saúde pública mundial e acomete cerca de 10 milhões de pessoas. As formas de transmissão desta doença são variadas e embora a transmissão vetorial tenha sido controlada no Brasil, outras formas de transmissão asseguram a manutenção desta zoonose, como a contaminação pela ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*. Os recentes surtos orais da doença tem enfatizado a importância dessa via de transmissão nas infecções humanas. Evidenciando a necessidade de obtenção de dados que pudessem esclarecer os mecanismos envolvidos nesta forma de infecção pelo *T. cruzi*, o objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento da cepa SC2005, isolada de um surto de transmissão oral, no modelo murino. Deste modo, camundongos suíços foram infectados por via intragástrica (IG) ou por via intraperitoneal (IP) com formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura. Para avaliação da infecção analisou-se a parasitemia, contagem de leucócitos totais e específicos, índice tímico e esplênico, dosagem de anticorpos (IgG e IgM), análise histopatológica, PCR, citometria de fluxo e mortalidade. A parasitemia mostrou-se diferente nos dois grupos, com picos parasitemicos mais tardios e menos intensos nos camundongos infectados via IG. A mortalidade dos animais infectados por via IP foi mais acentuada e mais precoce quando comparada com a via IG. Nos camundongos infectados por via IP ocorreu no início da infecção leucopenia seguida de leucocitose, correlacionada positivamente ao aumento de parasitos. Entretanto, na infecção por via IG foi observado somente aumento dos monócitos correlacionado positivamente ao aumento de parasitos. A análise histopatológica mostrou um padrão miotrópico desta cepa, com a presença de infiltrados inflamatórios e parasitos em diferentes órgãos independente da via de infecção, além de focos de fibrose e redistribuição do colágeno. Hematopoiese extramedular foi vista no fígado e no linfonodo dos camundongos infectados. Os órgãos linfóides mostraram-se bastante ativados, exceto o timo, que não apresentou alteração. Estes dados confirmam os resultados observados com o índice esplênico, que estava elevado nos camundongos infectados por ambas as vias, enquanto o índice tímico estava próximo ao normal. A análise da citometria de fluxo demonstrou uma flutuação da população de linfócitos T no sangue, linfonodo mesentérico e baço nos animais infectados. Um aumento na proporção da população de células TCD8<sup>+</sup> foi observado no sangue e baço, enquanto uma diminuição na proporção de células TCD4<sup>+</sup> foi observada no linfonodo mesentérico. Esta variação demonstrou uma resposta específica e coordenada de diferentes regiões contra o parasito. A produção de anticorpos IgM e IgG foi baixa no momento inicial da infecção por via IP e elevada no transcorrer da infecção independente da via de infecção. DNA de *T. cruzi* associados à presença de infiltrados inflamatórios foram evidenciados pela PCR no esôfago, estômago e intestino de todos os camundongos infectados. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a influência da via de inoculação no estabelecimento e desenvolvimento da infecção pela cepa SC2005.

**Palavra chave:** *Trypanosoma cruzi*; infecção oral; infecção intraperitoneal; camundongo; histopatologia



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

## ABSTRACT

Chagas disease is a worldwide public health problem and affects approximately 10 million people. Although the vectorial transmission of Chagas has been controlled in Brazil there are other ways of transmission, such as the ingestion of food contaminated with *T. cruzi*, which ensures the continuation of this zoonosis. Recent outbreaks of the disease from the consumption of foods and beverages contaminated with *T. cruzi* have emphasized the importance of this transmission route in humans. Therefore due to the need to elucidate the mechanisms involved in oral infection by *T. cruzi*, this study aims to provide knowledge concerning the pathology of oral Chagas disease. Groups of Swiss mice were infected intragastrically (IG) or intraperitoneally (IP) with *T. cruzi* trypomastigotes forms of strain SC2005, derived from an outbreak of oral Chagas disease in Santa Catarina. To evaluate the mouse infection parasitemia levels, total and specific leukocytes, thymus and spleen index, serum antibodies (IgG and IgM), histopathology, PCR, flow cytometry and mortality were analyzed. The parasitemia levels showed differences between the two groups. The parasitemia peaks were later and less intense in mice infected by IG. Mortality of infected animals by the IP route was more intense and earlier when compared to the IG route. In the IP infected mice leucopenia occurred in the early infection followed by leukocytosis, correlating positively with the increase of the parasites. However, in the infection by the IG route only an increase in monocytes was observed, which positively correlated with the increase of the parasites. Histopathological analysis revealed a myotropic pattern of strain SC2005, with the presence of inflammatory infiltrates and parasites in different organs of the animals infected by the two routes as well as fibrosis foci and collagen redistribution. Extramedullary hematopoiesis was seen in the liver and lymph node of infected mice. There was an intense activation of the immune system organs, except the thymus, which showed no change. These data confirm the results observed with the spleen index, which was high for mice of both pathways, while the thymic index was close to normal. The flow cytometry analysis demonstrated a fluctuation of T lymphocyte population in blood, spleen and mesenteric lymph nodes in infected animals. An increasing proportion of the CD8<sup>+</sup> T cells was observed in blood and spleen, whereas there was a decrease in the proportion of CD4 + T cells in the mesenteric lymph nodes. This variation demonstrates a specific and coordinated response from different regions against the parasite. The IgM and IgG production was low at the initial stage of the infection via IP while it was higher over the course of infection in both IP and IG pathways. *T. cruzi* DNA associated with the presence of inflammatory infiltrates were detected by PCR in the esophagus, stomach and intestine of all infected mice. The results of this study show the influence of the inoculation route on the establishment and development of the *T. cruzi* SC2005 strain infection in mice.

**Key-words:** *Trypanosoma cruzi*, oral infection, intraperitoneal infection, mice, histopathology.



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>17</b>
1.1. Etiologia	18
1.2. O parasito	19
1.2.1. Ciclo biológico	21
1.2.2. Variabilidade genética do <i>T. cruzi</i>	22
1.3. Formas clínicas e tratamento	24
1.4. Formas de transmissão	28
1.4.1. Transmissão oral	29
1.4.1.1. Histórico da transmissão oral da doença de Chagas	30
1.4.1.2. Infecção oral e interação parasito-célula hospedeira	33
<b>2. Justificativa</b>	<b>36</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>38</b>
<b>4. Material e Métodos</b>	<b>40</b>
4.1. Animais	41
4.2. Parasitos	41
4.2.1. Caracterização do isolado	41
4.2.2. Obtenção das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> , cepa SC2005, derivadas de cultura de célula VERO	43
4.3. Desenho experimental	43
4.4. Parasitemia e Mortalidade	44
4.5. Leucometria global	44
4.6. Leucometria diferencial absoluta	45
4.7. Histologia	45
4.7.1. Técnica de Hematoxilina-eosina	46
4.7.2. Técnica de Giemsa de Lennert (Lennert, 1978)	47
4.7.3. Técnica de Picrosirius red (Sweat, <i>et al.</i> , 1964)	47
4.7.4. Técnica de Weigert (Bolton JS, 1898) com oxidação pela Oxona (Fulmer <i>et al.</i> , 1974)	48
4.8. Índice esplênico e tímico	49
4.9. Dosagem de anticorpos	49
4.10. Citometria de fluxo (FACs)	50
4.11. PCR	52
4.11.1. Extração de DNA dos tecidos	52
4.11.2. Amplificação dos fragmentos	52

4.12. Análise estatística	55
<b>5. Resultados</b>	<b>56</b>
5.1. Caracterização do isolado	57
5.2. Parasitemia e mortalidade	57
5.3. Cinética de leucometria global	57
5.4. Cinética da leucometria específica absoluta	62
5.5. Índice tímico e esplênico	65
5.6. Histopatologia	69
5.6.1. Análise histológica dos órgãos dos animais controle não infectados	69
5.6.2. Análise histopatológica dos órgãos dos animais infectados pela via Intraperitoneal (IP) com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> proveniente de cultura de células	69
5.6.2.1. 11º dia de infecção	69
5.6.2.2. 18º dia de infecção	79
5.6.3. Análise histopatológica dos órgãos dos animais infectados pela via intragástrica (IG) com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> proveniente de cultura de células	93
5.6.3.1. 26º dia de infecção	93
5.6.3.2. 33º dia de infecção	105
5.7. Dosagem de anticorpos	120
5.8. FACs	120
5.8.1. Baço	128
5.8.2. Linfonodos mesentéricos	128
5.8.3. Sangue	129
5.9. PCR	129
<b>6. Discussão</b>	<b>135</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>149</b>
<b>8. Referências bibliográficas</b>	<b>151</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 5.1	Visualização em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR do <i>T. cruzi</i> , isolado SC2005	58
FIGURA 5.2	Parasitemia dos animais infectados pela via intraperitoneal (IP) e intragástrica (IG) com $10^7$ formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC2005	59
FIGURA 5.3	Porcentagem de sobrevivência dos animais infectados intraperitonealmente (IP) ou intragastricamente (IG) com $10^7$ formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC 2005	60
FIGURA 5.4	Número absoluto de leucócitos totais do sangue periférico de camundongos infectados por via intraperitoneal (IP) com $10^7$ formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC 2005	61
FIGURA 5.5	Número absoluto de leucócitos do sangue periférico de camundongos infectados por via intragástrica (IG) com $10^7$ formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC 2005	63
FIGURA 5.6	Leucometria específica de camundongos infectados por via intraperitoneal (IP) com $10^7$ formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC 2005	64
FIGURA 5.7	Correlação (teste Spearman) entre a parasitemia e a contagem de leucócitos totais	66
FIGURA 5.8	Leucometria específica de camundongos infectados por via intragástrica (IG) com $10^7$ formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC2005	67
FIGURA 5.9	Correlação (teste Spearman) entre a parasitemia e a contagem de leucócitos totais	68
FIGURA 5.10	Índice esplênico (A) e tímico (B) dos animais infectados com $10^7$ formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC2005	70
FIGURA 5.11	Histopatologia do esôfago, estômago e “milky spot” dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	72
FIGURA 5.12	Histopatologia do estômago dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	73
FIGURA 5.13	Histopatologia do intestino e tecido adiposo próximo a este dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	74
FIGURA 5.14	Histopatologia do coração e pulmão de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigostas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	75

FIGURA 5.15	Histopatologia do fígado de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	76
FIGURA 5.16	Histopatologia do pâncreas de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	77
FIGURA 5.17	Histopatologia do tecido conjuntivo no pâncreas dos animais infectados intraperitonealmente (IP) com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	78
FIGURA 5.18	Histopatologia da adrenal dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de cultura, 11 dias após a infecção	80
FIGURA 5.19	Histopatologia do linfonodo e baço dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	81
FIGURA 5.20	Histopatologia rim e tecido adiposo próximo ao rim dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	82
FIGURA 5.21	Histopatologia da bexiga dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	83
FIGURA 5.22	Histopatologia do útero dos animais infectados intraperitonealmente formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção	84
FIGURA 5.23	Histopatologia do esôfago dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	85
FIGURA 5.24	Histopatologia do estômago dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	87
FIGURA 5.25	Histopatologia das placas de Peyer dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	88
FIGURA 5.26	Histopatologia do coração dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	89
FIGURA 5.27	Histopatologia do músculo adjacente à traquéia dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	90
FIGURA 5.28	Histopatologia do fígado dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	91

	derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	
FIGURA 5.29	Histopatologia do pâncreas e tecido adiposo próximo ao pâncreas dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	92
FIGURA 5.30	Histopatologia dos linfonodos e baço dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	94
FIGURA 5.31	Histopatologia do ureter, útero e tecido adiposo próximo ao útero dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção	95
FIGURA 5.32	Histopatologia do esôfago dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	96
FIGURA 5.33	Histopatologia do estômago dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	98
FIGURA 5.34	Histopatologia do intestino dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	99
FIGURA 5.35	Histopatologia do tecido adiposo próximo ao intestino dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	100
FIGURA 5.36	Histopatologia do coração dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	101
FIGURA 5.37	Histopatologia do fígado dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	102
FIGURA 5.38	Histopatologia do fígado dos animais infectados por via intragástrica formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	103
FIGURA 5.39	Histopatologia do pâncreas dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	104
FIGURA 5.40	Histopatologia do tecido adiposo peripancreático dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	106
FIGURA 5.41	Histopatologia dos linfonodos dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	107

FIGURA 5.42	Histopatologia do baço dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	108
FIGURA 5.43	Histopatologia do cérebro dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	109
FIGURA 5.44	Histopatologia do rim, ureter e bexiga dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	110
FIGURA 5.45	Histopatologia do útero e tecido adiposo próximo ao útero dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	111
FIGURA 5.46	Histopatologia do esôfago e estômago dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção	112
FIGURA 5.47	Histopatologia do intestino, placa de Peyer e “milky spot” dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	114
FIGURA 5.48	Histopatologia do coração dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	115
FIGURA 5.49	Histopatologia do coração e tecido conjuntivo próximo a traquéia dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	116
FIGURA 5.50	Histopatologia do fígado dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	117
FIGURA 5.51	Histopatologia do pâncreas dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	118
FIGURA 5.52	Histopatologia dos linfonodos dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	119
FIGURA 5.53	Histopatologia do baço dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	121
FIGURA 5.54	Histopatologia do cérebro dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	122
FIGURA 5.55	Histopatologia do rim e tecido adiposo perirenal dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a	123

	infecção	
FIGURA 5.56	Histopatologia da bexiga dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	124
FIGURA 5.57	Histopatologia do útero dos animais infectados por por via intragástrica com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção	125
FIGURA 5.58	Histologia dos animais controles não infectados	126
TABELA 5.1	Titulação de anticorpos (IgM e IgG) anti- <i>T. cruzi</i> , pela técnica de reação de imunofluorescência indireta no soro de camundongos infectados pela via IP ou IG.	127
TABELA 5.2	Análise do perfil de linfócitos T nos baços dos animais inoculados com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, pela via IP e IG	130
TABELA 5.3	Análise do perfil de linfócitos T nos linfonodos dos animais inoculados pela via IP ou IG com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC2005	130
TABELA 5.4	Análise do perfil de linfócitos T no sangue dos animais inoculados pela via IP ou IG com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC2005	130
FIGURA 5.59	Histograma das análises dos perfis de linfócitos T dos animais do grupo controle e animais inoculados pela via IP ou IG, com formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> derivadas de cultura de células, isolado SC2005	131
FIGURA 5.60	Visualização em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR do endogene GAPDH	132
FIGURA 5.61	Visualização em gel de agarose a 2% do DNA do parasito nos diferentes órgãos dos animais do grupo controle e dos animais infectados pela via IP	133
FIGURA 5.62	Visualização em gel de agarose a 2% do DNA do parasito nos diferentes órgãos dos animais do grupo controle e dos infectados pela via IG	134

## **1. INTRODUÇÃO**

---



## **1.1. Etiologia**

A doença de Chagas, considerada negligenciada, é um grande problema de saúde pública mundial. Acomete em todo o mundo cerca de 10 milhões de pessoas sendo a maioria residente nas áreas endêmicas compostas por 21 países nas Américas Central e do Sul: Argentina, Belize, Venezuela, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Bolívia, Suriname e Uruguai (OPAS, 2006, OPAS, 2012). Atualmente mais de 25 milhões de pessoas estão suscetíveis a contrair esta doença. Estima-se que no ano de 2008 a doença de Chagas tenha sido responsável pela morte de mais de 10.000 pessoas (WHO, 2012).

Apesar do grande número de casos registrados na América Central e do Sul, a doença deixou de ser um problema de saúde de pública isolado e passou a se estender a outros continentes. Nas últimas décadas o número de pacientes em áreas não endêmicas tem aumentado em regiões da América do Norte, Japão, Austrália e muitos países da Europa. A ocorrência de casos fora das regiões endêmicas e até mesmo em regiões sem transmissão vetorial é resultado da grande mobilidade da população mundial, através da migração, viajantes e até mesmo processos internacionais de adoção de crianças (Shcmunis, 2007, WHO, 2012).

A prevalência da doença de Chagas na Bolívia é de 6,8%, na Argentina de 4,1%, El Salvador de 3,4%, em Honduras de 3,1% e no Paraguai de 2,5% (Jr. Rassi e Rassi, 2012). No Brasil, a prevalência é de 4,2% e na região nordeste a taxa de infecção pode atingir mais de 5,0% (WHO, 2002; Aras *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2000). No período de 2000 a 2011, foram registrados no Brasil 1.252 casos de doença de Chagas aguda, sendo mais de 90% dos casos ocorridos na região norte do país. O estado do Pará registra quase que a totalidade dos casos notificados nesta região (Ministério da Saúde, 2012).

Em 1991 iniciou-se um extenso programa de combate à transmissão vetorial nos países do Cone Sul, seguido posteriormente também pelos países do Pacto Andino e América Central (Schofield e Dujardin, 1997). Estas iniciativas reduziram

significativamente a transmissão vetorial, especialmente pelo *Triatoma infestans* principal vetor da doença de Chagas nesses países e de hábito essencialmente domiciliar. Essas iniciativas foram satisfatórias no Brasil, Uruguai, Chile, Venezuela e partes da Argentina, Bolívia (Silveira, 2002; OPAS, 1992). Além disso, o controle da transmissão pela transfusão sanguínea tem colaborado para uma redução no número de casos (Moncayo, 2003) (WHO, 2010). Uma evidência da interrupção da transmissão pelo *T. infestans* é a redução da prevalência da infecção em crianças de faixa etária entre 0 e 5 anos mostrada através de inquéritos nacionais de soroprevalência (Moncayo, 2003; Dias, 2000; Schofield e Dias 1999).

Apesar do controle do principal vetor da doença de Chagas, vetores secundários como *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sórdida*, ainda desempenham um importante papel na transmissão da doença para o homem. A maioria das espécies de vetores conhecidas vive no meio silvestre, no entanto, ainda podem ser encontradas em distintas regiões do Brasil diferentes espécies de triatomíneo habitando regiões domiciliares e peridomiciliares (Ministério da Saúde, 2009).

## **1.2. O parasito**

A tripanossomíase americana, descrita em 1909 por Carlos Chagas, tem como agente etiológico o *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), parasito heteroxênico que obedece a seguinte posição sistemática (Leedale e Vickerman, 2000):

Reino: Protozoa

-Sub-reino: Neozoa

- Infra-reino: Discicristata

Filo: Euglenozoa Cavalier - Smith, 1981

Classe: Euglenoidea Bütschli, 1884

Ordem: Kinetoplastidae Honigberg, 1963

-Sub-ordem: Trypanosomatina Kent, 1880

Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901

Gênero: *Trypanosoma* Gruby, 1842

-Subgênero: *Schizotrypanum* Chagas, 1909, emend. Nöller, 1981

Espécie: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909

Os protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida caracterizam-se pela presença de flagelo único e mitocôndria única, que percorre toda extensão celular, e contem alta concentração de DNA mitocondrial, denominado kDNA, que forma uma estrutura denominada cinetoplasto (Sibley, 2011). O kDNA representa cerca de 20 a 30% do DNA total do parasito e está organizado sob a forma de maxi e minicírculos (Shapiro e Englund, 1995; Cano *et al.*, 1995). Toda esta estrutura é mantida de forma organizada e compactada possivelmente pela participação de proteínas básicas associadas ao DNA. Outras estruturas e organelas intracelulares especializadas como glicossomos, citóstomo, reservossomo, acidocalcissoma e vacúolo contrátil estão presentes nos parasitos membros desta ordem (Souza, 2009).

A membrana plasmática que envolve a célula atua de forma altamente seletiva e específica no sentido de interligar funcionalmente o ambiente extra e intracelular. Dependendo da forma evolutiva na qual se encontram os parasitos, diferenças significativas na conformação desta membrana podem ser notadas. Além disso, áreas especiais da membrana possuem características diferentes daquela que reveste o corpo celular. Abaixo da membrana pode ser observado um conjunto de microtúbulos em arranjo helicoidal ao longo de todo o corpo do parasito, o que lhe confere maior rigidez, exceto na região próxima à abertura da bolsa flagelar. Essa região é conhecida como citóstoma e está envolvida na captação de macromoléculas do meio (Souza, 2009).

O flagelo do *T. cruzi*, observado em todas as formas evolutivas do parasito, apresenta uma estrutura básica semelhante a outros flagelos. É envolvido por uma membrana que emerge da bolsa flagelar e apresenta um axonema composto de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Em algumas formas evolutivas o

flagelo apresenta uma estrutura denominada corpo paraxial ou estrutura paraflagelar composta por diversas proteínas (Bastin e Gull, 1999).

O *T. cruzi* passa por diferentes estágios de desenvolvimento em diferentes hospedeiros e apresenta, basicamente, quatro formas evolutivas distintas. Nos hospedeiros vertebrados são observadas as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas e nos hospedeiros invertebrados ocorrem formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (Chagas, 1909; 1921; 1927; Vianna, 1911; Brumpt, 1912a; 1912b; Hoare, 1972). As formas amastigotas, com aproximadamente 5µm de comprimento, são caracterizadas pelo formato esférico ou oval, cinetoplasto visível e corpo achatado com flagelo não exteriorizado, restrito a bolsa flagelar. As formas epimastigotas, medem 20 a 40 µm de comprimento e possuem cinetoplasto anterior ao núcleo, flagelo livre. As formas tripomastigotas possuem aproximadamente 25 µm de comprimento e caracterizam-se pela presença do cinetoplasto posterior ao núcleo, flagelo livre e membrana ondulante que percorre toda extensão da célula (Hoare, 1972; Tyler e Engman, 2001; Burleigh e Woolsey, 2002).

### **1.2.1. Ciclo biológico**

Em condições naturais, o *T. cruzi* pode ser transmitido aos hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, através de hemípteros da família Reduviidae, subfamília Triatominae, denominados triatomíneos. O *T. cruzi* é um parasito heteróxico, ou seja, se alterna entre hospedeiros invertebrados, triatomíneos, que atuam como vetores do parasito e hospedeiros vertebrados, uma grande variedade de mamíferos (Chagas, 1909; Tyler e Engman, 2001).

Existem dois ciclos diferentes de transmissão descritos para o *T. cruzi*: o ciclo silvestre que envolve vetores e mamíferos silvestres, que atuam como reservatórios do parasito, e o ciclo doméstico envolvendo hemípteros domiciliados, homens e animais domésticos. Segundo Coura e Dias (2009) a conexão entre esses dois ciclos pode ocorrer devido a presença de animais silvestres que vivem na região peridomiciliar ou pela migração de hemípteros silvestres ao ambiente peridomiciliar e/ou domiciliar.

O inseto vetor infectado apresenta em seu estômago formas epimastigotas de *T. cruzi*, as quais se multiplicam por reprodução assexuada e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas, infectiva para os hospedeiros vertebrados, na porção distal do seu intestino através da metaciclogênese. Ao realizar o repasto sanguíneo o inseto, simultaneamente, defeca liberando as formas tripomastigotas metacíclicas que penetram no hospedeiro vertebrado pelo local da picada ou por erosões da pele ou, ainda, pelo contato da mão contaminada, com material de dejeção dos barbeiros, com as mucosas dos olhos e/ou boca. No interior do organismo dos vertebrados essas formas são fagocitadas, principalmente por macrófagos e os parasitos, depois de escaparem do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira, diferenciam-se em formas amastigotas que se replicam assexuadamente no citoplasma celular. Após sucessivos ciclos de multiplicação os parasitos diferenciam-se em formas tripomastigotas, rompem a célula hospedeira e são liberadas na corrente sanguínea (Andrade & Andrews, 2005). Estas formas vão infectar outras células adjacentes ou se dispersam pela corrente sanguínea alcançando diferentes tecidos (Engman & Leon, 2002). Em um próximo repasto sanguíneo os triatomíneos ingerem essas formas tripomastigostas, junto com o sangue do vertebrado, e estas formas diferenciam-se em formas epimastigotas no intestino anterior do inseto vetor, dando continuidade ao ciclo (Chagas, 1909; Tyler e Engman, 2001).

### **1.2.2. Variabilidade genética do *T. cruzi***

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos abordando a caracterização de subpopulações de *T. cruzi* com o objetivo de definir o número de subgrupos deste parasito. O parasito apresenta inúmeras cepas distribuídas entre diferentes espécies de insetos vetores e hospedeiros mamíferos domésticos e silvestres (Zingales *et al.*, 1998). A evidenciação da alta variabilidade genética apresentada pelo *T. cruzi* é comprovada pelas técnicas de análises de isoenzimas (Miles *et al.*, 1977, 1978, 1980; Romanha, 1982), kDNA-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism of Kinetoplast DNA*) (Morel *et al.*, 1980), LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer*) (Vago *et al.*, 1996) e RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Steindel *et al.*, 1993).

Várias designações foram aplicadas a estes subgrupos. O termo zimodema foi proposto inicialmente por Miles e colaboradores. Os autores sugeriram a classificação em três grupos denominados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (Miles *et al.*, 1977, 1978, 1980). Segundo os autores, Z1 e Z3 estariam associados às cepas que circulam no ciclo silvestre e Z2 àquelas que circulam no ciclo de transmissão doméstico (Miles *et al.*, 1978, 1980; Barret *et al.*, 1980). Em 1982 Romanha descreveu outros zimodemas distintos ao analisar o perfil isoenzimáticos de amostras isoladas de pacientes chagásicos. Algumas eram similares às descritas anteriormente (Miles *et al.*, 1977, 1978, 1980) e outras completamente distintas entre si. Sendo assim, ficou determinado que, no Brasil, este parasito estaria classificado em pelo menos seis grupos isoenzimáticos principais: Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD.

Na década de 1990, com o objetivo de padronizar a nomenclatura das duas linhagens principais de *T. cruzi* descritas por diferentes autores e técnicas, foi adotada a subdivisão em duas linhagens principais, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII) (Anonymous, 1999). Mais tarde, estudos utilizando outros marcadores genéticos, propuseram a subdivisão do grupo TcII em cinco subgrupos, denominados TcIIa-TcIIe (Brisse *et al.*, 2000; 2001).

Alguns autores classificam cada subgrupo de *T. cruzi* como um grupo independente denominado como DTUs (*Discrete Typing Units*), os quais são divididos em seis subgrupos (TcI-TcVI) (Tibayrenc, 1998; Zingales *et al.*, 2009). Características epidemiológicas dos grupos TcI e TcII permitiram a associação das cepas do grupo TcI ao ciclo de transmissão silvestre e cepas do grupo TcII ao ciclo de transmissão doméstico (Anonymous, 1999). Em países do Cone Sul, isolados do grupo TcII são os principais responsáveis pelas manifestações clínicas da doença de Chagas. Entretanto, em países ao norte da Bacia Amazônica, como Venezuela e México, infecções humanas por *T. cruzi* estão comumente associadas ao grupo TcI (Miles *et al.*, 1981; Bosseno *et al.*, 2002).

Estudos sugerem que o *T. cruzi* seja uma espécie predominantemente clonal

com rara troca genética (Gibson e Miles, 1986; Tibayrenc *et al.*, 1986; Oliveira *et al.*, 1998; El-Sayed *et al.*, 2005). Entretanto, a recombinação entre subpopulações de *T. cruzi* é sugerida por alguns autores (Gaunt *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2009; Sturm e Campbel, 2010). Através de análises de microssatélites é possível determinar se uma cepa de *T. cruzi* é formada por um único clone (monoclonal) ou por mais de um clone (multiclonal). Na natureza ocorre a formação de populações de cepas multiclonais provenientes tanto dos hospedeiros vertebrados como dos invertebrados (Torres *et al.*, 2004) e infecções com essas cepas, envolvendo clones TcI e TcII, têm sido descritas no Brasil e na Bolívia (Bosseno *et al.*, 1996; Di Noia *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2004). Por outro lado, a porcentagem de populações multiclonais diminui quando cepas isoladas do ciclo silvestre são comparadas com cepas isoladas de pacientes. Isso sugere que talvez o organismo humano possa selecionar populações mais adaptadas a desenvolverem-se no seu organismo atuando assim como um filtro biológico (Oliveira *et al.*, 1998; 1999; Macedo *et al.*, 2001).

### **1.3. Formas clínicas e tratamento**

Diferentes autores apontam para o fato de que a genética do hospedeiro, assim como sua idade, sexo, nutrição, perfil imunológico e espécie (Souza, 2000; Macedo, Oliveira e Pena, 2002), além de fatores relacionados com o próprio parasito, como variabilidade genética, inoculo, virulência, infectividade e patogenicidade e ainda as condições de inoculação do parasito exercem uma influência crucial na patogênese da doença de Chagas (Souza, 1999). A variação genética de populações de *T. cruzi* parece influenciar na determinação das diferentes formas clínicas da doença (de Freitas, 2006). Entretanto, ainda não foi possível estabelecer, de forma segura, uma correlação entre a variabilidade genética desse parasito e as características clínicas da doença (Andrade *et al.*, 1999; Baptista *et al.*, 2006; D'Ávila *et al.*, 2006; Vago *et al.*, 2000).

A infecção chagásica humana inicia-se com uma fase aguda de intensidade variável e duração de dois a quatro meses, dependendo da via de infecção. Essa fase

caracteriza-se por multiplicação intensa de parasitos circulantes que pode desencadear diferentes sinais e sintomas como febre, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, náusea, anorexia. Entretanto, a maioria dos indivíduos não apresenta sintomatologia (Dias 1997; Teixeira *et al.*, 2006b).

Nesta fase ocorre a ativação exagerada do sistema imunológico do hospedeiro, em resposta a disseminação do parasito, como a presença de altos níveis de citocinas no plasma, intensa ativação de linfócitos T e B e intenso processo inflamatório associado à presença de ninhos do parasito nos tecidos. O coração é um dos órgãos mais afetados (Junqueira *et al.*, 2010), entretanto, as formas amastigotas também podem ser visualizadas em outros tecidos como músculos esqueléticos e lisos, células sanguíneas e do sistema fagocítico mononuclear (inclusive em linfonodos, baço e fígado), glândulas suprarrenais, sistema nervoso, ovários, testículos, pele, tecido subcutâneo, cartilagens dentre outros (Gonçalves da Costa *et al.*, 1991; Calabrese *et al.*, 1994; Gonçalves da Costa, *et al.*, 2002; Dias, 2006; Carvalho *et al.*, 2009).

Outra característica importante que pode ser evidenciada nesta fase é a lesão de porta de entrada do parasito. Quando a entrada é pela pele, uma lesão nodular com reação inflamatória conhecida como chagoma de inoculação pode ser evidenciada. Se a entrada do parasito no organismo ocorrer pela mucosa ocular, há a ocorrência de edema bi-palpebral unilateral denominado sinal de Romaña e aumento do linfonodos adjacentes (Romaña, 1934; 1935).

Mais de 99% dos casos de doença de Chagas aguda são assintomáticos ou aparecem como uma doença febril inespecífica. No entanto, a taxa de mortalidade chega a 10% em pacientes que apresentam os sintomas graves da doença aguda quando não tratados (WHO, 2002). A maioria dos óbitos ocorridos durante esta fase é devido à falência cardíaca (Laranja *et al.*, 1956; Coura e Borges-Pereira, 2010). Meningoencefalite também pode ocorrer durante a fase inicial da doença principalmente em indivíduos imunossuprimidos (Hoff *et al.*, 1978; Coura e Borges-Pereira, 2010). Contudo, se houver o desenvolvimento de uma imunidade adquirida eficiente, o nível de



parasitos no sangue (parasitemia) e nos tecidos (parasitismo) serão controlados (Junqueira *et al.*, 2010).

Existe ainda a forma indeterminada da doença de Chagas, que sempre foi assunto de discussões conceituais entre grupos que a estudam (Ianni e Mady, 1997). O termo indeterminada foi introduzido por Carlos Chagas (Chagas, 1916) e é definido pela presença da infecção comprovada por exames sorológicos e parasitológicos sem que o indivíduo apresente alterações eletrocardiográficas e/ou anormalidades radiológicas. Segundo Villela (1923), a fase indeterminada era reconhecida apenas como um estágio temporário ou como uma fase latente na qual a ausência dos sinais clínicos dá uma aparência saudável ao chagásico. Laranja *et al.* (1956) conceituaram fase indeterminada da doença de Chagas como sendo um longo período assintomático, geralmente de 10 a 20 anos, que ocorre entre o final da fase aguda e o estabelecimento de doença cardíaca crônica tardia.

Os indivíduos que sobrevivem à fase aguda evoluem para a fase crônica, onde a parasitemia é subpatente com escassos parasitos no sangue periférico e baixo parasitismo (Rezende e Rassi, 1983). No início da fase crônica a maioria dos pacientes é, geralmente, assintomática. Com o decorrer do tempo a ausência de sintomas pode persistir ou, então, pode evoluir para um comprometimento cardiovascular e/ou gastrointestinal (Rassi *et al.*, 2010). O comprometimento cardiovascular está relacionado a quadros de miocardite intensa que pode levar a cardiomegalia e arritmia (Gutierrez *et al.*, 2009 e Bilate & Cunha-Neto, 2008). A forma digestiva da doença é caracterizada pela formação de megacólon e megaesôfago. Mais de 30% dos pacientes desenvolvem lesões cardíacas e mais de 10% podem desenvolver alterações no esôfago, cólon ou sistema nervoso autônomo, todos eles na fase tardia da doença crônica (WHO, 2010).

Aspectos patológicos da doença de Chagas vêm sendo discutidos ao longo dos anos. Sabe-se que o parasito e a competência imunológica do hospedeiro contribuem para a patogênese da doença. Contudo os mecanismos pelos quais isso ocorre

permanecem controversos (Machado *et al.*, 2013). A destruição do miocárdio é uma característica da maioria das formas clínicas cardíacas severas da doença e é causada por processos inflamatórios progressivos e multifocais (Morris *et al.*, 1990), associado com danos no endotélio vascular (Huang *et al.*, 1999; Mukherjee *et al.*, 2004), espasmo dos vasos sanguíneos, redução do fluxo sanguíneo (Tanowitz *et al.*, 1996) e a associação do parasito ou antígenos parasitários com o infiltrado inflamatório (Higuchi, 1999).

O envolvimento da resposta imunológica inata na resistência do hospedeiro ao *T. cruzi* vem sendo estudada por vários autores. Zhang e Tarleton (1996) mostraram que a síntese de interleucina 12 (IL-12) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pelos macrófagos dos hospedeiros induzem a ativação de células *natural killer* (NK), as quais induzem a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$ . Após a liberação destas citocinas ocorre a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com o fenótipo secretório de células Th1. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são as principais células produtoras de IFN- $\gamma$ . Estes mecanismos imunológicos levam a ativação das células Th1 que ocorre predominantemente no início da fase aguda. Macrófagos ativados, pelo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , produzem óxido nítrico, o qual controla a multiplicação dos parasitos na fase aguda (Holscher *et al.*, 1998). Já a resposta imunológica adquirida é mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e por anticorpos. Os linfócitos Th1 ativam os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, mediado pelas citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  (Brener e Gazzinelli, 1997). Foi visto em modelo experimental que se há uma redução dos níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, um bloqueio da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> é observado, assim como a redução da ativação policlonal dos linfócitos B (Minoprio *et al.*, 1986). Além disso, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> constituem um dos principais grupos de células responsável pelo controle da replicação do *T. cruzi in vivo* (Brener e Gazzinelli, 1997).

Existe um crescente consenso de que uma resposta imunológica protetora requer a ativação de um perfil imunológico do tipo Th1, com a estimulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Higushi, 1999). Vários tipos de vacinas, incluindo proteínas recombinantes, DNA e vetores virais, bem como combinações heterólogas mostraram função imunogênica e

protetora em modelos experimentais, proporcionando a viabilidade de uma vacina preventiva ou terapêutica para o controle da infecção pelo *T. cruzi* (Quijano-Hernandez e Dumonteil, 2011).

Os indivíduos infectados que desenvolvem sintomas crônicos da doença de Chagas ao longo da vida não contam com medicação verdadeiramente eficaz, isto é, capaz de promover uma cura que não permita a persistência do parasito. Apenas duas drogas estão disponíveis para o tratamento desta infecção: o Nifurtimox e o Benzonidazol, sendo somente o segundo utilizado no Brasil. Estes medicamentos são tóxicos, produzindo efeitos em 30% dos pacientes, e só se mostram eficazes quando administrados em infecções recentes (30 a 70% de cura em infecções agudas), não tendo o mesmo desempenho na fase crônica da doença (Apt, 2010).

Na fase aguda é possível alcançar 70% de cura com a utilização do Benzonidazol e 75% de cura com o Nifurtimox; em casos congênitos 100% de cura é alcançada se o tratamento ocorrer durante o primeiro ano de vida da criança (Apt, 2010). Embora a maioria dos autores descreva que estas drogas promovam uma elevada taxa de efeitos adversos, outros afirmam que o tratamento com Benzonidazol é seguro (Hasslocher-Moreno *et al.*, 2012). Novas estratégias para o tratamento de pacientes na fase crônica da doença foram propostas por Coura e Borges-Pereira (2011). Dentre essas estratégias estão incluídas alteração no período de administração e combinação de drogas com diferentes mecanismos de ação. Contudo, ainda não existe nenhum fármaco eficaz no tratamento ou prevenção da doença de Chagas crônica.

#### **1.4. Formas de transmissão**

Em 2006 o Ministério da Saúde brasileiro recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana de Saúde. Sendo assim, o Brasil se tornou o primeiro país da América Latina a ter controle sobre transmissão vetorial da doença de Chagas, superando um grave problema de saúde pública, pois o *T. infestans* era o principal vetor no país (PAHO, 2007).

Entretanto, sendo o *T. cruzi* um organismo que realiza seu ciclo silvestre em florestas, como por exemplo, na Amazônia, a transmissão vetorial nunca será totalmente eliminada. Uma das maiores dificuldades está no controle de espécies silvestres como o *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus* que, ocasionalmente, invadem os domicílios mais próximos à mata, criando uma ponte entre os ciclos silvestre e domiciliar do parasito (Dias, 2000). Algumas espécies de triatomíneos se tornaram mais importantes sob o ponto de vista epidemiológico porque vem apresentando uma capacidade maior de adaptação ao peridomicílio e domicílio abrigando-se em galinheiros, currais, e/ou nas folhas de bananeiras ou palmeiras utilizadas como cobertura das casas (Dias, 2000).

Embora a transmissão pelo *T. infestans* tenha sido controlada no Brasil, as outras formas de transmissão ocorrem, mesmo que de forma esporádica, e asseguram a manutenção desta zoonose. Dentre elas, a transmissão transfusional (Moncayo, 1999; Moncayo, 2003); a transplacentária ou congênita (Prata, 2001; WHO, 1991; WHO, 2005); por transplantes de órgãos (Prata, 2001); acidentes laboratoriais (Coura *et al.*, 2002; Dias, 2006); e, finalmente, pela ingestão de alimentos contaminados (Coura *et al.*, 2002; Dias, 2006). Estas formas de transmissão são atualmente responsáveis pela manutenção da doença de Chagas em países da Europa, Japão, Austrália, América do Norte e América Latina (Teixeira *et al.*, 2011). Medidas de prevenção e controle devem ser tomadas como primordiais para um controle efetivo desta infecção (Silveira, 2011).

Desde a década de 1980 tem sido realizado um rigoroso controle dos doadores em banco de sangue e órgãos no Brasil, proporcionando também uma redução da transmissão transfusional da doença de Chagas. Esta cobertura na triagem dos bancos de sangue e doadores de órgãos deve ser mantida para garantir a segurança do processo e assegurar uma redução ou esgotamento da transmissão da doença de Chagas por esta via (Silveira, 2011). Na transmissão congênita a infecção do feto é inevitável, o diagnóstico do recém-nascido deve ser precoce, possibilitando o tratamento eficaz da doença (Silveira, 2011). Já os casos de transmissão acidental devem ser comunicados às comissões internas de Biossegurança das empresas ou

instituições e às autoridades sanitárias, possibilitando a investigação do caso e avaliação dos fatores de risco, além do tratamento precoce. Estes pacientes, além de medicados, devem ser submetidos a um monitoramento sorológico. A utilização de equipamentos de proteção individual por profissionais de saúde é necessária como medida de prevenção de acidentes (Ministério da Saúde, 2005c; 2009).

#### **1.4.1. Transmissão oral**

Com as efetivas medidas de controle para a transmissão vetorial, assim como, nos bancos de sangue e doação de órgãos, que eram consideradas vias importantes de transmissão da doença de Chagas, a forma de transmissão oral da doença adquiriu grande importância (Toso, 2011).

A transmissão oral ocorre naturalmente no ciclo enzoótico primitivo do *T. cruzi*, quando mamíferos suscetíveis ingerem vetores e/ou reservatórios infectados. A infecção humana por esta via ocorre de maneira esporádica e circunstancial, pelo consumo de alimentos contaminados com o parasito (WHO, 2002; Dias, 2006).

A viabilidade da transmissão oral da doença de Chagas vem sendo comprovada experimentalmente desde a década de 1920. Nathan-Larrier (1921) comprovou esta forma de infecção através da inoculação oral de formas sanguíneas do *T. cruzi* em animais. Estes experimentos foram reproduzidos por outros autores utilizando diferentes modelos experimentais. Os resultados demonstraram que o estabelecimento da infecção pode ocorrer com a ingestão desses parasitos, independente de sua forma evolutiva, assim por massas celulares originárias de mamíferos ou vetores contaminados (Brumpt, 1931; Kofoid e Donat, 1933; Cardoso, 1933; Dias, 1933; 1940; Marsden, 1967). Posteriormente, Storino & Jorg (1994) corroboraram a viabilidade da transmissão do *T. cruzi* pela via oral usando diferentes hospedeiros e vetores expostos a essa forma de contaminação. Além disso, Dias (2006) relatou a contaminação oral pela ingestão de formas do parasito cultivadas em laboratório.

##### **1.4.1.1. Histórico da transmissão oral da doença de Chagas**

Em humanos a primeira microepidemia de doença de Chagas transmitida por via oral foi relatada por Mazza *et al.*, (1936). Os autores descreveram a transmissão do *T. cruzi* por meio do leite materno. Na Argentina relatos de casos humanos foram descritos na região do Chaco através do consumo de uma bebida composta por várias ervas e sangue de tatu, provavelmente contaminado, oferecido por uma curandeira a uma criança, que acabou adoecendo, ou de pessoas que adoeceram após o consumo de carne de animais silvestres mal cozidas (Valente, Valente, e Pinto, 2006).

No Brasil, a primeira microepidemia foi registrada em 1965 em Teutônia, RS onde, simultaneamente, 17 pessoas se contaminaram após a ingestão de alimentos contaminados com secreções de animais silvestres (Nery-Guimarães *et al.*, 1968; Coura, 1966). A segunda microepidemia, em 1969, foi registrada em uma família residente em Belém (PA) onde os estudos epidemiológicos sugeriram a hipótese de transmissão por alimentos contaminados com fezes de triatomíneos (Shaw *et al.* 1969). A terceira microepidemia ocorreu em 1986 em Catolé da Rocha (PB) num grupo de 26 pessoas que ingeriu caldo de cana contaminado (Shikanai-Yasuda, 1986). As possibilidades supostas nessa época foram que, durante a moagem da cana, alguns insetos contaminados teriam sido triturados ou que a cana estivesse contaminada com secreções de animais silvestres infectados com o *T. cruzi*, dentre eles o gambá que era muito comum naquela região (Shikanai-Yasuda *et al.*,1991; Marcondes *et al.* 1987). Em 1996 foi registrada uma microepidemia no município de Mazagão no estado do Amapá. Este surto da doença de Chagas envolveu 17 pessoas de três famílias diferentes. Acredita-se que a transmissão tenha ocorrido pela ingestão de suco de açaí contaminado pelo *T. cruzi*, quando provavelmente, os triatomíneos foram atraídos pela luz e moídos durante o preparo do suco (Valente *et al.*, 1997). Na Amazônia Brasileira ocorrem regularmente microepidemias e a contaminação está associada principalmente ao consumo de açaí, bacaba e babaçu, palmeiras conhecidas por abrigar triatomíneos na região Norte do Brasil (Valente *et al.* 2001). Segundo pesquisas realizadas entre 1968 e 2005 ocorreram 442 casos autóctones de doença de Chagas. Destes, 437 foram casos agudos, sendo 11 fatais e cinco indeterminados ou crônicos (Valente *et al.*, 1997, 2000).

Em 2004 duas microepidemias foram registradas. Uma delas ocorreu em Igarapé da Fortaleza (Amapá) com 27 pacientes diagnosticados após consumo de açaí de um mesmo ponto de revenda (Ministério da Saúde, 2005b) e outra, com nove casos registrados, em Tefé. Depois, no estado de Santa Catarina, no ano de 2005, 31 pessoas foram contaminadas após a ingestão de caldo de cana vendidos em quiosques situados às margens da BR-101, em Navegantes (SC, Brasil) e cinco óbitos foram registrados, (Ministério da Saúde, 2005a).

Em 2006, ocorreram dois surtos orais de doença de Chagas aguda em duas cidades vizinhas: Macaúbas e Ibipitanga, ambas localizadas na região centro-sul do Estado da Bahia. O primeiro surto envolveu sete indivíduos de Macaúbas, todos de uma mesma família, dos quais dois foram a óbito. A contaminação ocorreu, provavelmente, por ingestão de água possivelmente contaminada por fezes de *T. sordida* infectado (Dias *et al.*, 2008). O surto de Ibipitanga ocorreu poucos meses depois e envolveu seis pessoas de uma mesma família que trabalhavam na lavoura e prepararam caldo de cana de açúcar em uma usina abandonada. Os indivíduos se infectaram após a ingestão deste caldo e desenvolveram sintomas da doença de Chagas aguda entre 11 e 21 dias após a ingestão. Doze espécimes de *T. sordida* foram capturados na usina de cana onde as pessoas se infectaram e um dos insetos estava infectado com *T. cruzi* (Bastos *et al.*, 2010).

Uma microepidemia ocorrida no interior do estado do Ceará no município de Redenção, também no ano de 2006, envolveu oito pessoas que ingeriram uma sopa contendo verduras mal cozidas, que segundo o autor do estudo, poderiam estar contaminadas com *T. cruzi* provenientes de fezes e urina de animais infectados (Cavalcanti, 2009). Posteriormente, foram capturadas 29 espécies de pequenos mamíferos nesta região e o percentual de animais sorologicamente positivos para doença de Chagas foi de 67,9%. A possibilidade de transmissão vetorial e transfusional foram descartadas depois de investigações clínica e epidemiológica (Cavalcanti, 2009).

No ano de 2007 foram investigados dois surtos com suspeita de transmissão

oral no estado do Pará, nas cidades Breves e Bagre. Os surtos envolveram 25 pessoas, sendo 12 delas residentes no município de Breves e 13 residentes no município de Bagre. Ambos os casos envolviam famílias que ingeriram açaí e água. Apesar disso, a busca entomológica nestas duas regiões nenhum triatomíneo foi encontrado (Barros *et al.*, 2009). Neste mesmo ano, 79 casos de doença de Chagas aguda ocorreram no Brasil, com quatro óbitos (letalidade de 5,0%) em 10 municípios, todos na Amazônia Legal. Em todos os casos o alimento mais frequentemente envolvido foi o açaí (Ministério da Saúde, 2007).

Mais recentemente, novos casos de contaminação oral por *T. cruzi* vem sendo notificados, em 2008: 74 casos; em 2009: 165 casos; em 2010: 21 casos (Medeiros *et al.*, 2008; Secretária de Saúde do Tocantins, 2009; Gerência de epidemiologia da Fundação de vigilância à Saúde/Amazonas, 2010). Só em 2011, 141 casos da doença por infecção oral foram notificados no Pará (SESPA, 2011).

No ano de 2012 a Secretaria Estadual de Saúde do Pará registrou 148 casos com três óbitos. Desses, acredita-se que a maioria tenha ocorrido por transmissão oral, já que os picos de registros coincidiram com a safra do açaí na região (SESPA, 2012).

O Brasil é o país com a maior ocorrência de casos por transmissão oral. Dos 1.252 casos de doença de Chagas aguda registrados no período de 2000 a 2011, 70% foram por transmissão oral (Ministério da Saúde, 2012). Desde 2006, esta forma de transmissão do *T. cruzi* vem sendo considerada como de relevância nacional em Saúde Pública devido ao crescente número de notificações de casos (Ministério da Saúde, 2007).

Segundo Silveira (2011) os fatores de risco envolvidos na ocorrência de surtos por contaminação oral dependem de fatores como: consumo de alimentos sem adequado transporte, a conservação ou preparo; presença de determinado vetor em área em que as fontes alimentares no ambiente silvestre possam ter sido restringidas, dispersando-os para ecótopos artificiais; redução drástica de ecótopos silvestres; fragilidade da habitação humana à entrada de vetores pelas condições de construção;



proximidade física das habitações com os ecótopos silvestres; atividades econômicas e questões culturais, favorecedoras do contato homem-vetor, entre outros.

Nesses casos é importante que se busque conhecer as práticas adotadas na conservação, transporte, processamento e preparo dos alimentos anteriormente ao seu consumo. Desse modo é indispensável a busca por definições de procedimentos de vigilância e controle apropriados para determinação das variáveis de risco. É certo que o processo de vigilância não irá prevenir todos os casos, porém pode levar a uma redução dos casos com a aplicação dos procedimentos adotados para doenças transmitidas por alimentos (Silveira, 2006).

Para assegurar a prevenção e controle da doença de Chagas transmitida pela via oral, além de boas práticas de higiene e aplicação dos conceitos de vigilância, é necessário enfoque na informação, comunicação e principalmente educação da população, para o conhecimento dos riscos envolvidos e da correta manipulação dos alimentos (OPAS, 2006).

#### **1.4.1.2. Infecção oral e interação parasito-célula hospedeira**

Estudos experimentais mostram que a severidade da doença de Chagas transmitida por via oral está relacionada com a capacidade do parasito de penetrar e se multiplicar no epitélio gástrico do hospedeiro. Segundo Hoft (1996), a mucosa gástrica atua como a única porta de entrada do parasito para uma infecção sistêmica. Após a invasão gástrica, as formas tripomastigotas, ingeridas com o alimento contaminado, se diferenciam no interior de células epiteliais em amastigotas, onde se multiplicam. Depois de algum tempo formas tripomastigotas são observadas no sangue (Cortez, *et al.*, 2006). Contrariamente, outros autores, afirmam que a penetração do *T. cruzi* pode ocorrer também através da mucosa oral, esofagiana e principalmente intestinal (Dias, 2006).

Glicoproteínas presentes na membrana do *T. cruzi* são responsáveis pela entrada do parasito no hospedeiro e por sua disseminação através de diversos órgãos e tecidos (Cortez, *et al.*, 2012). As formas tripomastigotas metacíclicas possuem uma

glicoproteína denominada gp82, a qual é responsável pela ligação dos parasitos à mucina gástrica, mediando à invasão das células do hospedeiro (Neira *et al.*, 2003). Pertence a mesma superfamília da gp82, a glicoproteína de membrana TC85-11, expressa nas formas tripomastigotas derivadas de cultura de células, a qual se liga à laminina, permitindo a passagem dos parasitos através de matrizes extracelulares alçando as células alvo (Giordano *et al.*, 1999). Estudos de infecções por via oral no modelo murino tem demonstrado que gp82 é a principal molécula de superfície de tripomastigotas metacíclicas, especializada na adesão à mucina gástrica e consequente penetração na mucosa adjacente (Neira *et al.*, 2003), conferindo assim, às formas tripomastigotas metacíclicas, maior capacidade de atravessar a camada de mucina. As formas tripomastigotas de cultura são mais suscetíveis à digestão pela pepsina se comparadas às formas tripomastigotas derivadas de barbeiros. Entretanto, ambas são igualmente capazes de atravessar a barreira de mucina gástrica e alcançar as células alvo (Cortez *et al.*, 2012).

A capacidade do *T. cruzi* em invadir e multiplicar-se no epitélio da mucosa gástrica murina, vem sendo vista por alguns pesquisadores como uma possibilidade para o desenvolvimento de uma vacina (Eickhoff *et al.*, 2010; Hoft *et al.*, 1996). Experimentos para avaliação de vias de infecção no modelo murino mostram que estas influenciam na patogênese da infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos inoculados por via oral ou intraperitoneal, com as cepas Colombiana e Peruana deste parasito mostram que a cepa Colombiana teve alta infectividade pelas duas vias, enquanto a Peruana mostrou alta infectividade somente pela via intraperitoneal. Nos casos humanos, a influência da cepa durante a transmissão oral ainda não foi comprovada, mas possivelmente também é importante (Camandaroba *et al.*, 2002).

## **2. JUSTIFICATIVA**

---

A importância da transmissão oral do *T. cruzi* para manutenção do ciclo silvestre da tripanosomíase americana está comprovada. Além disso, os recentes surtos da doença pela ingestão de alimentos e bebidas contaminados com *T. cruzi* tem enfatizado a importância dessa via de transmissão nas infecções humanas (Gus *et al.*, 1993; Calvo Mendes *et al.*, 1992; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991; Bittencourt *et al.*, 1988; Miles, 1972). Na maioria dos casos demonstrou-se a associação da ocorrência destes episódios com o consumo de alimentos *in natura*, como caldo de cana (Santa Catarina - 2005 e Bahia - 2006), bacaba (Maranhão, Pará -2006) e principalmente açaí (Pará – 2006 e 2007, Amazonas - 2007).

Em 2005, foi relatado em Santa Catarina um caso de transmissão oral da doença de Chagas relacionado ao consumo de caldo de cana contaminado com *T. cruzi*. Vários isolados de *T. cruzi* foram obtidos a partir deste surto, dentre esses o utilizado neste estudo.

Desta forma, o presente trabalho justificou-se pela necessidade de obtenção de dados que pudessem esclarecer os mecanismos envolvidos na infecção oral pelo *T. cruzi*, fornecendo conhecimentos sobre o comportamento da cepa SC2005, isolada de um surto de transmissão oral, no modelo murino.

### **3. OBJETIVOS**

---

**Geral:** Estudar a infecção de camundongos Swiss Webster por formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura do isolado SC2005, oriundo de caso humano de doença de Chagas aguda, comparando as vias intragástrica e intraperitoneal de inoculação.

**Específicos:**

1. determinar os níveis de parasitemia apresentada pelos animais infectados durante o curso da infecção;
2. avaliar a leucometria total e leucometria específica no sangue;
3. dosar pela técnica de Imunofluorescência Indireta os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-*T. cruzi* no soro dos animais;
4. descrever e analisar, através de diferentes técnicas de coloração, as alterações histopatológicas nos tecidos dos animais infectados em diferentes tempos de infecção (11, 18, 26 e 33 dias após a infecção);
5. avaliar por PCR a presença de DNA de *T. cruzi* no esôfago, estômago e intestinos;
6. avaliar por FACs as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, presentes no sangue, baço e linfonodo dos animais infectados;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---

#### **4.1. Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster com 4 a 6 semanas de idade obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL). Esta linhagem de camundongo foi escolhida por apresentar um perfil genético heterogêneo, permitindo a observação de diferentes respostas à infecção. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação animal do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira do Instituto Oswaldo Cruz em microisoladores com temperatura controlada, alimentação por ração apropriada e água filtrada *ad libitum*. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório da FIOCRUZ, licença nº LW 16/11.

#### **4.2. Parasitos**

Para o desenvolvimento do presente projeto utilizou-se a amostra SC2005 de *Trypanosoma cruzi*, isolada de sangue periférico de um indivíduo na fase aguda da doença, adquirida por infecção oral durante o surto de doença de Chagas em Santa Catarina, Brasil (Silva *et al.*, 2006).

##### **4.2.1. Caracterização do isolado**

Para caracterização da amostra de parasito utilizada neste projeto empregamos a técnica PCR-multiplex.

Os parasitos isolados do sangue periférico de pacientes foram semeados em meio de cultura axênico LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964) e mantidos em estufa (Shell Lab Mod.2020) a 34 °C. Para extração do DNA, a cultura contendo formas epimastigotas do parasito foi centrifugada (Jouan rotor AB2.14) a 1500g por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento formado foi ressuspenso em 300µl de tampão de lise: NaCl 10 mM, EDTA 5mM M, Tris-HCl (pH 8.0) 50mM, SDS (sodium dodecyl sulfate) 0.5%, por 2 horas a 37 °C. A seguir, foi acrescentado ao volume 500µl de fenol e agitado. Uma segunda centrifugação foi realizada a 18410g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado, transferido para um novo tubo e acrescentado, ao volume, 500µl de clorofórmio/álcool isoamílico (v/v). A seguir, o



conteúdo foi agitado durante 30 segundos por inversão e centrifugado (Jouan rotor AB 2.14) novamente a 18410g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. Acrescentou-se 1ml de etanol absoluto gelado e a solução agitada durante 30 segundos por inversão e, novamente, centrifugado a 18410g por 15 minutos a 4 °C. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi deixado à temperatura ambiente até a total evaporação do etanol. Finalmente o sedimento foi ressuspenso em 100µl de água livre de DNA e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

Após a extração, o DNA foi submetido à técnica de PCR-multiplex. Foram utilizados cinco primers, sendo três representantes de diferentes grupos de cepas de *T. cruzi* (TcI, TcII e TcIII). Como controle negativo foi utilizada uma solução com todos os reagentes, excetuando-se o DNA.

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA</b>	<b>Tm (°C)</b>
Tc1	5'-TTG CTC GCA CAC TCG GCT GCAT-3'	53
Tc2	5'-ACA CTT TCT GTG GCG CTG ATC G-3'	52
Tc3	5'-CCG CGW ACA ACC CCT MAT AAA AAT G-3'	52
Tr	5'-CCT ATT GTG ATC CCC ATC TTC G-3'	50
Exon	5'-TAC CAA TAT AGT ACA GAA ACT G-3'	42

As condições da reação e o perfil térmico usado foram padronizados para um termociclador Eppendorf Mastercycler gradiente, conforme quadro abaixo:

<b>Temperatura °C</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
95	5 min	1
94	30 seg	
55	30 seg	35
72	30 seg	

72	10 min	1
4	∞	

O produto da amplificação foi verificado através de eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 0,5X (2g de agarose em Tris 44,5mM; Ácido bórico 44,5mM; EDTA 1mM pH8.3) e seu tamanho estimado usando como padrão um marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases.

#### **4.2.2. Obtenção das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa SC2005, derivadas de cultura de célula VERO**

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa SC 2005, foram mantidas em meio de cultura axênico LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964) por 30 dias para a ocorrência da metaciclogênese parcial dos parasitos e obtenção dos tripomastigotas metacíclicos.

Concomitantemente, células de linhagem extraída do epitélio renal de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*, (VERO) foram cultivadas em garrafas de poliestireno em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) complementado com 10% de Soro Fetal Bovino, bicarbonato de sódio e L-glutamina em incubadora (Water Jacketed Forma Scientific, Inc mod. 3546) de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após a metaciclogênese as células foram infectadas com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 34 °C. Após o período de cinco dias as culturas foram lavadas três vezes com PBS para total remoção dos parasitos não internalizados. A partir daí, as culturas foram examinadas diariamente até que ocorresse a liberação das formas tripomastigotas no meio. Assim que ocorreu essa liberação o meio foi recolhido, transferido para tubos de centrifuga de 50mL e as garrafas com as células lavadas três vezes com PBS para total remoção dos parasitos. As suspensões foram então centrifugadas a 2880g (Jouan BR4i rotor S40) por 10min em temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio RPMI, os tripomastigotas quantificados em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para o inóculo necessário para infecção dos animais.

### **4.3. Desenho experimental**

Os camundongos foram divididos em três grupos os quais foram submetidos a 4 horas de jejum que antecederam a infecção. O grupo 1 (G1) foi composto de 55 camundongos e cada animal recebeu por via intragástrica (IG), com o auxílio de uma agulha de gavagem,  $10^7$  formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura (TCC) da cepa SC2005 em um volume de 0,1ml de meio RPMI. O grupo 2 (G2) foi composto por 30 animais e cada um inoculado por via intraperitoneal (IP) com  $10^7$  TCC cepa SC2005 em 0,2ml de meio RPMI. O grupo 3 (G3) foi composto por 15 animais normais não infectados, utilizados como grupo controle.

### **4.4. Parasitemia e Mortalidade**

Os animais tiveram sua parasitemia acompanhada diariamente a partir do dia que parasitos começaram a ser detectados no sangue periférico, até a morte de 50% dos animais. Os animais do G1 tiveram sua parasitemia acompanhada a partir do 5º dia de infecção e os animais do G2 a partir do 3º dia de infecção. Para isso, 10 camundongos de cada grupo (G1 e G2) foram sangrados pela cauda para a retirada de 5µl de sangue. Este volume era colocado entre lâmina e lamínula (22x22mm) e a quantidade de parasitos por mililitro de sangue foi estimada pela contagem de 50 campos de microscópio num aumento de 400X, conforme metodologia descrita por Pizzi e Prager (1952). A média e erro médio foram calculados.

A mortalidade de 10 animais de cada grupo (G1 e G2) foi acompanhada do início da infecção até o 30º dia após a infecção.

### **4.5. Leucometria global**

A contagem de leucócitos presentes no sangue (leucócitos/mm<sup>3</sup>) foi realizada concomitantemente à parasitemia nos grupos infectados e no grupo controle. Para tal, no momento da coleta de sangue para a parasitemia, uma alíquota de sangue foi diluída 1/20 em líquido de Turk (1ml de solução de violeta de genciana 1M em 100ml de solução de ácido acético 2%), para hemólise dos eritrócitos e coloração dos leucócitos. Para a contagem, 10µl dessa suspensão foram colocados em câmara de Neubauer e o

**Domingues, CS**

número de células dos quatro quadrantes externos contabilizados. O número de leucócitos total foi estimado obedecendo à seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de leucócitos X 200}}{4}$$

#### **4.6. Leucometria diferencial absoluta**

Para a contagem diferencial de leucócitos, esfregaços sanguíneos também foram confeccionados concomitantemente à parasitemia e à contagem de leucócitos totais, nos mesmos camundongos usados para estas técnicas. Uma pequena gota de sangue retirada de cada animal, dos grupos 1, 2 e 3, foi colocada diretamente sobre uma lâmina de vidro e com o auxílio de uma extensora arrastou-se o sangue ao longo da lâmina em um ângulo aproximado de 45° a fim de se obter um esfregaço fino, regular e de margens livres com boa distribuição das células. A secagem procedeu à temperatura ambiente e, posteriormente, os esfregaços foram corados em Panótico rápido (Laborclin – 07.379).

Para determinar os valores absolutos de cada tipo leucocitário foi realizada a contagem de 100 células, as quais foram diferenciadas em linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos. Para estabelecer a relação entre a leucometria global e a específica empregamos a seguinte fórmula a cada contagem:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total específico de leucócitos X N}^{\circ} \text{ de leucócitos totais}}{100}$$

#### **4.7. Histologia**

As necropsias para obtenção de fragmentos de tecidos foram realizadas nos dias correspondentes aos picos parasitêmicos de cada grupo: 11° e 18° dias pós-infecção nos animais infectados por via IP e 26° e 32° dias nos animais infectados por via IG.

Esses tempos foram determinados em um protocolo piloto, anterior aos experimentos, no qual os animais eram examinados diariamente para contabilizar os número de parasitos no sangue circulante e para determinar a curva parasitêmica. Após a morte de 50% dos animais a parasitemia foi encerrada e os dias de picos parasitêmicos determinados.

Sendo assim, nos tempos mencionados acima, para o estudo histopatológico três camundongos de cada grupo (G1 e G2) foram eutanasiados em câmara com atmosfera rica em CO<sub>2</sub> e todos os órgãos (cérebro, esôfago, estômago, intestinos, linfonodos, fígado, baço, pâncreas, rim e suprarenal, coração, timo, órgãos sexuais e bexiga) foram removidos e fixados em paraformaldeído a 4% em PBS 0,01M, pH 7,45, 4 °C por um período de 72 horas. Os intestinos antes da fixação foram lavados com PBS, enrolados e amarrados segundo a técnica de Moolenbeek e Ruitenbergh, 1981.

Após esse período, os órgãos foram clivados, exceto os intestinos, e processados para os estudos de microscopia de luz. A seguir, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 100GL), clarificados em xilol em inclusor Leica TP1020 impregnados e incluídos em parafina, em central de inclusão Microm AP280. Posteriormente, os blocos obtidos foram trimados e cortes de 5µm obtidos em micrótomo Microm HM360. Na sequência, os cortes obtidos foram desparafinizados em três trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (100GL, 90, 80, 70), e corados pelas seguintes técnicas: Hematoxilina-Eosina (HE), Picrosirius red (Direct Red 80, Aldrich Milwaukee, WI 53233, USA), resorcina-fucsina de Weigert, com prévia oxidação pela Oxona (monopersulfate compound - Sigma-Aldrich, Germany) e Giemsa de Lennert. As análises dos tecidos foram realizadas em microscópio de luz Zeiss Axioplan 2 e documentadas através de câmera Soft Imaging System (CC-12), principalmente com as objetivas de 10X e 20X.

#### **4.7.1. Técnica de Hematoxilina-eosina**

Esta técnica foi empregada para estudar a variação morfológica dos tecidos, onde os núcleos celulares são evidenciados pela coloração por hematoxilina e o citoplasma pela eosina.

Os cortes foram hidratados em decrescentes concentrações de etanol (100, 90, 80, 70GL) e água destilada e corados durante 7 minutos em hematoxilina de Harris pré-filtrada preparada previamente (2,5g de hematoxilina Sigma dissolvida em 25mL de álcool absoluto, e 50g de alúmen de amônio dissolvidos em 500mL de água destilada pré-aquecida. As duas soluções foram misturadas e aquecidas até breve fervura, retirada do fogo e acrescida de 1,25g de óxido vermelho de mercúrio. A solução foi resfriada, através da imersão do frasco em água fria. Acrescida de 20mL de ácido acético glacial, e amadurecida por 2 meses). Os cortes foram lavados, azurecidos em água corrente, diferenciados em álcool-ácido (5 gotas de ácido clorídrico em 100mL de álcool etílico a 95GL), novamente lavados em água corrente e corados por 2 minutos em solução alcoólica de eosina (5g de eosina Y “yellowish” - Merck dissolvidas em 200mL de água destilada acrescida de 800mL de álcool etílico absoluto). Finalmente, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 100GL), diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck).

#### **4.7.2. Técnica de Giemsa de Lennert (Lennert, 1978)**

Esta técnica foi empregada para melhor visualização do *T. cruzi* presentes nos tecidos e identificação dos diferentes tipos celulares.

Os cortes foram hidratados em decrescentes concentrações de etanol (100, 90, 80, 70GL) e água destilada e corados pelo Giemsa (20mL de solução de estoque Giemsa-Merck e 80 mL de água destilada) por 1 hora. Em seguida as lâminas foram imersas três vezes em solução aquosa de ácido acético a 0,3% e, posteriormente, em álcool etílico a 95GL até atingir a diferenciação desejada. Finalmente, os cortes foram desidratados em três banhos de álcool isopropílico com duração de três minutos cada, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck).

#### **4.7.3. Técnica de Picrosirius red (Sweat *et al.*, 1964)**

Esta técnica foi empregada para análise das fibras do complexo colágeno nos tecidos. A coloração permite a visualização das fibras espessas que se apresentam

marcadas de vermelho e sob luz polarizada com colorações que variam de amarelo a laranja e fibras finas que apresentam colorações variando de amarelo a verde.

Os cortes foram hidratados em decrescentes concentrações de etanol (100, 90, 80, 70GL) e água destilada. Posteriormente, corados por 1 hora em solução de

Picrosirius (0,1g de Sirius Red F3B200 - Sigma foi dissolvido em 100mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico). Em seguida foram lavados rapidamente em água destilada, corados durante 15 minutos em hematoxilina de Harris, lavados e azurecidos em água corrente por 10 minutos. Na sequência, foram desidratados em crescentes concentrações de etanol (70, 80, 90, 100GL), diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck). As análises dos tecidos foram realizadas em microscópio de luz Zeiss Axioplan 2 com e sem polarização.

#### **4.7.4. Técnica de Weigert (Bolton, 1898) com oxidação pela Oxona (Fulmer et al.,1974)**

Esta técnica foi utilizada para a avaliação do sistema elástico nos tecidos, através da identificação de fibras elaunínicas e oxitalânicas, as quais se coram em grená pela Fucsina-resorcina.

Os cortes foram hidratados em concentrações de etanol de 100 e 90GL e posteriormente oxidados por 40min em solução de oxona (monopersulfato de potássio – Aldrich) a 10%, com a finalidade de evidenciar as fibras oxitalânicas. A seguir, foram lavadas em água corrente e imersas sucessivamente em dois banhos de água destilada. Em seguida, os cortes foram corados por 1 hora em solução de Weigert (2g de fucsina básica, 4g de resorcina dissolvidos em 200mL de água destilada em ebulição. Acrescentou-se 25mL de uma solução aquosa de cloreto de ferro a 30%, essa solução foi fervida durante 5min, filtrada e o precipitado dissolvido em 200mL de etanol a 90GL aquecido. Após o resfriamento adicionou-se 4mL de ácido clorídrico concentrado ao precipitado). Posteriormente, os cortes foram lavados em álcool a 90GL e levados à água. Para coloração de fundo as lâminas foram imersas em solução aquosa de Orange G a 0,5% durante 30 segundos. Os cortes foram desidratados em

concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 100GL), diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck).

#### **4.8. Índice esplênico e tímico**

Antes da necropsia cada um dos três camundongos, de cada grupo, foi eutanasiado e o peso corporal, o peso do timo e do baço registrados após pesagem em balança analítica Marte®, modelo AM 550 para determinação dos índices esplênico e tímico. Os índices foram obtidos dividindo o peso do baço e do timo, separadamente, pelo peso total do animal.

#### **4.9. Dosagem de anticorpos**

A técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi realizada para detecção de anticorpos (IgM e IgG) anti-*T. cruzi* no soro dos animais infectados. Após eutanásia o sangue total de cada animal foi obtido, separadamente, por punção cardíaca. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado (Jouan BR4i – rotor AB2.14) a 18400g por cinco minutos, o soro separado, aliqotado e armazenado a -20 °C até o momento da realização dos testes.

Dez microlitros do antígeno eram pingados em lâminas de imunofluorescência, colocadas por 2h em estufa a 37 °C para secagem e em seguida, armazenadas a -20 °C até o momento do uso. Para a titulação, sobre o antígeno fixado, foram colocadas as amostras de soros nas diluições de 1:10 até 1:1280. Foram testados, paralelamente, soros controles positivos e negativos. A seguir, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida e ao final, lavadas três vezes em PBS por cinco minutos em agitação. Na etapa seguinte, as lâminas receberam anticorpo anti-IgG de camundongo com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e foram, mais uma vez, incubadas e lavadas como na etapa anterior. Finalmente, após completa secagem, as lâminas foram montadas com glicerina/parafenol diamino (ppd) e a fluorescência dos parasitas analisada em microscópio de fluorescência (HBO 50 Axiolab - Zeiss). A titulação foi estabelecida pela última diluição que pudesse ser encontrada fluorescência na superfície do parasita.



#### **4.10. Citometria de fluxo (FACs)**

Nos mesmos pontos de necropsia, esta técnica foi empregada para quantificação das subpopulações de linfócitos CD4 e CD8 positivos presentes no sangue total, linfonodos e baço de três camundongos de cada grupo experimental.

Para tal, após necropsia, o sangue total de cada animal foi coletado por punção cardíaca utilizando salina citratada (NaCl 0,87%; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O) como anticoagulante e mantido em banho de gelo. Ao volume total foi acrescentado volume igual de meio RPMI com 10% de SFB e, essa mistura, colocada delicadamente sobre 1ml de solução de Ficoll-Hypaque em tubos do tipo Falcon. Em seguida esta mistura foi centrifugada (Jouan BR4i rotor S40) a 1037g por 20 minutos, sem freio, em temperatura ambiente, para a formação do anel linfocitário.

Para obtenção das células do baço e linfonodos, os órgãos após a remoção foram imediatamente colocados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) complementado com 10% de Soro Fetal Bovino, bicarbonato de sódio e L-glutamina, e mantido em gelo. A seguir, os órgãos foram macerados em placas de petri e malha metálica com auxílio de êmbolo de seringa plástica e mantidos em gelo.

As suspensões obtidas (sangue, baço e linfonodo) foram lavadas, separadamente, duas vezes em 10ml de PBS-BSA (Sigma – P3688) com 10% de Soro Fetal Bovino e centrifugadas a 1125g durante 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes de cada suspensão foram desprezados e os sedimentos reservados (em gelo).

Ao sedimento obtido da suspensão de células do baço foi acrescentado 3ml de tampão de lise de hemácias ACK 5M ( NH<sub>4</sub>Cl - 0.15 M, KHCO<sub>3</sub> - 10 M; . Na<sub>2</sub> / EDTA - 0.1 mM em H<sub>2</sub>O destilada) e incubado em estufa 37 °C por aproximadamente 5 minutos. Após esse tempo foram acrescentados 27ml de meio RPMI com 10% de SFB à solução homogenizada. A seguir, as células foram centrifugadas a 1125g durante 5 minutos a 4 °C e lavadas uma vez em 10ml PBS-BSA, com 10% de Soro Fetal Bovino.

As etapas seguintes, após o procedimento realizado com as células do baço, foram aplicadas a todos os sedimentos obtidos (linfonodo, baço e sangue). As células

foram incubadas por 30 minutos com 5ml PBS-BSA com 10% de Soro Fetal de Cavalo, em gelo, separadamente. As células foram contadas em câmara de Neubauer e as quantidades ajustadas de maneira que as mesmas ficassem distribuídas em uma concentração final de  $1 \times 10^6$  células por poço em placa de 96 poços. A seguir, as placas foram centrifugadas a 804g durante 5 minutos (Jouan BR4i – rotor S20) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de cada poço ressuspenso em 20µl de uma solução de anticorpos monoclonais anti-linfócitos T totais TCD3<sup>+</sup> conjugado com Alexa Fluor 488 (Biolegend), anti-linfócitos T CD4<sup>+</sup> conjugado com PE (Biolegend), e anti-linfócitos TCD8<sup>+</sup> conjugado com Percp (Biolegend) diluídos em PBS-BSA com 10% de Soro Fetal de Cavalo, conforme titulação realizada anteriormente para determinação da concentração utilizada. Essas placas foram incubadas por 20 minutos protegidas da luz em geladeira. Depois da incubação, as placas foram lavadas duas vezes adicionando-se 150µl de PBS pH 7,2 em cada poço da placa e, depois centrifugadas (Jouan BR4i – rotor S20) a 804g durante 5 minutos a 4 °C. Após as lavagens, as células foram ressuspenso em 100µl de solução de paraformaldeído 1% para fixação e incubadas protegidas da luz, em geladeira, por no mínimo 30 minutos. Antes da análise, as células foram novamente lavadas duas vezes, conforme descrito na etapa anterior e incubadas por no mínimo 10 minutos em temperatura ambiente na solução da última lavagem. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo Attune (Applied Biosystems), pertencente à plataforma de equipamentos multi-usuários do Instituto Oswaldo Cruz, e analisadas utilizando o pacote do software Attune (Applied Biosystems). O total de 20.000 eventos foi adquirido em cada amostra. As células do baço, sangue e linfonodo tiveram as populações de linfócitos selecionadas com base em sua distribuição nos padrões de granulosidade e tamanho. As células referentes a região de linfócitos anteriormente delimitada e positivas foram selecionadas em um histograma. A partir desta marcação, duas populações de células positivas com base na fluorescência dos canais FL2- PE e FL3- Percp foram obtidas. As porcentagens de células positivas e de células não marcadas foram determinadas.

## **4.11. PCR**

### **4.11.1. Extração de DNA dos tecidos**

Amostras de tecidos do esôfago, estômago e intestinos de três camundongos de cada grupo foram reservadas, no momento da necropsia, e armazenadas em microtubos do tipo “ependorf” e submetidas ao processo de extração de DNA para detecção do DNA parasitário nestes órgãos. O DNA genômico foi isolado dos tecidos através da adição de 500µl do tampão de lise (10mM NaCl, 5mM M EDTA (ethylenediaminetetracetic acid), 50mM Tris–HCl (pH 8.0), 0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate) acrescido de 5µl de proteinase K a 20 mg/ml e incubados por 12 horas a 56 °C - Thermostat 5320 – Eppendorf). Após esse período, 500µl de fenol foram acrescentados em cada amostra e a suspensão homogeneizada em Vortex ( Phoenix – A56) e centrifugado (Jouan rotor AB 2.14) a 18410g durante 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram recuperados e transferidos para novos tubos e acrescentado, ao volume, 500µl de clorofórmio/álcool isoamílico (v/v). Após agitação durante 30 segundos por inversão e nova centrifugação a 18410g por 15 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram, novamente, recuperados e transferidos para novos tubos. Nesta próxima etapa, 1 ml de etanol absoluto gelado foi acrescentado ao conteúdo de cada tubo e, a seguir, agitado durante 30 segundos por inversão e novamente centrifugado a 18410g por 15 minutos a 4 °C. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi deixado à temperatura ambiente até a total evaporação do etanol. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 100µl de água livre de DNA e armazenado a -20 °C até o momento da quantificação do DNA genômico que foi realizado em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 – Thermo scientific).

### **4.11.2. Amplificação dos fragmentos**

A técnica de PCR foi aplicada ao DNA extraído dos tecidos mencionados no item anterior, a fim de identificar a presença do DNA parasitário nos mesmos.

A amplificação do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH de camundongo (Forward 5'- TCACCACCATGGAGAAGGC -3' e Reverse 5'-

GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3') tem como produto um fragmento de 171 pares de base que foi utilizado como controle interno da reação e para a avaliação da viabilidade do DNA genômico, após o processo de extração. Esta metodologia foi realizada por amostragem, sendo utilizados três fragmentos de tecidos diferentes e de tempos distintos. As condições da reação foram padronizadas, conforme demonstrado no quadro abaixo:

<b>Solução</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume</b>
Tampão	10 X [100mM de Tris-HCl pH8,3 em 500mM de KCl	5µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3µL
dATP	15 mM	2µL
dTTP	15 mM	2µL
dCTP	15 mM	2µL
dGTP	15 mM	2µL
Primer GAPDH Reverse	10µM	3µL
Primer GAPDH Fowerd	10µM	3µL
Taq DNA polimerase	5U/µL	0,5µL
DNA	20 ng	2µL
Água		q.s.p 50µl

O perfil térmico foi utilizado em um termociclador (GeneAmp 9600 PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA) conforme quadro abaixo:

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
94	10 min	1
94	30 seg	
62	30 seg	35
72	30 seg	
72	10 min	1
4	∞	

A reação de PCR para evidenciar a presença de DNA parasitário foi realizada empregando os primers 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTTGCATTGGGTTGGTGTAAATATA-3') que amplificam o fragmento de 330 pares de bases contendo as regiões hipervariáveis dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (k-DNA) do parasito. As condições do PCR seguiram o que está expresso no quadro abaixo:

	<b>Concentração</b>	<b>Volume</b>
Tampão	10 X [100mM de Tris-HCl pH8,3 contendo 500mM de KCl ]	5µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	4µL
dATP	15 mM	1µL
dTTP	15 mM	1µL
dCTP	15 mM	1µL
dGTP	15 mM	1µL
Primer 122 Reverse	10 pmoles/µL	1,5µL
Primer 121 Foward	10 pmoles/µL	1,5µL
Taq DNA polimerase	5U/µL	0,25µL
DNA	4 ng	2,5µL
Água		q.s.p 50µl

O perfil térmico usado encontra-se no quadro abaixo:

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
94	3 min	1
98	1 min	
64	2 min	2
94	1 min	
64	1 min	38
72	10 min	1
4	∞	

Os produtos das ampliações foram verificados em gel de agarose 1,5% corado com Nancy-520 (Sigma) usando como condutor da corrente elétrica o tampão TBE 1x (Tris 89mM; Ácido bórico 89mM; EDTA 2mM pH8.3).

#### **4.12. Análise estatística**

Todos os dados apresentados foram obtidos através do cálculo da média e SEM dos valores brutos.

Para o cálculo da significância dos resultados obtidos nas leucometrias globais e específicas e índices esplênico e tímico foi aplicado o teste paramétrico ANOVA (One - Way Analysis of Variance) e o pós-teste Tukey-Kramer para dados não paramétricos.

As correlações entre os valores encontrados na realização das técnicas de parasitemia e leucometria total dos animais infectados via IP e IG foram testadas usando o teste Spearman de correlação e regressão linear. Valores com o  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

A significância dos resultados obtidos com a citometria de fluxo foi analisada com o teste 2-Way ANOVA.

Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPhad Prism. A análise da mortalidade foi realizada de acordo com a curva de sobrevivência gerada pelo programa GraphPhad Prism.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

## **5. RESULTADOS**

---

### **5.1. Caracterização do isolado**

O PCR multiplex foi utilizado para a caracterização do isolado utilizado no presente estudo. Os resultados mostraram que o isolado SC2005 pertence ao subgrupo Tc II (Figura 5.1).

### **5.2. Parasitemia e mortalidade**

Na figura 5.2 está representado o gráfico de avaliação dos níveis de parasitemia dos camundongos infectados por via intraperitoneal (IP). É possível observar que neste grupo a presença dos parasitos ocorreu mais precocemente, já a partir do 3º dia após a infecção, quando comparado com os animais infectados por via intragástrica (IG) cuja presença do parasito no sangue só foi observada 10 dias após da infecção, como demonstrado na figura 5.2. Dois picos de parasitemia foram observados tanto nos animais infectados IP quanto IG. Nos animais infectados IP esses picos foram detectados mais precocemente, no 10º e 13º após a infecção com níveis parasitários mais elevados,  $2.9$  e  $4.3 \times 10^6$  parasitos/ml, respectivamente, quando comparados com o grupo infectado IG que apresentou picos parasitários de  $0,9$  e  $1,7 \times 10^6$  parasitos/ml 13 e 18 dias após a infecção, respectivamente. Somente 36% dos animais infectados pela via IG apresentaram parasitemia, os quais foram utilizados para a realização dos experimentos.

A mortalidade foi registrada primeiramente no grupo dos animais infectados IP que aos 18 dias de infecção já apresentavam um índice de mortalidade de 80% com um tempo médio  $16,13 \pm 0,8$ . No grupo infectado IG a mortalidade foi de 30% neste mesmo período. Contudo, tempo médio de mortalidade foi maior, de  $22,67 \pm 2,0$  (Figura 5.3).

### **5.3. Cinética de leucometria global**

A cinética da contagem dos leucócitos totais dos animais infectados IP mostrou um padrão heterogêneo, alternando entre quadros de leucopenia e leucocitose. No início da infecção (do 3º ao 7º dia) estes camundongos mostraram valores de leucócitos abaixo dos valores observados nos animais controles não infectados. Entretanto, no 10º dia após a infecção, o número de leucócitos ficou próximo do valor encontrado nos animais normais. Logo após esse ponto, os valores aumentaram progressivamente até o 12º dia, e voltaram a cair no 13º dia. A partir deste ponto, novamente, registramos aumento no número de células (Figura 5.4).



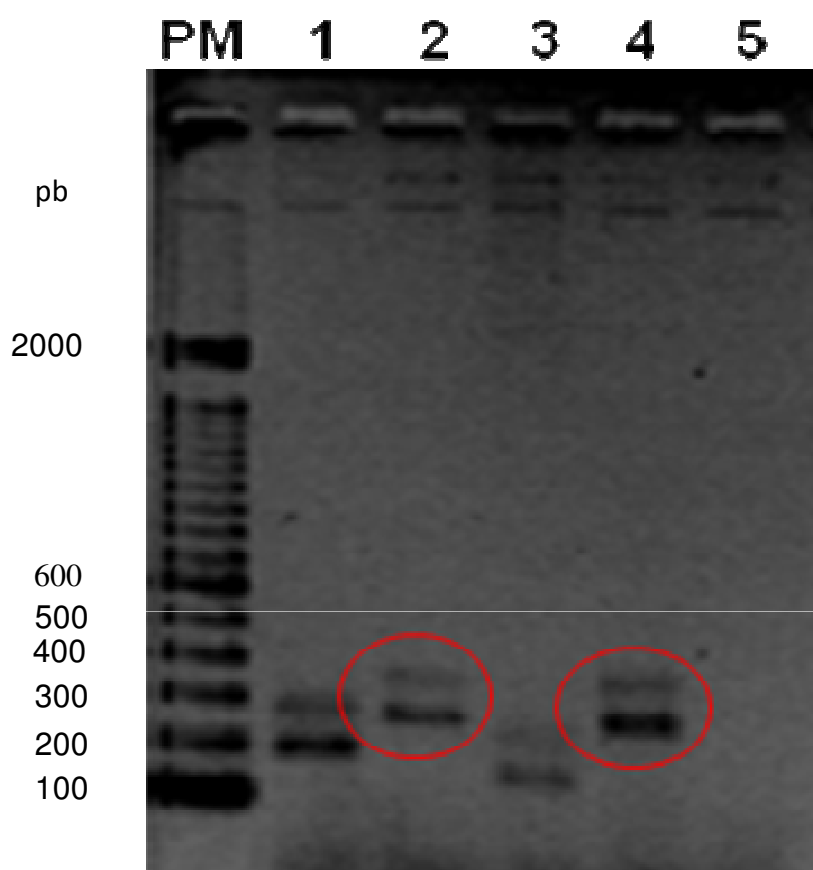


Figura 5.1 – Visualização em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR do *T. cruzi*, isolado SC2005 (PM- Peso Molecular; 1- Cepa Dm28/*T. cruzi* (Tc I); 2- Cepa Y/*T. cruzi* (Tc II); 3- 4167 (Tc III); 4- Cepa SC2005/*T. cruzi* (Tc II) e 5- Controle Negativo).

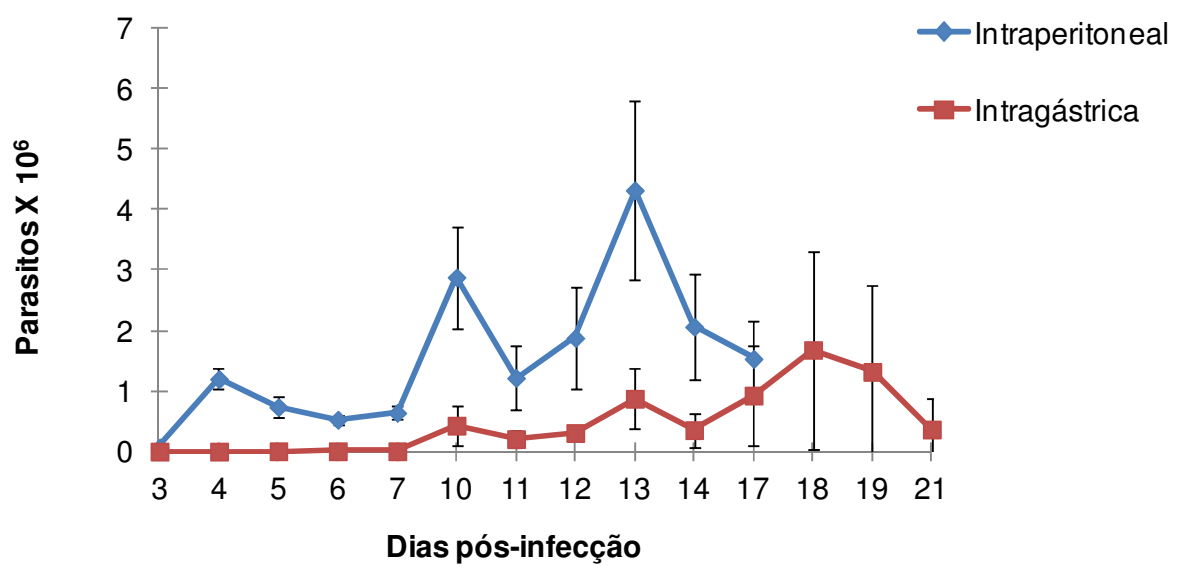


Figura 5.2 - Parasitemia dos animais infectados pela via intraperitoneal (IP) e intragástrica (IG) com  $10^7$  formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005.

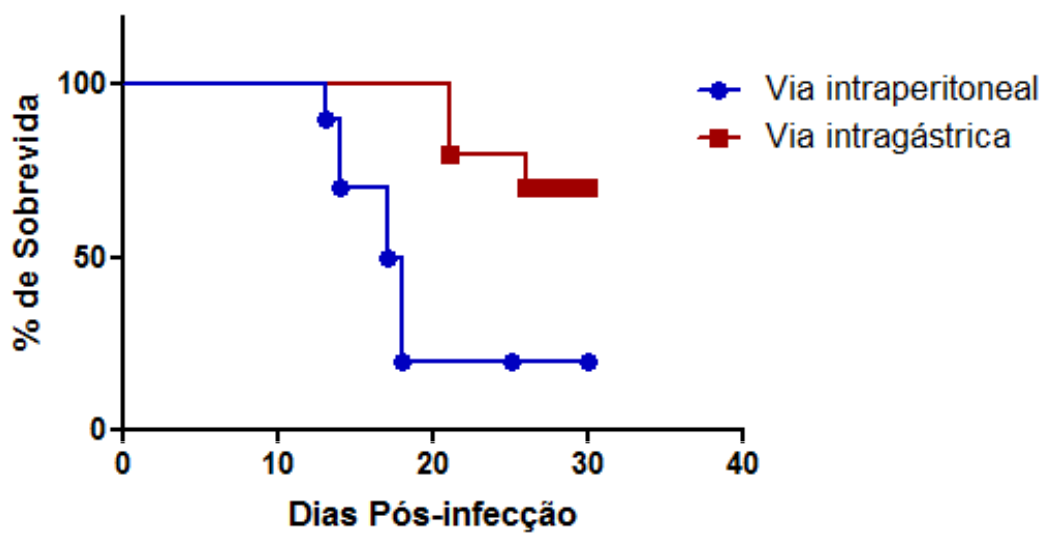


Figura 5.3 - Curva de sobrevivência dos animais infectados intraperitonealmente (IP) ou intragastricamente (IG) com  $10^7$  formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, *isolado SC 2005*.

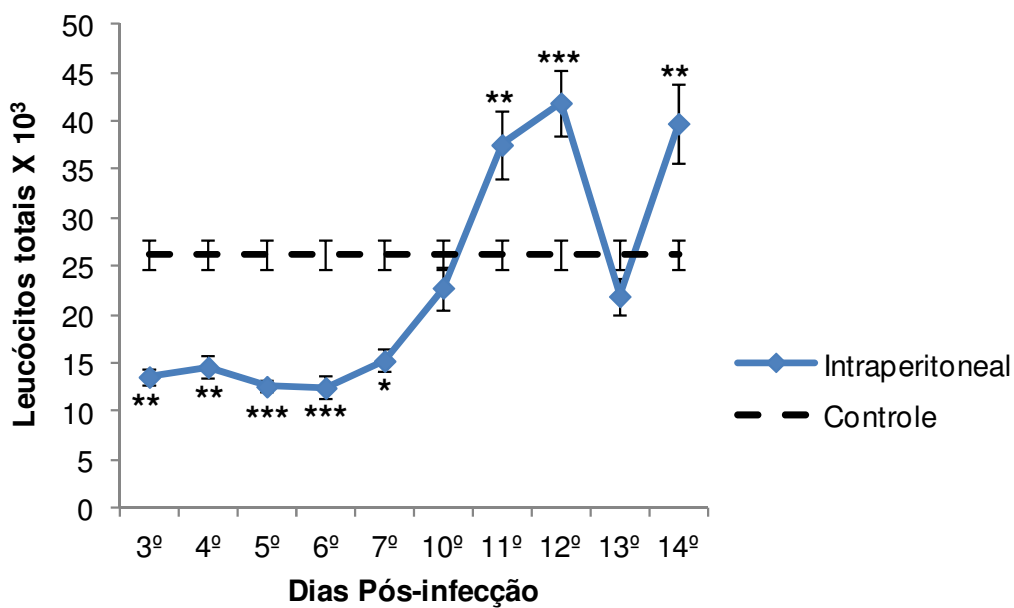


Figura 5.4 – Número absoluto de leucócitos totais do sangue periférico de camundongos infectados por via intraperitoneal (IP) com  $10^7$  formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC 2005. O valor para os camundongos normais é expresso pela média de todas as contagens. Foram considerados significativos valores com o  $p < 0,05$ .  
 $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Os animais do grupo infectados IG apresentaram também um padrão heterogêneo na contagem de leucócitos totais, entretanto os valores registrados apresentaram variações menores quando comparado com os resultados obtidos com os animais do grupo IP. Um quadro de leucopenia foi registrado até o 14º dia de infecção. A partir do 17º observou-se leucocitose e este quadro permaneceu estável até o final do experimento (Figura 5.5).

#### **5.4. Cinética da leucometria específica absoluta**

A figura 5.4 mostra a cinética da leucometria específica absoluta no sangue dos animais infectados por via IP.

O nível de neutrófilos foi semelhante ao observado no grupo controle, com um discreto aumento no 4º e decréscimo no 6º e 7º dias após a infecção. A partir do 10º dia houve um aumento progressivo destas células com queda no 13º e 14º dias (Figura 5.6 A).

No início da infecção estes camundongos mostraram uma linfocitose com aumento desta população celular do 7º ao 12º dia de infecção, quando se observou leucocitose. Posteriormente, os linfócitos atingiram os níveis de normalidade seguidos de aumento no número destas células (Figura 5.6 B).

A quantificação dos monócitos mostrou níveis normais até o 10º dia de infecção com um aumento no 11º dia e redução progressiva nos tempos posteriores até atingirem níveis comparáveis aos obtidos nos animais normais (Figura 5.6 C).

O número da população de eosinófilos se mostrou abaixo dos valores de normalidade, exceto no 3º, 11º e 12º após a infecção quando estes se igualavam aos apresentados pelos animais normais (Figura 5.6 D).

A contagem de basófilos mostrou um perfil semelhante ao observado nos animais do grupo controle exceto, no 10º dia de infecção quando um aumento foi observado (Figura 5.6 E).

Foi observada uma correlação significativa entre os níveis de parasitos registrados pela parasitemia e a contagem de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos dos animais infectados pela via IP, ou seja, a variação na parasitemia afeta, diretamente a porcentagem destas populações celulares no sangue circulante. Em relação à contagem das demais populações celulares analisadas (monócitos,

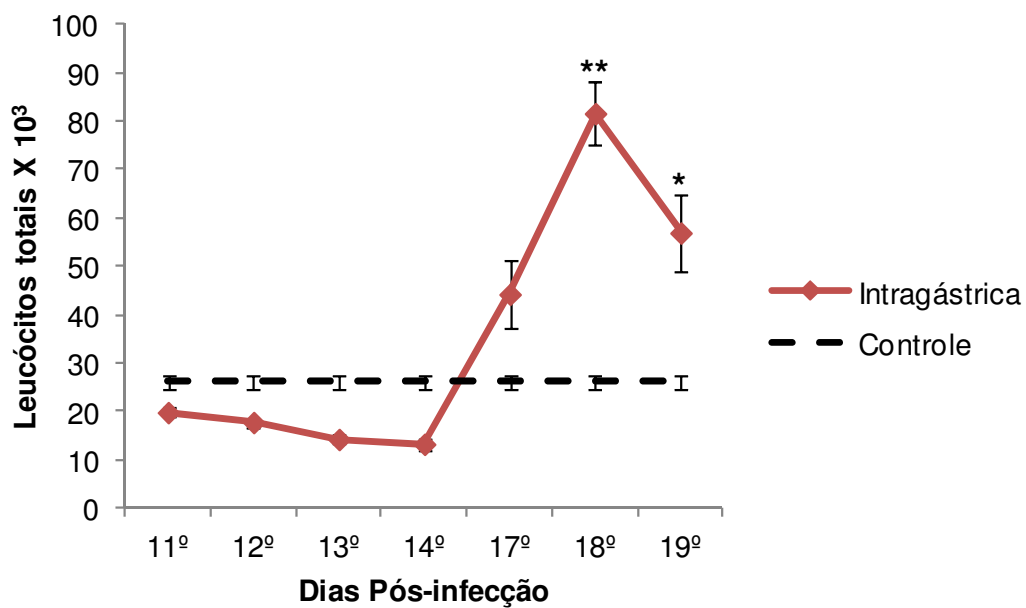


Figura 5.5 - Número absoluto de leucócitos do sangue periférico de camundongos infectados por via intragástrica (IG) com  $10^7$  formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC 2005. O valor para os camundongos controle é expresso pela média de todas as contagens. Foram considerados significativos valores com o  $p < 0,05$ .

\*  $p < 0,01$  \*\*  $p < 0,001$

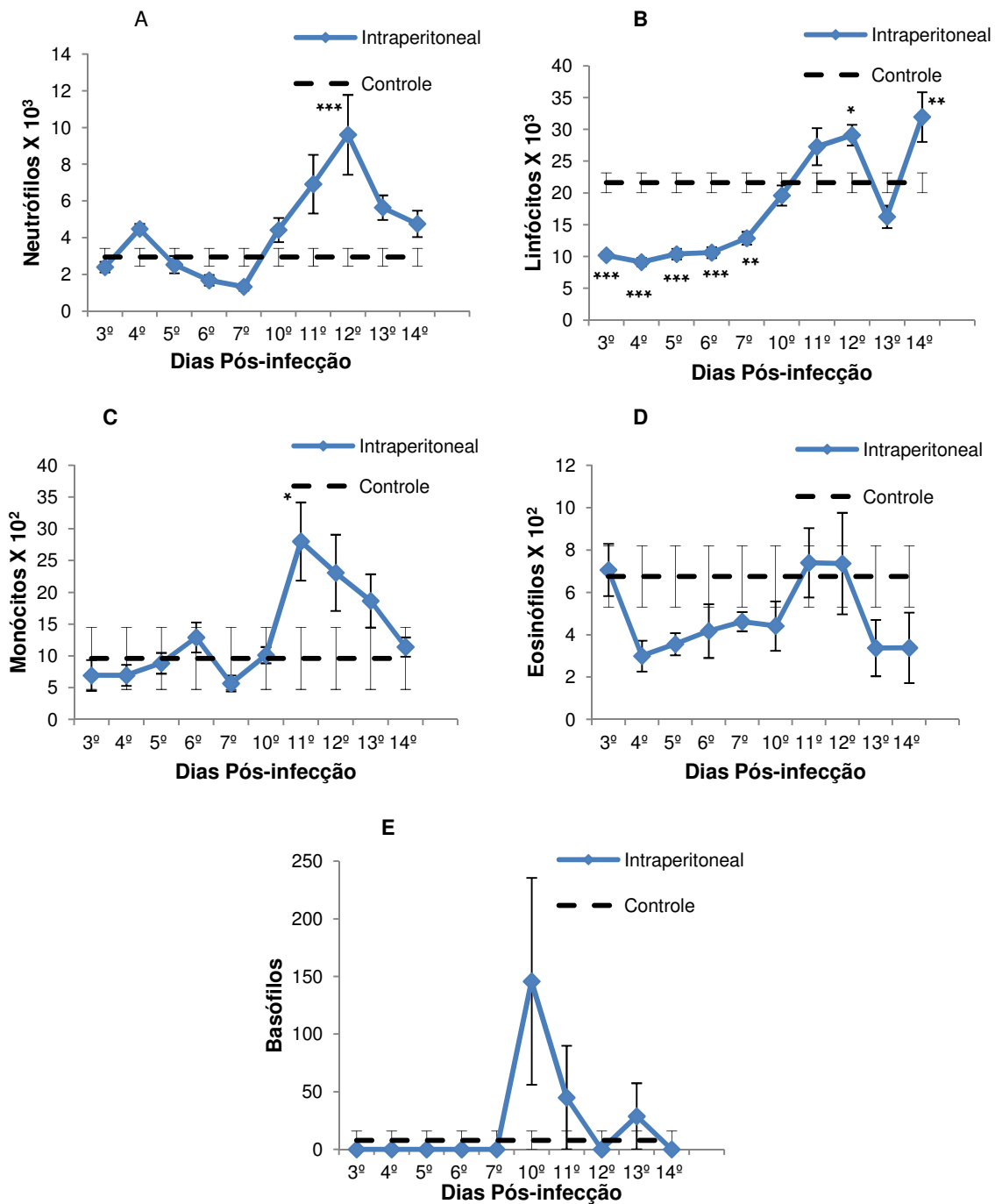


Figura 5.6 – Leucometria diferencial de camundongos infectados por via intraperitoneal (IP) com  $10^7$  formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC 2005; (A) Neutrófilos; (B) Linfócitos; (C) Monócitos; (D) Eosinófilos e (E) Basófilos. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

eosinófilos e basófilos), nenhuma correlação com parasitemia foi observada (Figura 5.7).

A figura 5.8 mostra a cinética da leucometria específica absoluta no sangue dos animais infectados por via IG.

A contagem diferencial de neutrófilos mostrou-se semelhante à obtida no grupo controle no período inicial da infecção. A partir do 14<sup>o</sup> dia um aumento no número destas células foi observado com um pico no 18<sup>o</sup> dia, seguido de queda (Figura 5.8 A).

Linfopenia pode ser observada no período inicial da infecção por esta via e uma inversão deste quadro foi observado a partir do 14<sup>o</sup> dia pós-infecção pelo aumento progressivo do número destas células. Aos 18 dias, uma quantidade três vezes maior que a observada no grupo controle foi observada. Esses níveis celulares se mantiveram elevados até o final do experimento (Figura 5.8 B).

O número de monócitos se manteve abaixo dos valores normais até o 17<sup>o</sup> dia quando atingiram taxas normais, aumentando a seguir no 18<sup>o</sup> dia (Figura 5.8 C).

O número de eosinófilos mostrou-se abaixo dos níveis encontrados nos animais controle, exceto nos 18<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias pós-infecção, quando apresentaram valores semelhantes aos do controle (Figura 5.8 D).

Os níveis de basófilos assemelharam-se ao observado no grupo controle (Figura 5.8 E).

As análises de correlação entre a contagem celular e a parasitemia nos animais infectados pela via IG mostrou-se significativa somente em relação à contagem de monócitos. As demais análises de correlação entre a parasitemia e as contagens de leucócitos totais e diferenciados não foram consideradas significativas. (Figura 5.9).

### **5.5. Índice tímico e esplênico**

O efeito da infecção sobre o peso do baço e do timo foi avaliado nos dias 11 e 18 após a infecção nos animais infectados IP e nos dias 26 e 33 nos infectados IG.

Independente da via de infecção, o índice esplênico mostrou que o peso do



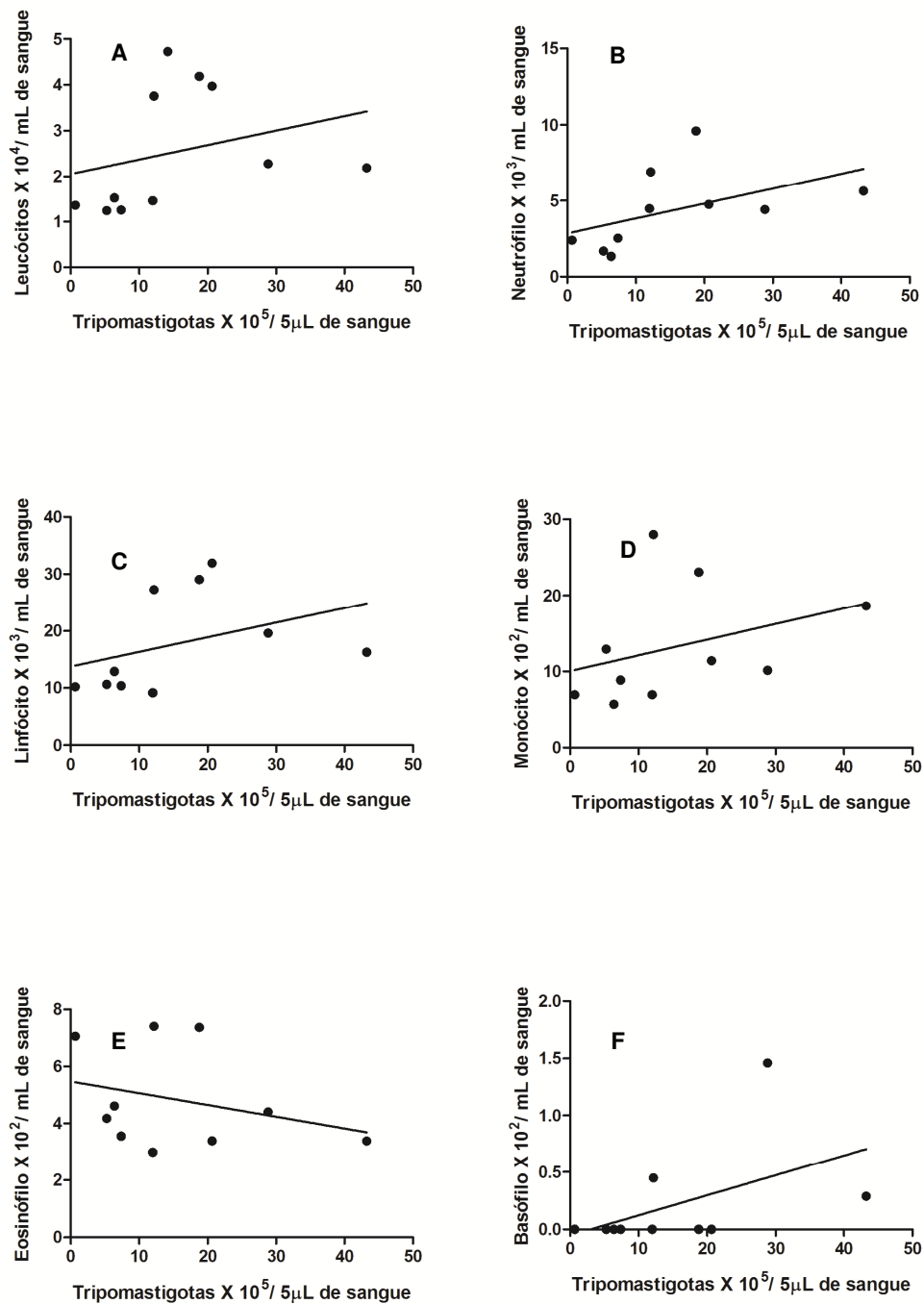


Figura 5.7 - Correlação (teste Spearman) entre a parasitemia e a contagem de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), linfócitos (C), monócitos (D), eosinófilos (E) e basófilos (F) em animais infectados via IP com 10<sup>7</sup> formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005. A correlação foi significativa entre a parasitemia e a contagem de leucócitos ( $p=0,023$ ), neutrófilos ( $p=0,021$ ) e linfócitos ( $p=0,042$ ).

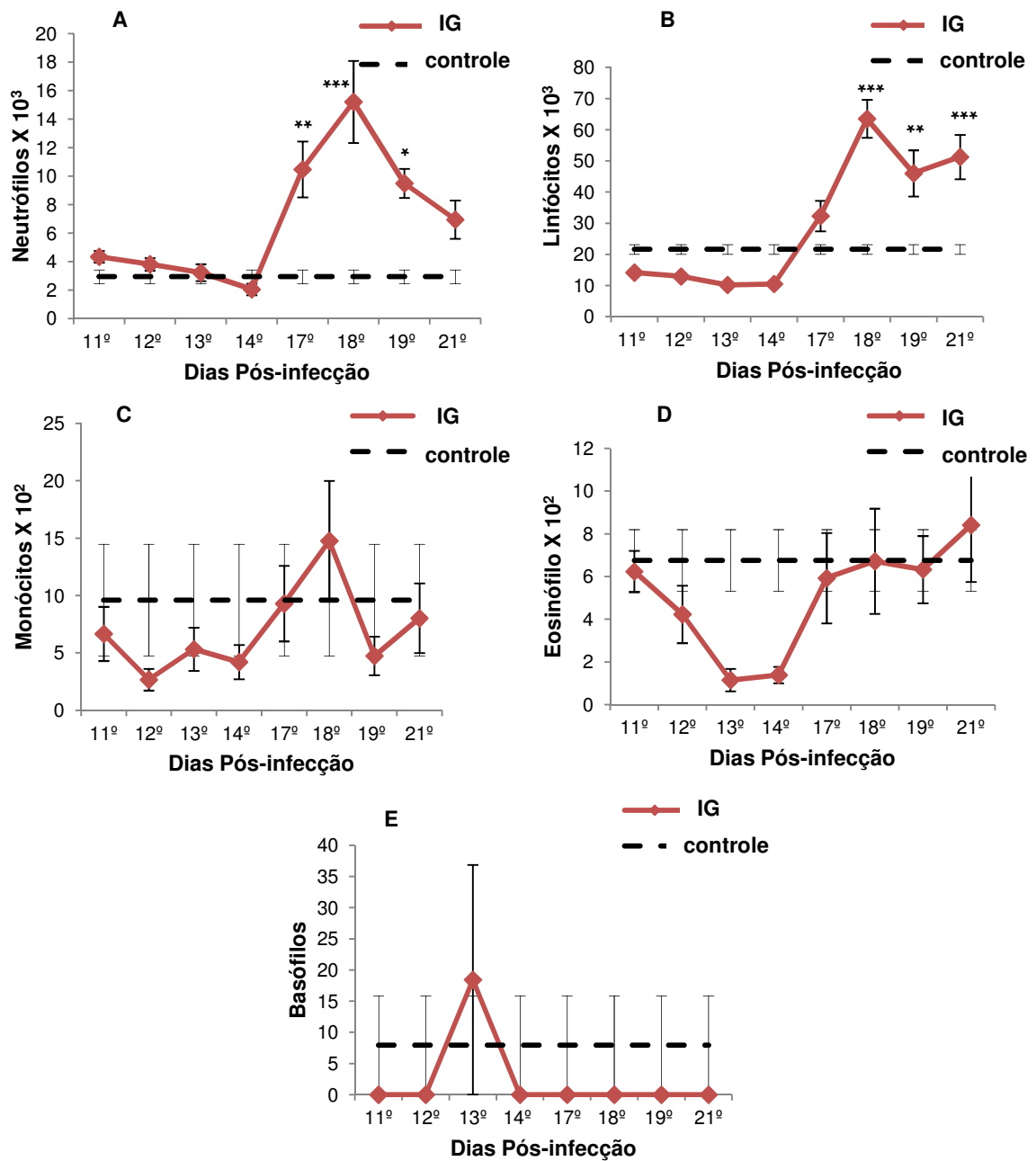


Figura 5.8 – Leucometria diferencial de camundongos infectados por via intragástrica (IG) com 10<sup>7</sup> formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005; Neutrófilos (A); Linfócitos (B); Monócitos (C); Eosinófilos (D) e Basófilos (E). \*p < 0,05 \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001

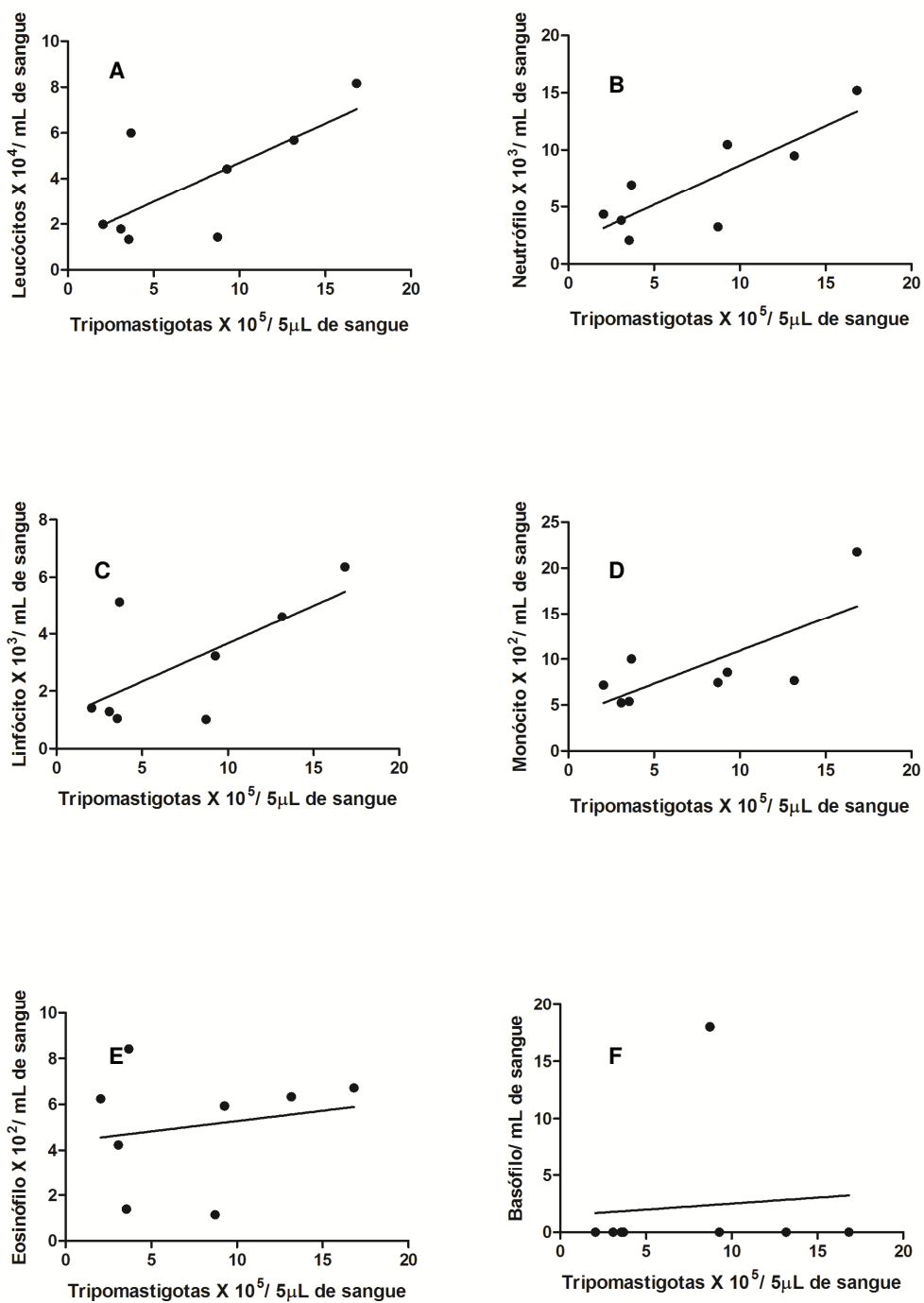


Figura 5.9 - Correlação (teste Spearman) entre a parasitemia e a contagem de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), linfócitos (C), monócitos (D), eosinófilos (E) e basófilos (F) em animais infectados via IG com  $10^7$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005. A correlação foi significativa entre a parasitemia e a contagem de monócitos ( $p= 0,028$ ).

baço aumentou duas vezes quando comparado com o baço dos animais controle (Figure 5.10A). Quando o timo foi avaliado, nossos resultados mostraram que a infecção IP pelo *T. cruzi* induziu uma redução discreta deste órgão. Esta aparente atrofia não foi observada nos animais infectados pela a via IG. Ao contrário, um pequeno aumento do timo foi observado, independente do tempo de infecção (Figura 5.10B).

## **5.6. Histopatologia**

### **5.6.1. Análise histológica dos órgãos dos animais controle não infectados**

A avaliação histológica dos órgãos dos animais do grupo controle, não infectados, mostrou o aspecto normal dos tecidos e foi utilizado neste projeto para avaliação das alterações observadas nos órgãos dos animais infectados por comparação (Figura 5.58).

### **5.6.2. Análise histopatológica dos órgãos dos animais infectados pela via intraperitoneal (IP) com formas tripomastigotas de *T.cruzi* provenientes de cultura de células**

As análises histopatológicas dos tecidos dos camundongos infectados pela via IP foram realizadas no 11<sup>º</sup> e no 18<sup>º</sup> dias após a infecção. Apenas os órgãos com alterações histológicas significativas foram apresentados.

A coloração de Weigert foi utilizada para a avaliação das fibras elásticas, e não foram observadas alterações significativas nos órgãos examinados nos diferentes pontos por esta via de infecção.

#### **5.6.2.1 - 11<sup>º</sup> dia de infecção**

Pequenos focos de infiltrados inflamatórios de células mononucleares foram observados entre as fibras musculares do esôfago com a presença de ninhos de parasitos (Figura 5.11A e 5.11B). A avaliação pelo Picrosirius Red não mostrou nenhuma alteração nas fibras colágenas deste órgão.

O estômago apresentou infiltrado no córion, com discreto aumento no número de células inflamatórias, associado à presença de células imaturas, essencialmente linfócitos. Observou-se ainda a presença de parasitos associados a

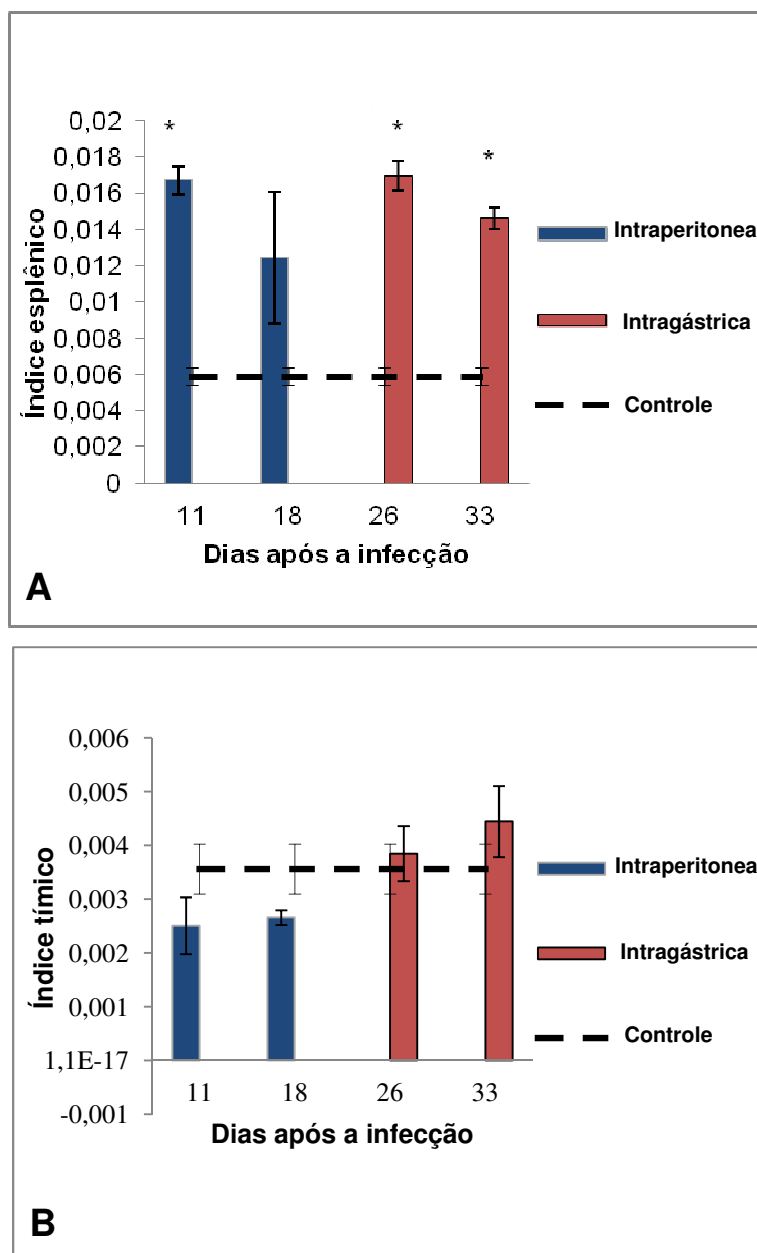


Figura 5.10 - Índice esplênico (A) e tímico (B) dos animais infectados com  $10^7$  formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005. O valor dos camundongos controle normais é expresso pela média de todas as contagens.

um infiltrado inflamatório linfomonocitário, o qual estava distribuído ao longo da camada muscular deste órgão. Este infiltrado mostrou-se maior do que o observado na camada muscular do esôfago (Figura 5.11C). Notou-se ainda a presença de “milky spot” ativado, com células mielóides, próximo ao órgão (Figura 5.11D). A análise pelo PSR mostrou alteração na quantidade e na distribuição das fibras colágenas. Com a luz polarizada pode-se observar as fibras de espessura finas marcadas em verde e as espessas marcadas em amarelo no córion (Figura 5.12A e 5.12B) e na camada muscular (Figura 5.12C e 5.12D), sugerindo aparente fibrogênese e redistribuição do colágeno.

Intenso infiltrado linfomonocitário, com a presença de plasmócitos, foi observado no tecido adiposo próximo ao intestino (Figura 5.13A). Nesta região ressalta-se a ocorrência de venulite composta por linfócitos, monócitos e plasmócitos (Figura 5.13B). No duodeno foi observada a presença de parasitos associados ao infiltrado inflamatório (Figura 5.13C).

O coração apresentou inúmeros ninhos de parasitos, associados a um infiltrado inflamatório de média intensidade, composto de linfócitos e monócitos (Figura 5.14A e 5.14B). A biogênese do colágeno, assim como a redistribuição de suas fibras estava associada à presença do infiltrado inflamatório (Figura 5.14C e 5.14D). No pulmão notou-se um espessamento dos septos e edema (Figura 5.14E).

O exame do fígado mostrou infiltrado inflamatório heterogêneo e focal além de adensamentos linfóides (Figura 5.15A e 5.15B). Observou-se também a presença de células imaturas e megacariócitos circulantes (Figura 5.15C e 5.15D). Somado a isso, a ocorrência de extravasamento de células inflamatórias através da veia porta, causando uma redistribuição das fibras espessas, marcadas em amarelo foi registrado (Figura 5.15E e 5.15F).

Evidenciou-se acentuada pancreatite edematosa associada ou não a focos de necrose (Figura 5.16A e 5.16B) e presença de parasitos (Figura 5.16C), além de redistribuição das fibras colágenas sustentando as células inflamatórias e edema no tecido conjuntivo interacinar (Figura 5.17A e 5.17B). Além disto, viu-se no tecido conjuntivo justapancreático neoformação e redistribuição das fibras colágenas espessas (marcadas em amarelo) e finas (marcadas em verde), à visualização pela polarização (Figura 5.17C e 5.17D).

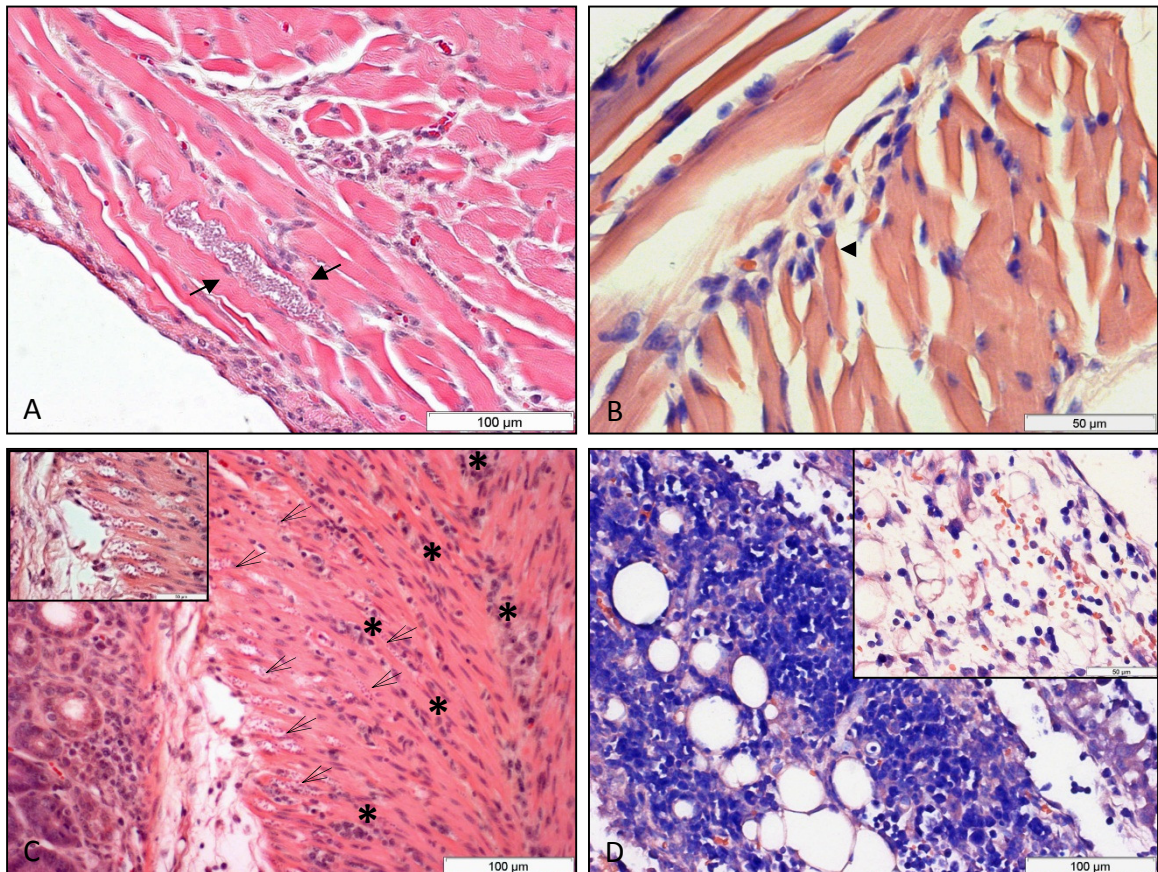


Figura 5.11 - Histopatologia do esôfago, estômago e “milky spot” de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A” esôfago com ninhos de parasitos entre as fibras da camada muscular (setas) (HE) e em “B” pequenos focos de infiltrado inflamatório composto por células mononucleares (cabeça de seta) (HE); em “C” presença de numerosos parasitos (setas) associados ao infiltrado inflamatório linfomonocitário (asteriscos) distribuído ao longo da camada muscular do estômago (HE); em “D” presença de “milky spot” ativado, com células mielóides, próximo ao estômago (Giemsa).



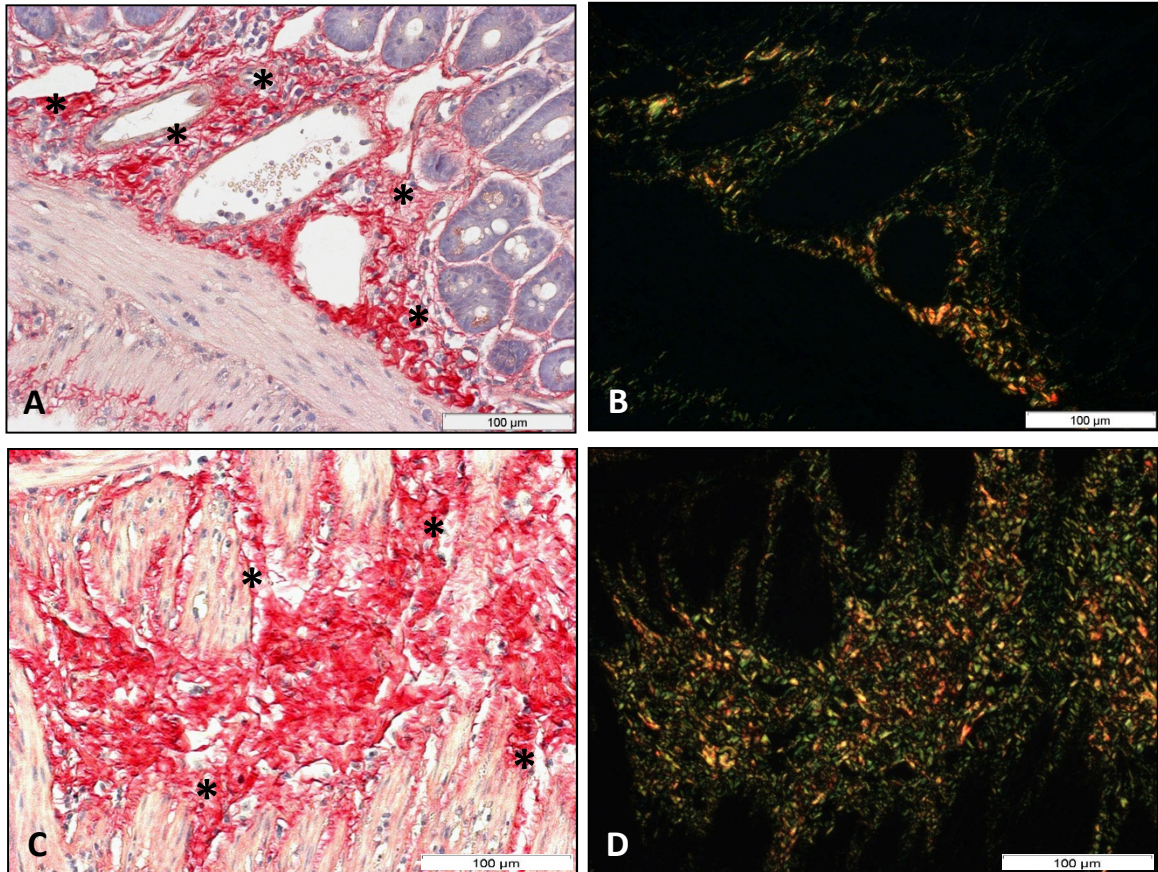


Figura 5.12 - Histopatologia do estômago de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Alteração na quantidade e na distribuição das fibras colágenas, mostrando aparente fibrogênese no córion (asteriscos) em “A” e na camada muscular em “C”, sem polarização; em “B”, com luz polarizada, fibras de espessura fina marcadas em verde, no córion e em “D”, com luz polarizada, colágeno espesso em amarelo; Picrosirius red.



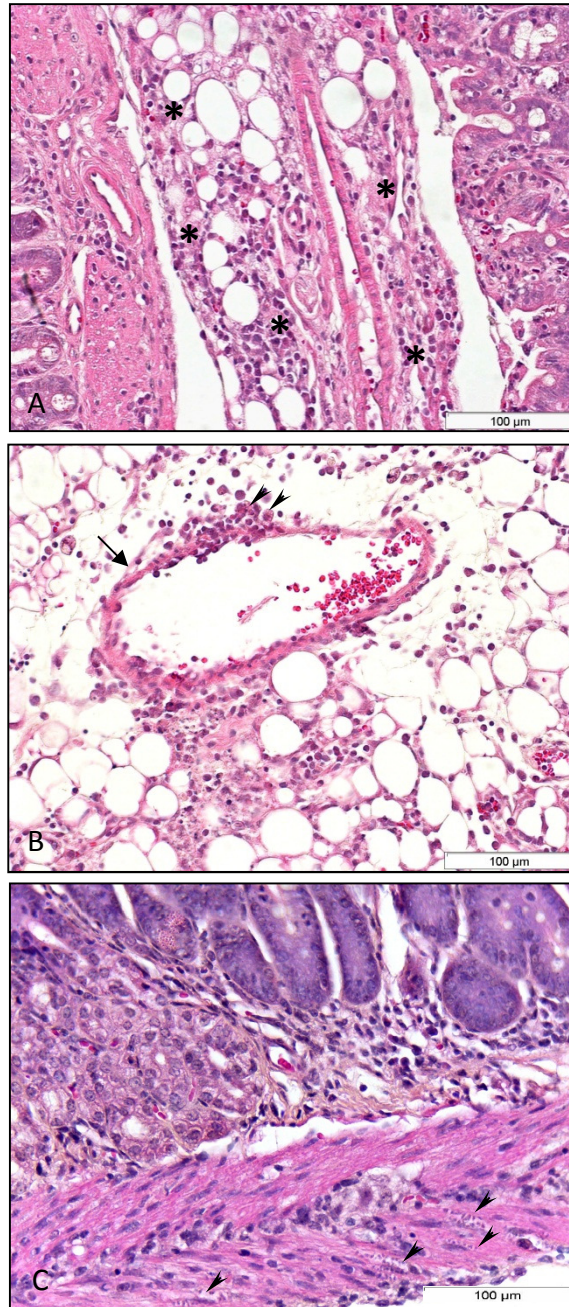


Figura 5.13 - Histopatologia do intestino e do adiposo próximo a este de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A” tecido adiposo próximo ao intestino com intenso infiltrado (asteriscos) linfomonocitário e plasmócitos e venulite (seta) composta por linfócitos, monócitos e plasmócitos (cabeça de seta) em “B”; em “C” duodeno com ninhos de parasitos (cabeça de seta) associados ao infiltrado inflamatório; HE.

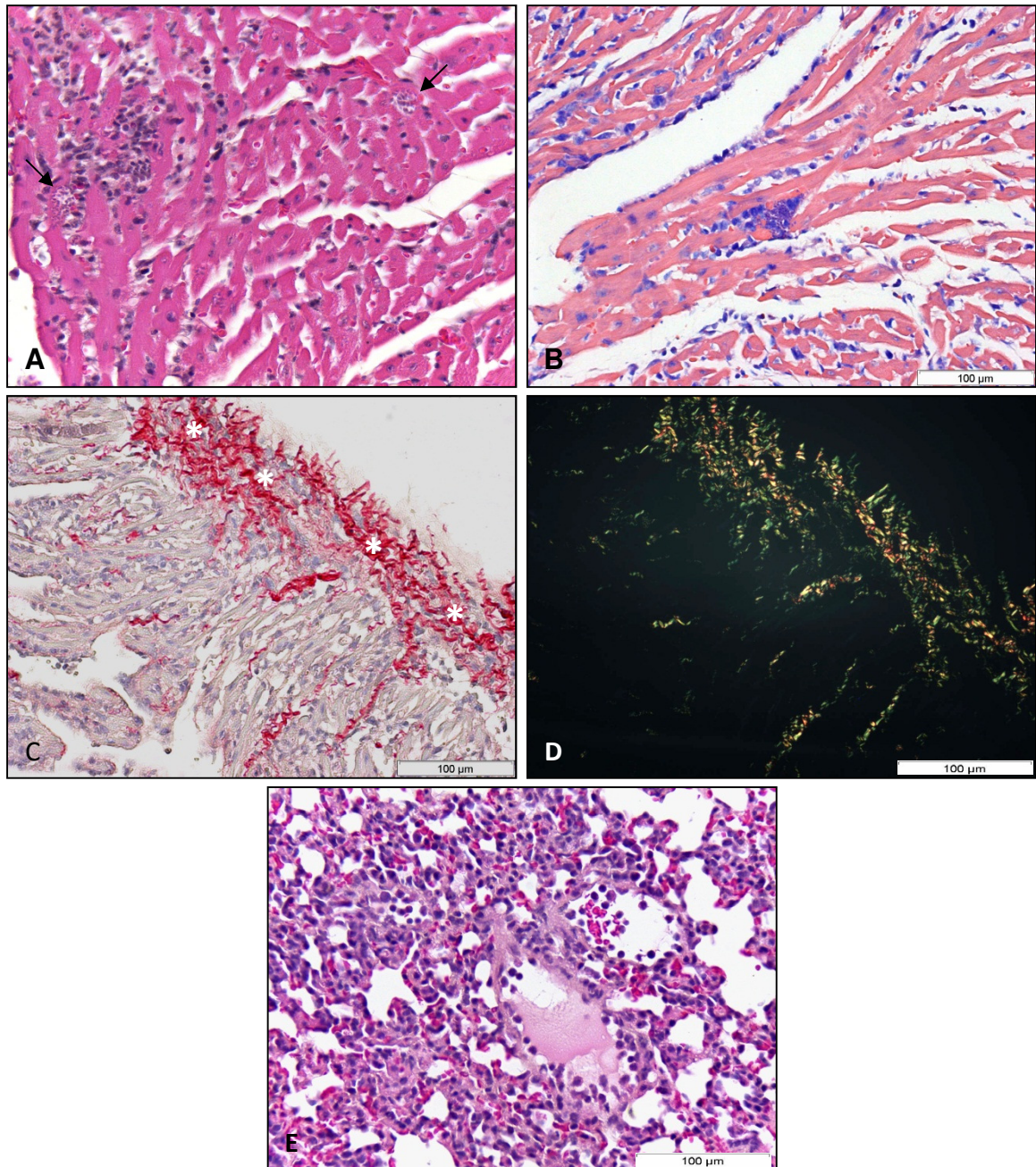


Figura 5.14 - Histopatologia do coração e pulmão de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A” coração com ninhos de parasitos (setas), associados a infiltrado inflamatório de média intensidade (HE) e em “B” infiltrado composto de linfócitos e monócitos (Giemsa); em “C” sem polarização (asteriscos), e “D” com polarização, biogênese do colágeno e redistribuição das fibras associadas à presença do infiltrado inflamatório (marcadas em verde) (Picrosirius red). “E” mostra septos com espessamento e edema no pulmão (HE).



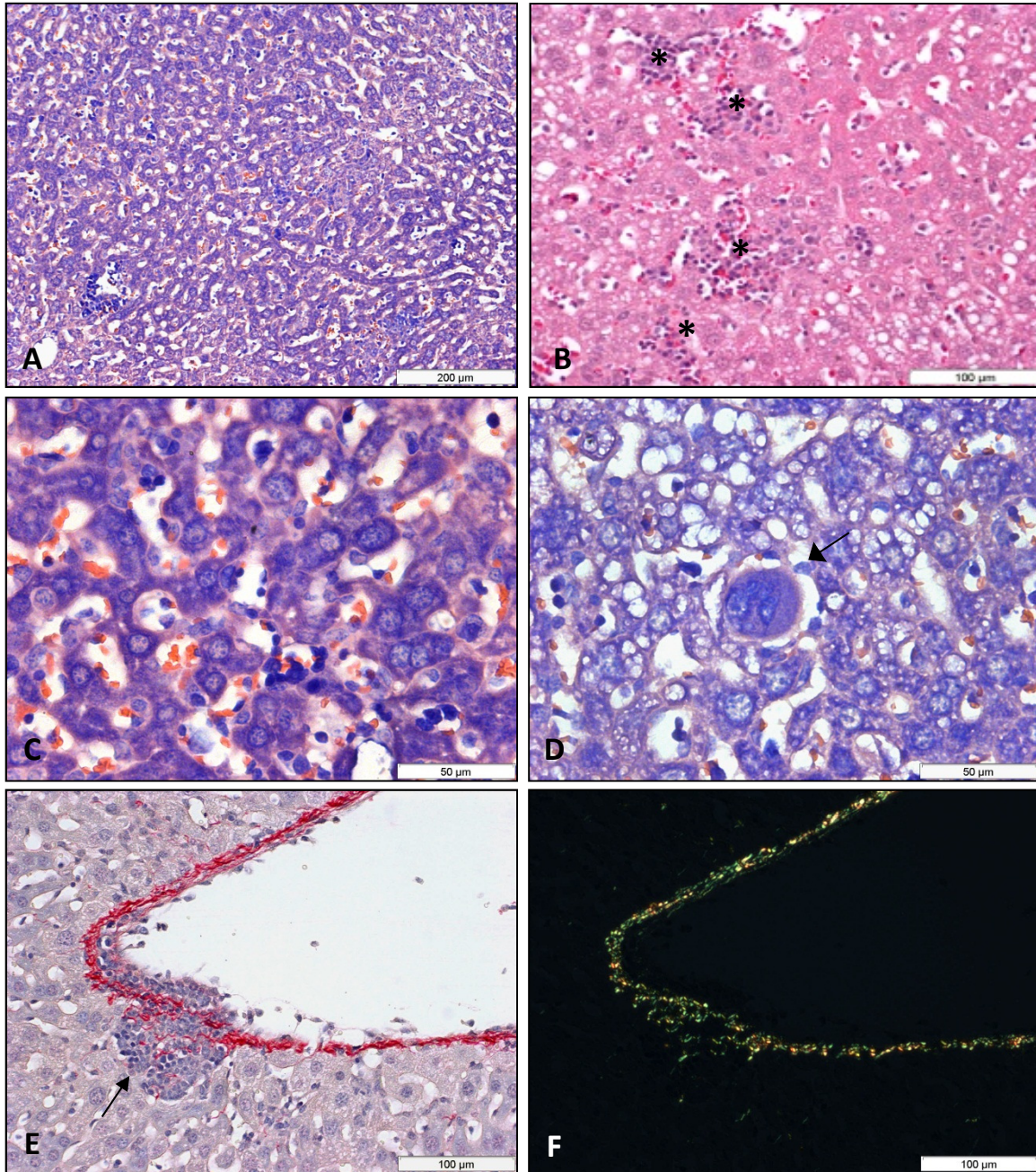


Figura 5.15 - Histopatologia do fígado de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A” fígado com infiltrado inflamatório heterogêneo e focal (Giemsa) e adensamento linfóide (asteriscos) em “B” (HE); em “C” presença de células imaturas e em “D” megacariócito (seta) (Giemsa); “E” sem polarização, mostrando presença de infiltrado inflamatório próximo a veia porta (seta) e em “F”, com polarização, redistribuição das fibras colágenas finas (marcadas em verde) (Picrosirius red).



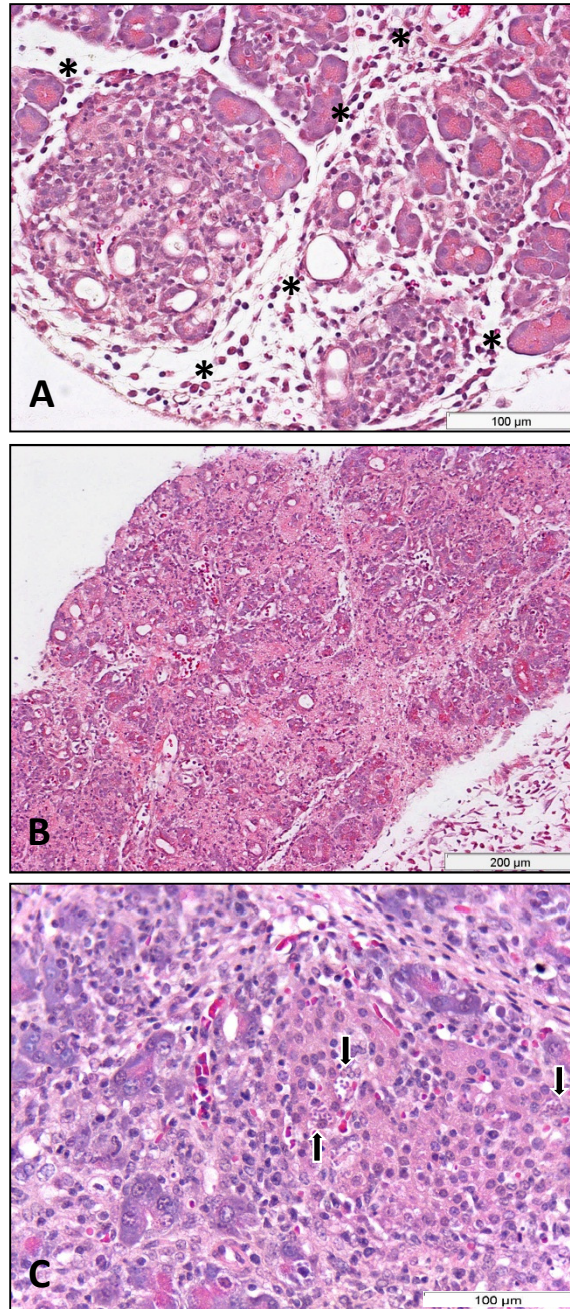


Figura 5.16 - Histopatologia do pâncreas de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. A figura “A” mostra acentuada pancreatite edematosa (asteriscos) associada ou não a focos de necrose observados na figura “B” e presença de parasitos na Ilhota de Langerhans (setas), na figura “C”; HE.

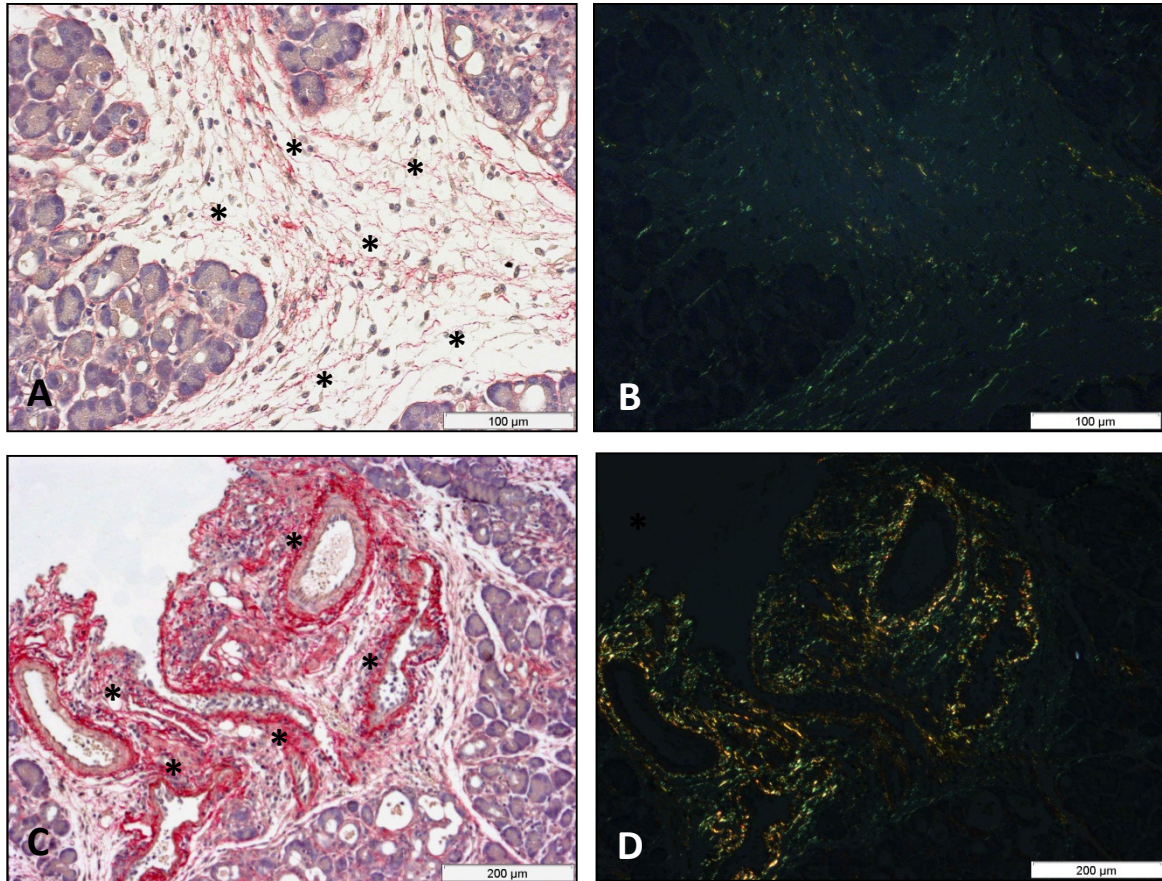


Figura 5.17 - Histopatologia do pâncreas de animais infectados intraperitonealmente (IP) com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A”, sem polarização, edema no tecido conjuntivo interacinar pancreático (asteriscos) e em “B”, com polarização, redistribuição das fibras colágenas finas (marcadas em verde) sustentando as células inflamatórias (PSR). Em “C”, sem polarização, tecido conjuntivo justapancreático (asteriscos) neoformação e redistribuição das fibras colágenas espessas (marcadas em amarelo) e finas (marcadas em verde), com polarização em “D”. (Picrosirius red).

A glândula adrenal desses animais apresentou-se congesta e com infiltração gordurosa na região medular (Figura 5.18A). Na região cortical e no tecido adiposo próximo a este órgão observou-se infiltrado inflamatório linfomonocitário (Figura 5.18B).

A análise dos linfonodos mesentéricos e inguinais demonstrou hiperplasia dos centros germinativos com a presença de corpos apoptóticos, assim como dilatação dos seios e cordões medulares, sugerindo uma possível migração celular (Figura 5.19A, 5.19B e 5.19C). No baço a presença de centros germinativos ativados na polpa branca sem redução da polpa vermelha foi evidenciada (Figura 5.19D).

O rim destes animais mostrou congestão (Figura 5.20A) e o tecido adiposo próximo a este órgão infiltrado inflamatório linfocitário com a presença de macrófagos, associado a parasitos dispersos (Figura 5.20B).

Parasitos e infiltrados mononucleares também estavam presentes na bexiga (Figura 5.21A) associados às alterações das fibras espessas do complexo colágeno na camada muscular deste órgão sugerindo redistribuição das mesmas (Figura 5.21B e 5.21C).

Igualmente notaram-se focos de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo entre as fibras musculares do útero (Figura 5.22A), que levou a uma redistribuição das fibras finas do sistema colágeno (Figura 5.22B e 5.22C). Além da presença de células imaturas no infiltrado inflamatório do tecido adiposo próximo a este órgão.

O timo dos animais não apresentou alterações.

#### **5.6.2.2 - 18º dia de infecção**

O esôfago dos animais mostrou discretos focos de infiltrados inflamatórios na mucosa e entre as fibras musculares com aparente redistribuição das fibras colágenas espessas, evidenciadas em amarelo alaranjado pela polarização (Figura 5.23A e 5.23B). Ao contrário do observado aos 11 dias, não se observou a presença de parasitos neste órgão.



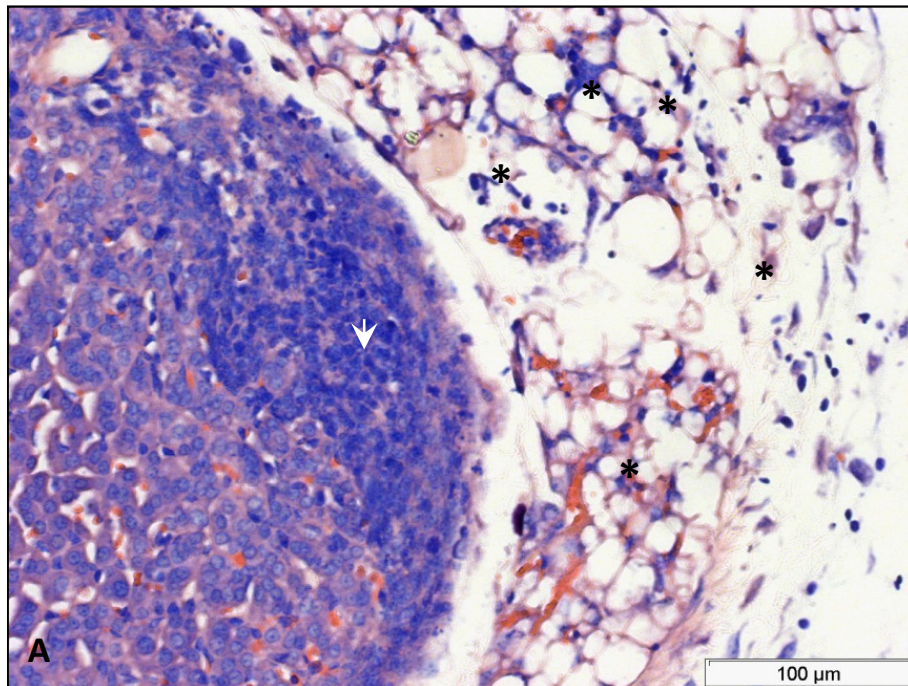


Figura 5.18 - Histopatologia da adrenal de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de cultura, 11 dias após a infecção. Em “A” região cortical (cabeça de seta) e tecido adiposo próximo (asteriscos) com infiltrado inflamatório linfomonocitário (Giemsa).

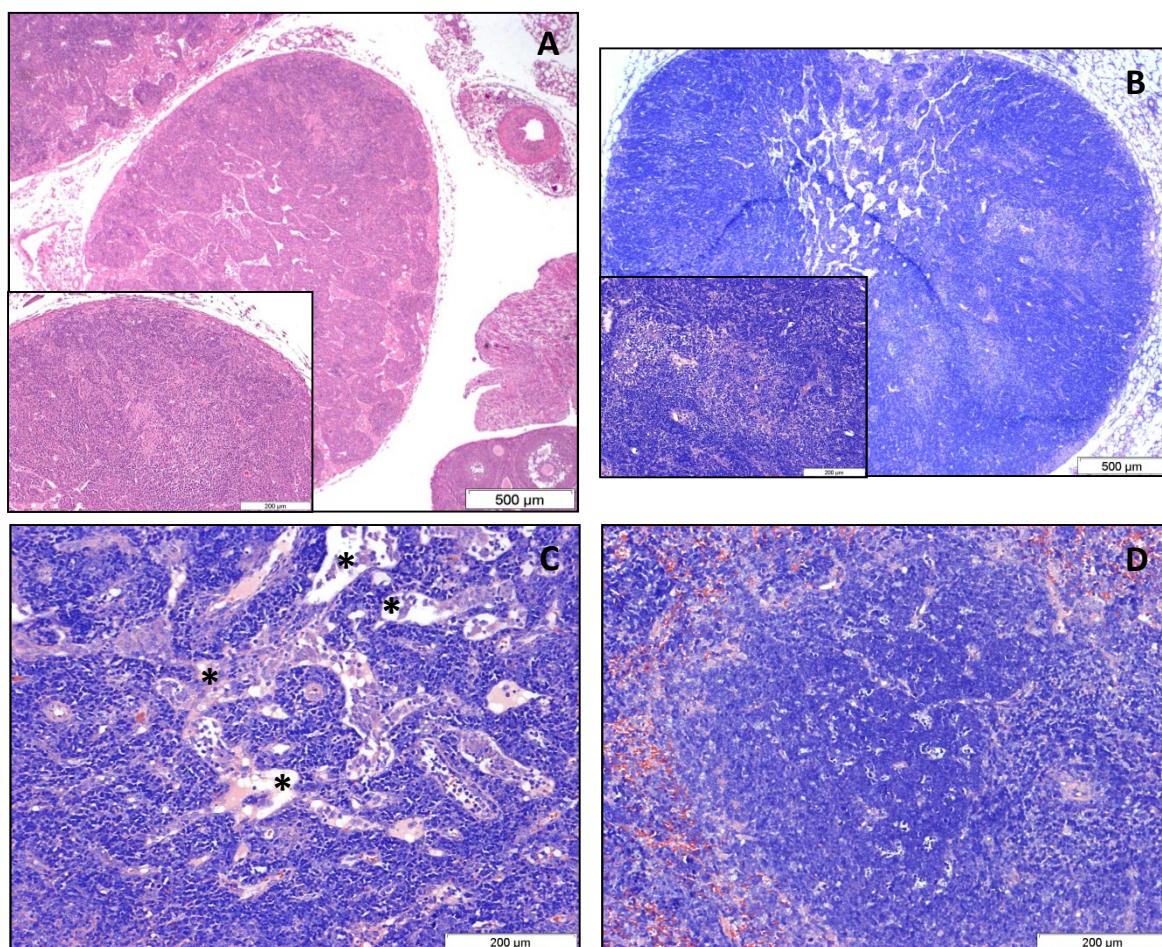


Figura 5.19 - Histopatologia do linfonodo e baço de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A” (HE) e “B” (Giemsa) linfonodos mesentérico e inguinal com hiperplasia dos centros germinativos com a presença de corpos apoptóticos e em “C” dilatação dos seios e cordões medulares (asteriscos) (Giemsa). Em “D” baço com centros germinativos ativados na polpa branca sem redução da polpa vermelha (Giemsa).



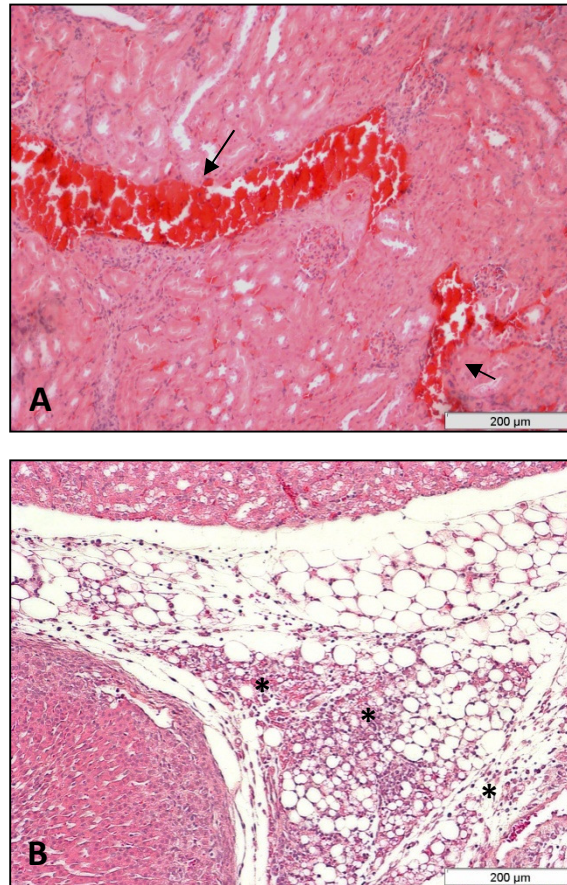


Figura 5.20 - Histopatologia do rim e tecido adiposo próximo a este órgão de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A” rim apresentando congestão (setas) e em “B”, no tecido adiposo próximo ao rim, infiltrado inflamatório linfocitário e macrófagos dispersos (HE ).

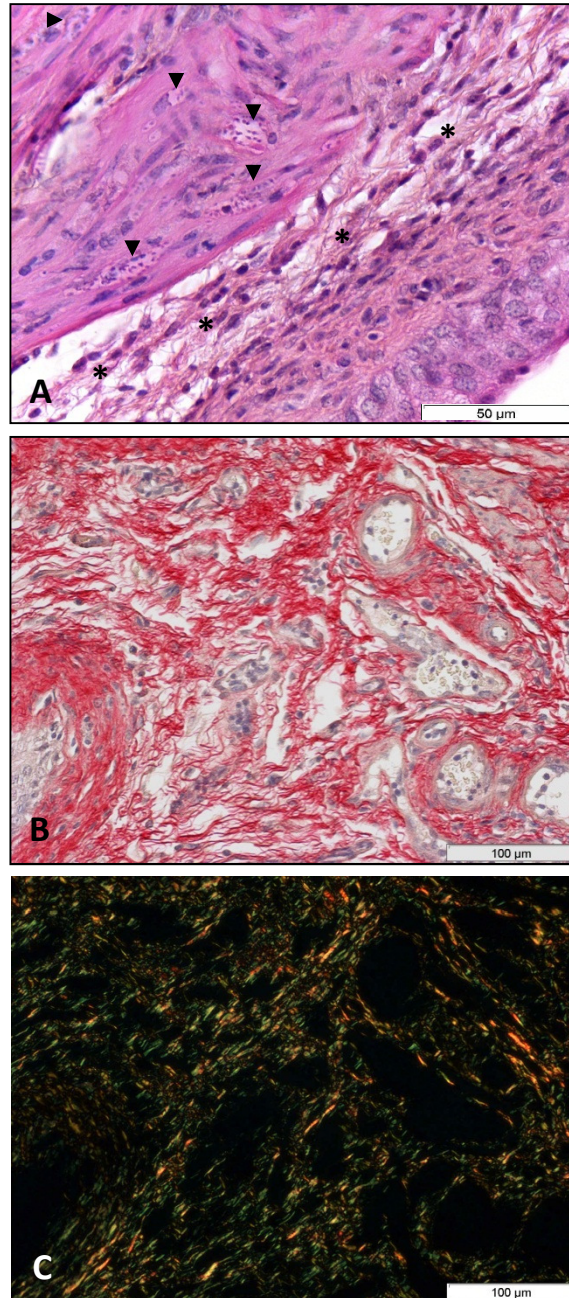


Figura 5.21 - Histopatologia da bexiga de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A”, bexiga com parasitos (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório mononuclear (asterisco) (HE); em “B”, sem polarização, e “C”, com polarização, na camada muscular deste órgão alterações das fibras do complexo colágeno, marcadas em verde, associadas ao infiltrado inflamatório (Picrosirius red).

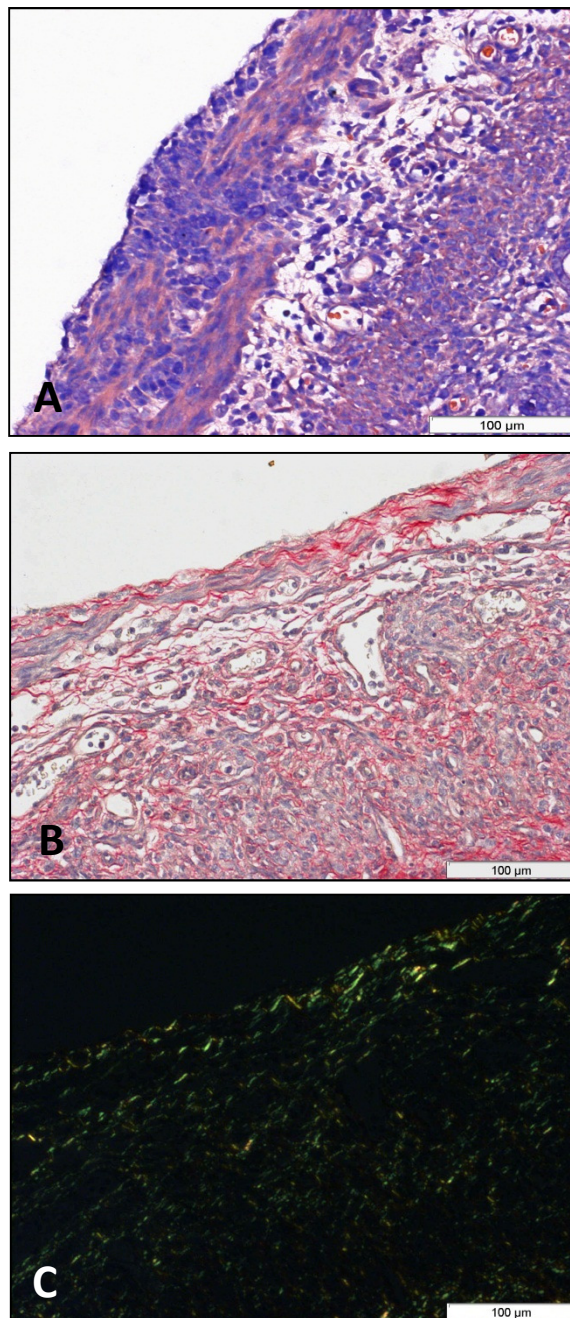


Figura 5.22 - Histopatologia do útero de animais infectados intraperitonealmente formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 11 dias após a infecção. Em “A”, focos de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo entre as fibras musculares do útero (Giemsa); em “B”, sem polarização, e em “C”, com polarização, redistribuição das fibras finas do sistema colágeno (marcadas em verde) (Picrosirius red).



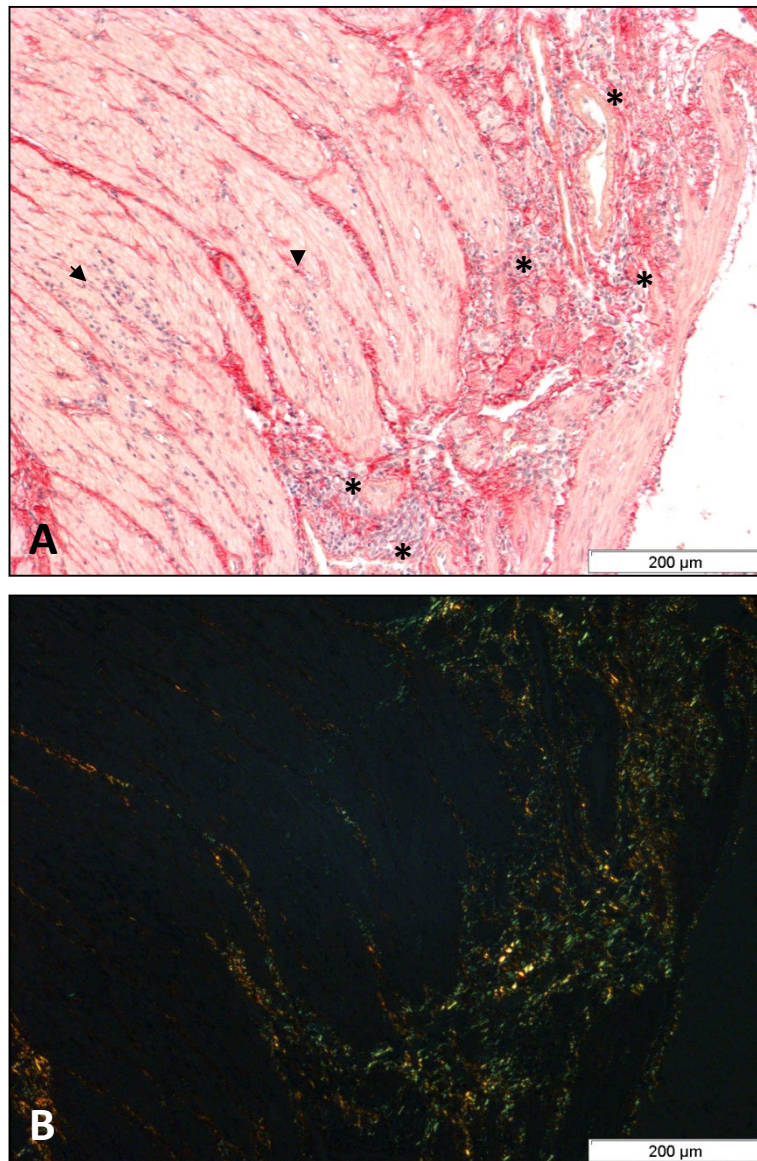


Figura 5.23 – Histopatologia do esôfago de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção. Em “A”, sem polarização, discretos focos de infiltrado inflamatório entre as fibras musculares do esôfago (asteriscos) e em “B”, com polarização, aparente redistribuição das fibras (marcadas em verde) e formação das fibras colágenas espessas (marcadas em amarelo alaranjado) (Picrosirius red).

O estômago apresentou grandes áreas de infiltrado focal na região da submucosa e em toda a extensão da camada muscular com a presença de mastócitos degranulados e ninhos de parasitos (Figura 5.24A e 5.24B) com aparente alteração das fibras do sistema colágeno indicando redistribuição e formação de novas fibras (Figura 5.24C e 5.24D).

No intestino, placas de Peyer com formação de centros germinativos foram evidenciadas (Figura 5.25A e 5.25B), além de infiltrado inflamatório no tecido adiposo próximo ao intestino e no omento, onde células imaturas puderam ser observadas, sugerindo hematopoiese.

O coração mostrou intenso infiltrado inflamatório difuso com predileção atrial, composto predominantemente por linfócitos e monócitos, poucos eosinófilos e mastócitos íntegros e degranulados, além da destruição de fibras e múltiplos ninhos parasitários (Figura 5.26A e 5.26B). Produção e redistribuição das fibras colágenas associados ao infiltrado também foram vistas neste órgão (Figura 5.26C e 5.26D). Infiltrado inflamatório mononuclear estava evidente na mucosa da traquéia, além de ninhos parasitários na camada muscular adjacente a este órgão (Figura 5.27).

No pulmão destes animais não foram evidenciadas alterações significativas.

O fígado mostrou pequenos focos hemorrágicos com discreta esteatose, infiltrado inflamatório focal, menor que os observados aos 11 dias após a infecção (Figura 5.28A). No infiltrado observou-se a presença eventual de megacariócitos (Figura 5.28B) e células imaturas. Além disso, um infiltrado periductal no espaço porta com a presença de células mitóticas indicando hematopoiese extramedular foi registrado (Figura 5.28C).

O pâncreas apresentou pancreatite moderada (Figura 5.29A) com infiltrado inflamatório linfocitário (Figura 5.29B). O tecido adiposo próximo a este órgão mostrou intenso infiltrado inflamatório, predominantemente linfocitário (Figura 5.29C), sem a evidência de parasitos.

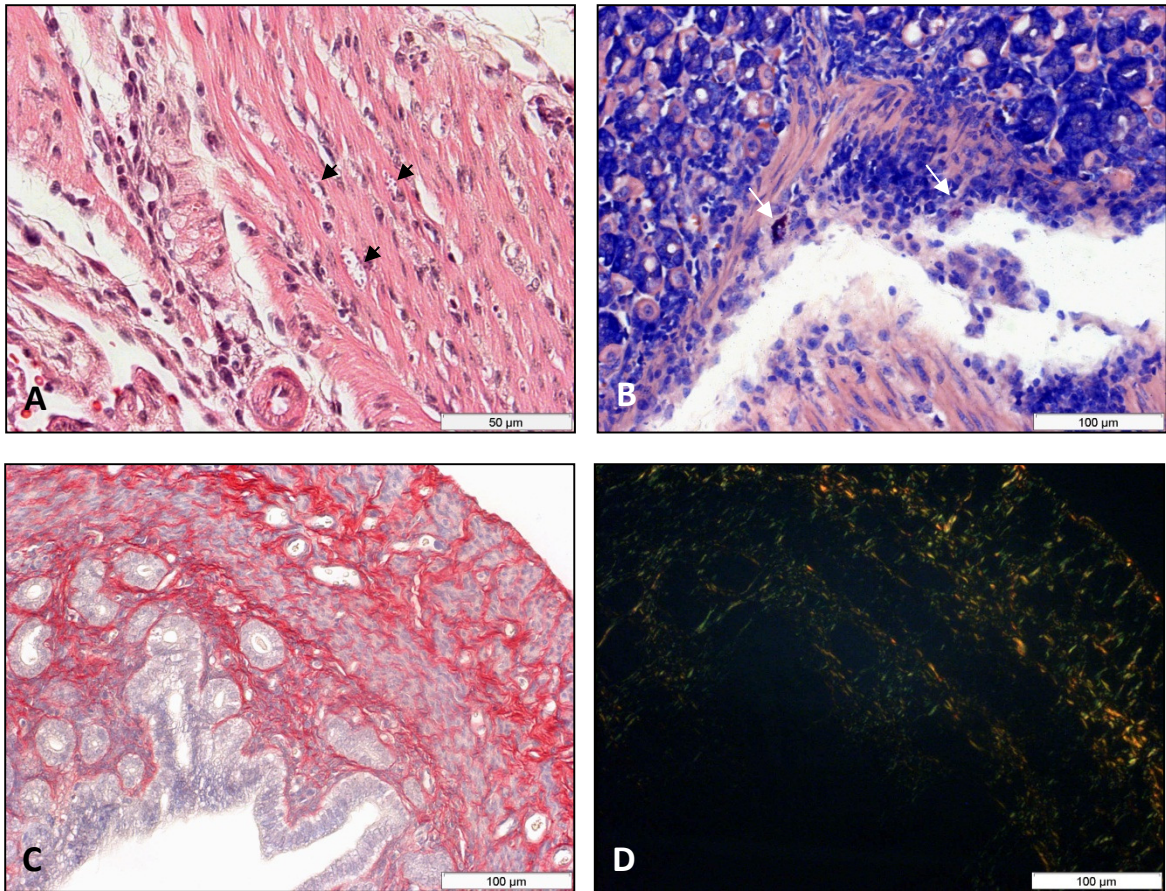


Figura 5.24 – Histopatologia do estômago de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção. Em “A” estômago com grandes áreas de infiltrado focal na região da submucosa e em toda a extensão da camada muscular com ninhos de parasitos (cabeça de seta) (HE) e mastócitos degranulados (seta) em “B” (Giemsa); em “C”, sem polarização, e “D”, com polarização, aparente alteração das fibras finas (marcado em verde) indicando redistribuição e formação de novas fibras espessas (marcadas em amarelo) (Picrosirius red).



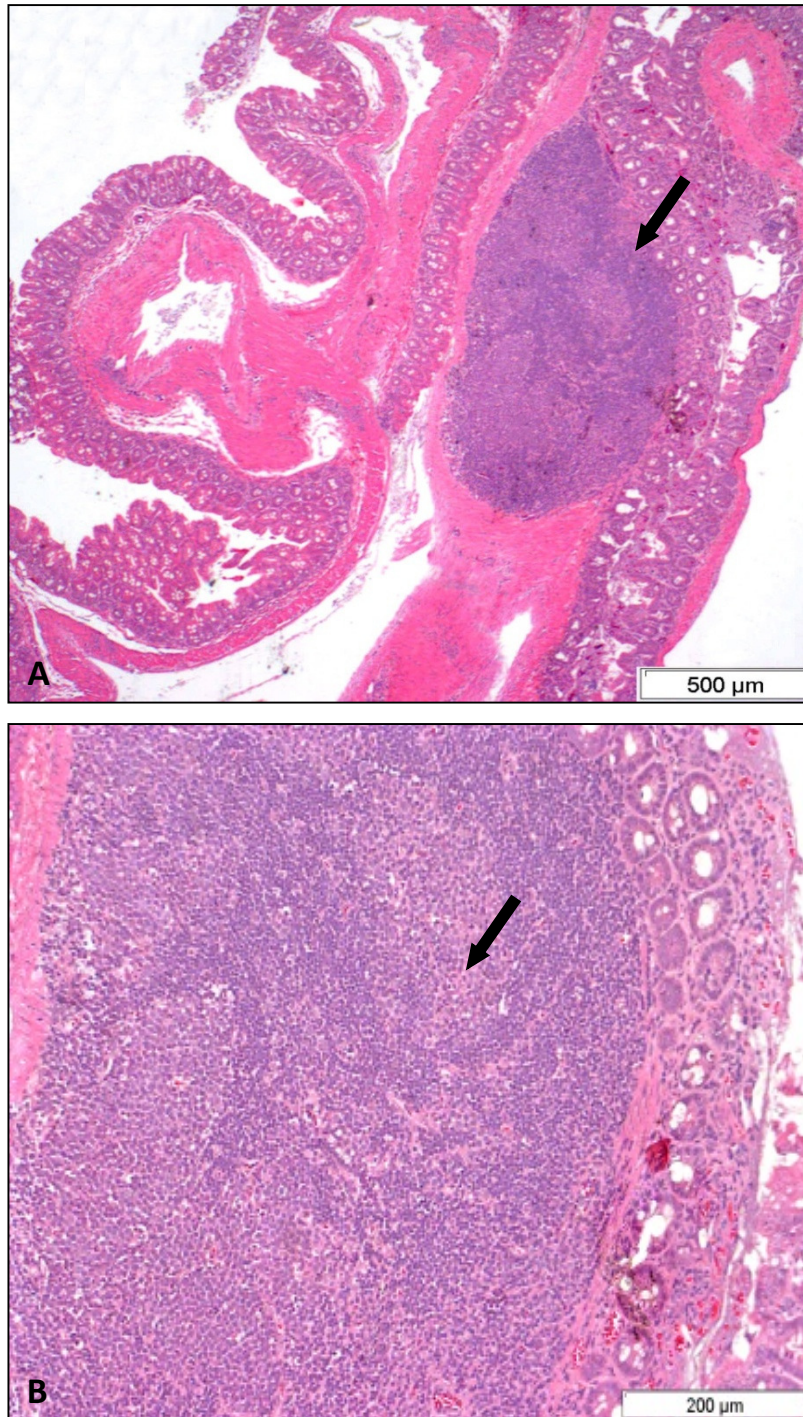


Figura 5.25 – Histopatologia da placa de Peyer dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção. Em “A” placa de Peyer (seta), no intestino e em “B”, maior aumento, mostrando formação de centros germinativos (HE).

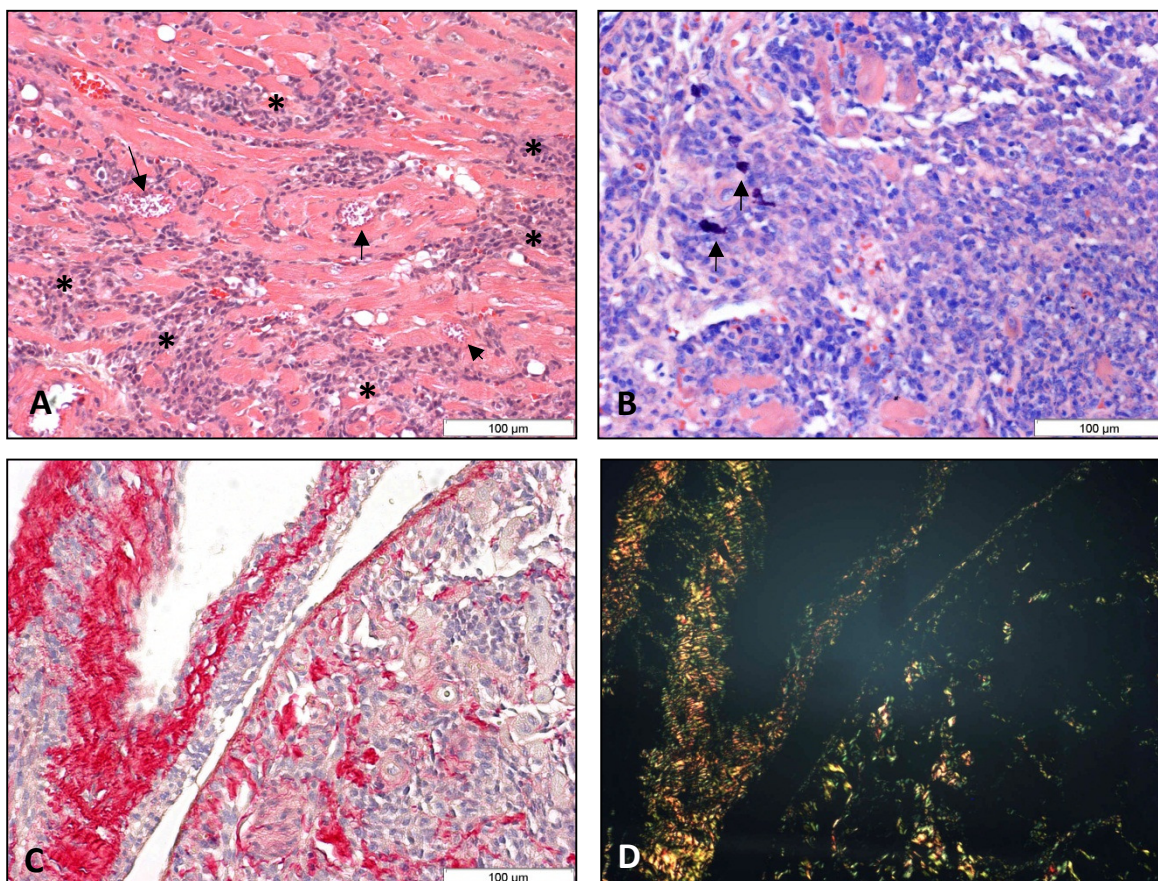


Figura 5.26 – Histopatologia do coração dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção. Em “A” coração com infiltrado inflamatório difuso na região atrial (asteriscos) com múltiplos ninhos parasitários (setas) e destruição das fibras musculares (HE); em “B” infiltrado inflamatório composto por linfócitos, macrófagos, poucos eosinófilos e mastócitos íntegros e degranulados (setas) (Giemsa). Em “C”, sem polarização, e em “D”, com polarização, produção e redistribuição das fibras espessas neoformadas (marcada em amarelo) e fibras finas (marcadas em verde) associadas ao infiltrado inflamatório (Giemsa).



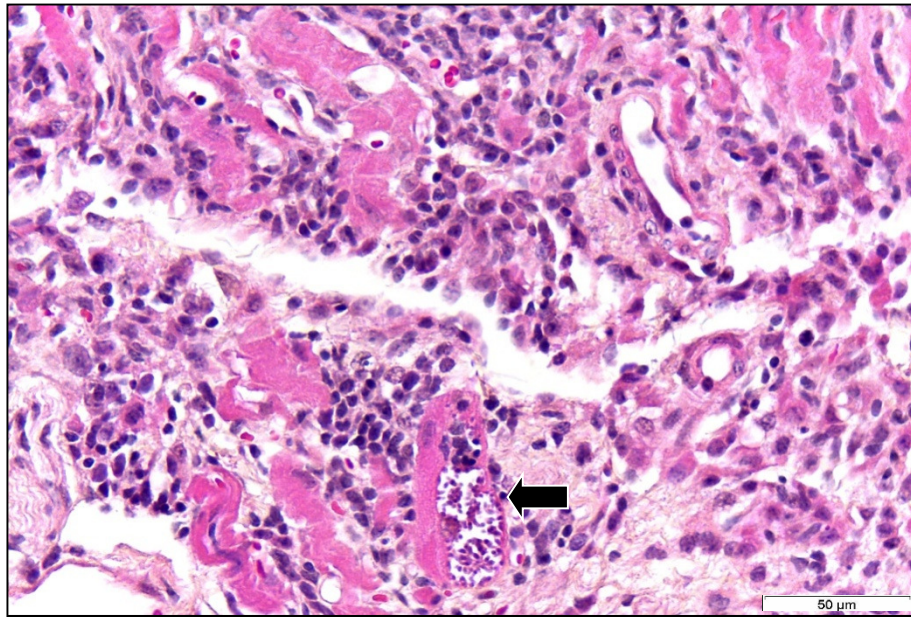


Figura 5.27 – Histopatologia do músculo adjacente à traqueia dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção. Ninhos de parasitos na camada muscular adjacente à traquéia (seta) (HE).

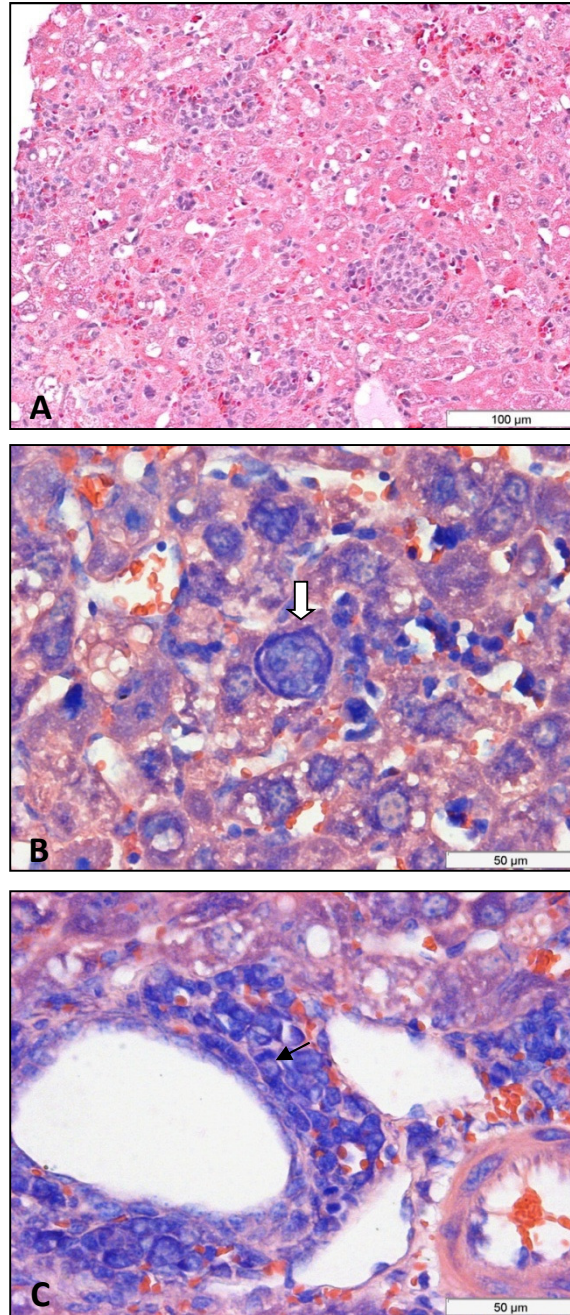


Figura 5.28 – Histopatologia do fígado dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção. Em “A” fígado com pequenos focos hemorrágicos, discreta esteatose e infiltrado inflamatório focal (HE); em “B” megacariócito (seta) e células imaturas e em “C” infiltrado periductal no espaço porta com células mitóticas (seta) (Giemsa).

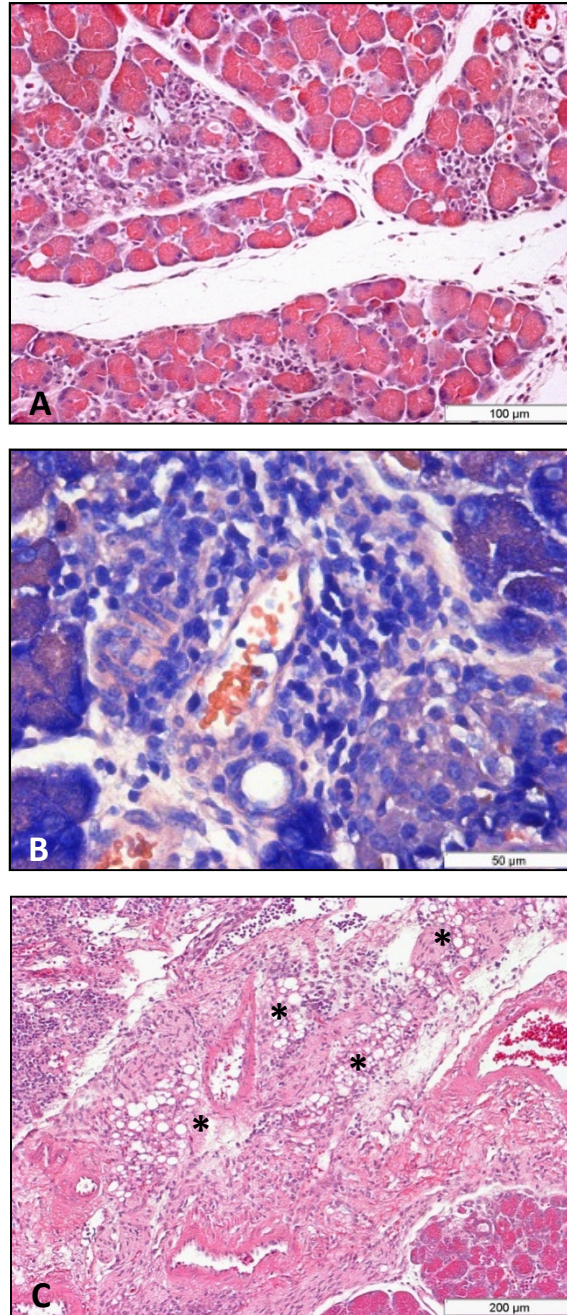


Figura 5.29 – Histopatologia do pâncreas e tecido adiposo próximo ao pâncreas dos animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção. Em “A” pancreatite moderada (HE); em “B” infiltrado inflamatório linfocitário no pâncreas (Giemsa) e em “C” tecido adiposo próximo ao pâncreas (asteriscos) com infiltrado intenso e predominantemente linfocitário (HE).



Os linfonodos próximos ao pâncreas, os mesentéricos e os inguinais apresentaram o mesmo perfil histopatológico dos analisados no 11º dia de infecção (Figura 5.30A e 5.30B) com hiperplasia dos centros germinativos com a presença de corpos apoptóticos, assim como dilatação dos seios e cordões medulares. O baço mostrou ativação do centro germinativo com a presença de corpos apoptóticos e importante atividade linfóide (Figura 5.30C e 5.30D).

Os rins e a bexiga apresentaram-se sem alterações significativas, contudo ao redor do ureter a presença de infiltrado inflamatório predominantemente composto por linfócitos, mastócitos íntegros e linfoblastos foi observada (Figura 5.29A e 5.29B). Infiltrado linfocitário também foi encontrado no útero e no tecido adiposo ao seu redor, além de mastócitos degranulados (Figura 5.31 C e 5.31D).

O timo e o cérebro destes animais não apresentaram alterações significativas.

### **5.6.3. Análise histopatológica dos órgãos dos animais infectados pela via intragástrica (IG) com formas tripomastigotas de *T.cruzi* provenientes de cultura de células**

As análises histopatológicas dos tecidos dos camundongos infectados pela via IG foram realizadas no 26º e 33º dias após a infecção. Apenas os órgãos com alterações histológicas significativas foram apresentados.

A coloração de Weigert não evidenciou alterações significativas nos órgãos examinados por esta via de infecção nos diferentes pontos.

#### **5.6.3.1 - 26º dia de infecção**

A análise do esôfago mostrou pequenos infiltrados inflamatórios focais linfomonocitários associados a um aparente aumento das fibras colágenas na camada muscular (Figura 5.32A, 5.32B e 5.32C), sem a evidenciação de parasitos. O estômago também apresentou infiltrado inflamatório heterogêneo e focal na camada muscular, composto por monócitos e linfócitos, com poucas células mielóides e mastócitos íntegros e degranulados, associado a parasitos (Figura 5.33A e 5.33B). O córion, entretanto, apresentou infiltrado predominantemente linfocitário com poucos eosinófilos. Aparente colagenogênese e redistribuição de fibras do

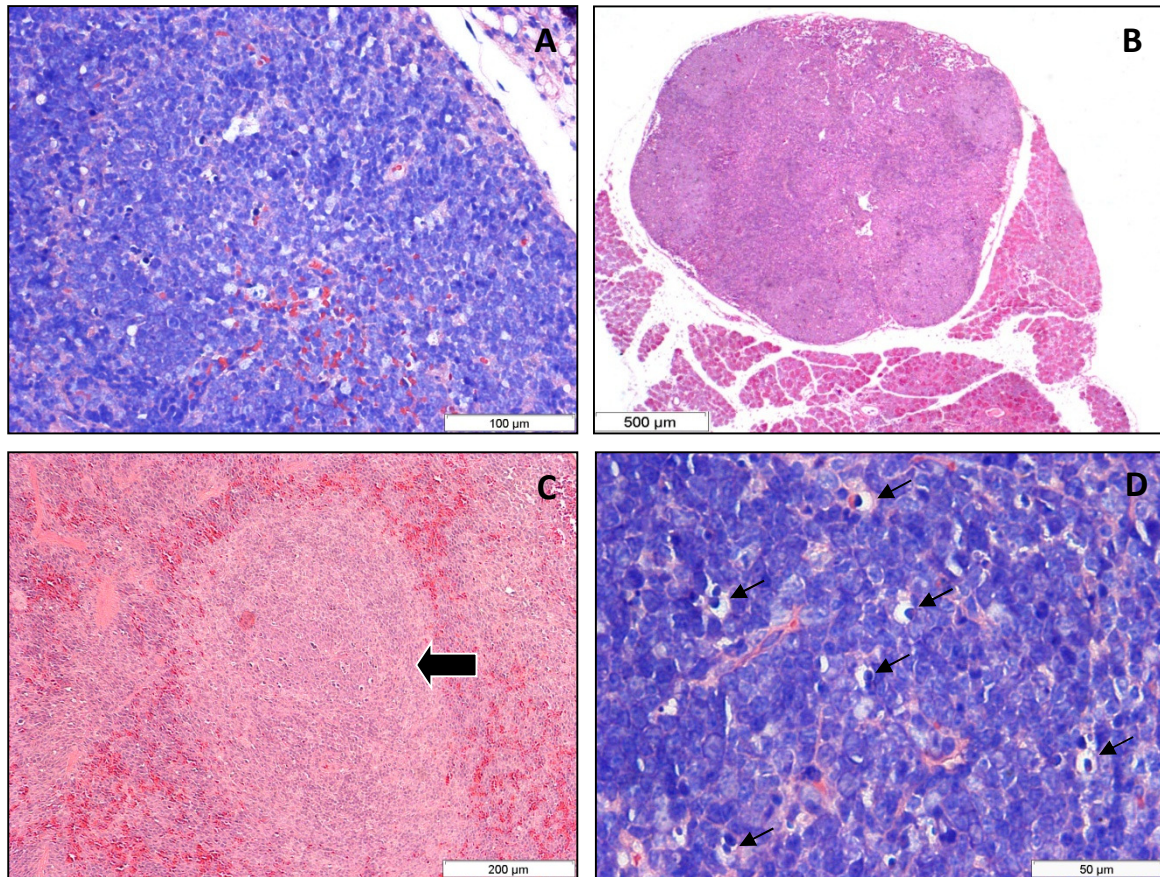


Figura 5.30 – Histopatologia dos linfonodos e baço de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 18 dias após a infecção. Em “A” linfonodo com hiperplasia dos centros germinativos com corpos apoptóticos e dilatação dos seios e cordões medulares(Giemsa) e “B” (HE); em “C” baço com ativação no centro germinativo (seta) (HE) e em “D” baço com corpos apoptóticos (setas) e atividade linfóide (Giemsa).



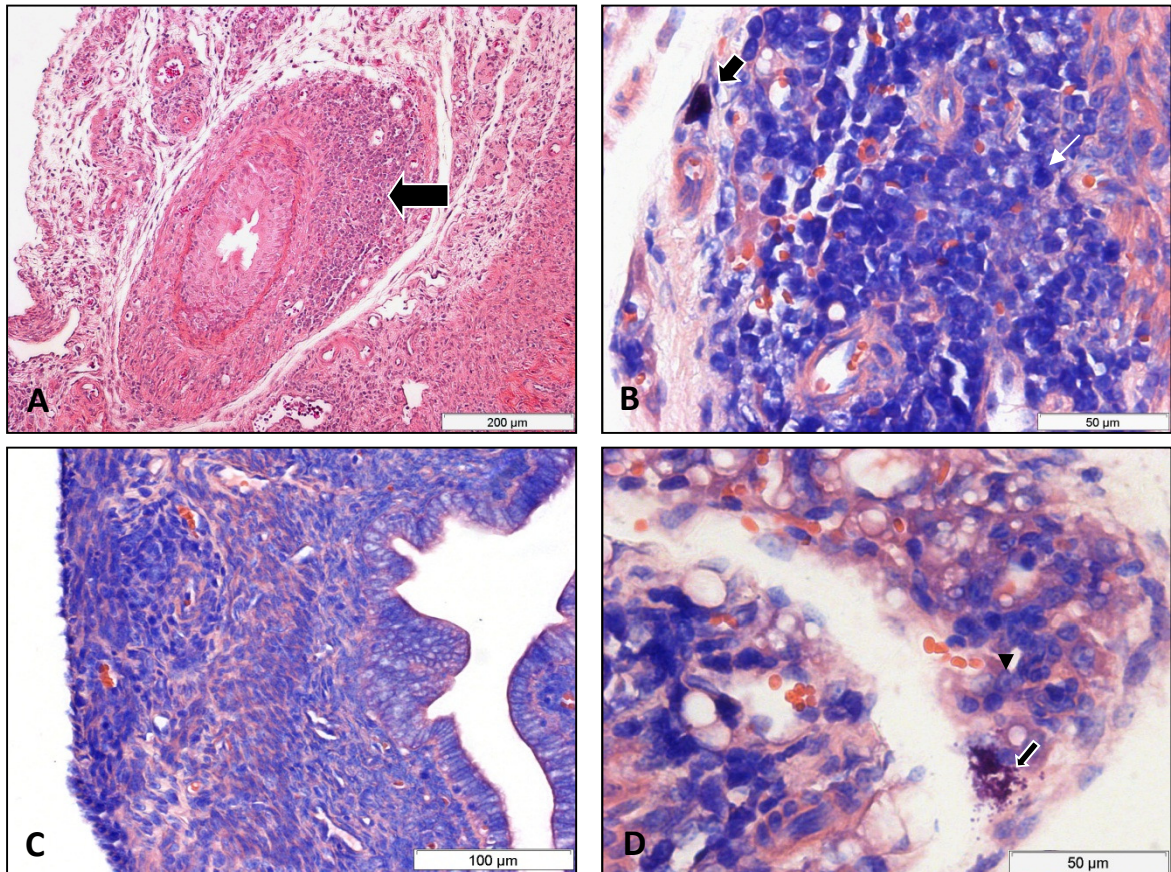


Figura 5.31 - Histopatologia do ureter, útero e tecido adiposo próximo ao útero de animais infectados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, dezoito dias após a infecção. Em “A” infiltrado inflamatório (seta larga) predominantemente composto por linfócitos no ureter (HE) e em “B” mastócitos íntegros (seta larga) e linfoblastos (seta fina) (Giemsa); em “C” infiltrado linfocitário no útero (Giemsa) e no tecido adiposo próximo ao útero com mastócitos degranulados (seta) e linfócito com morfologia imunoblástica (cabeça de seta), em “D” (Giemsa).

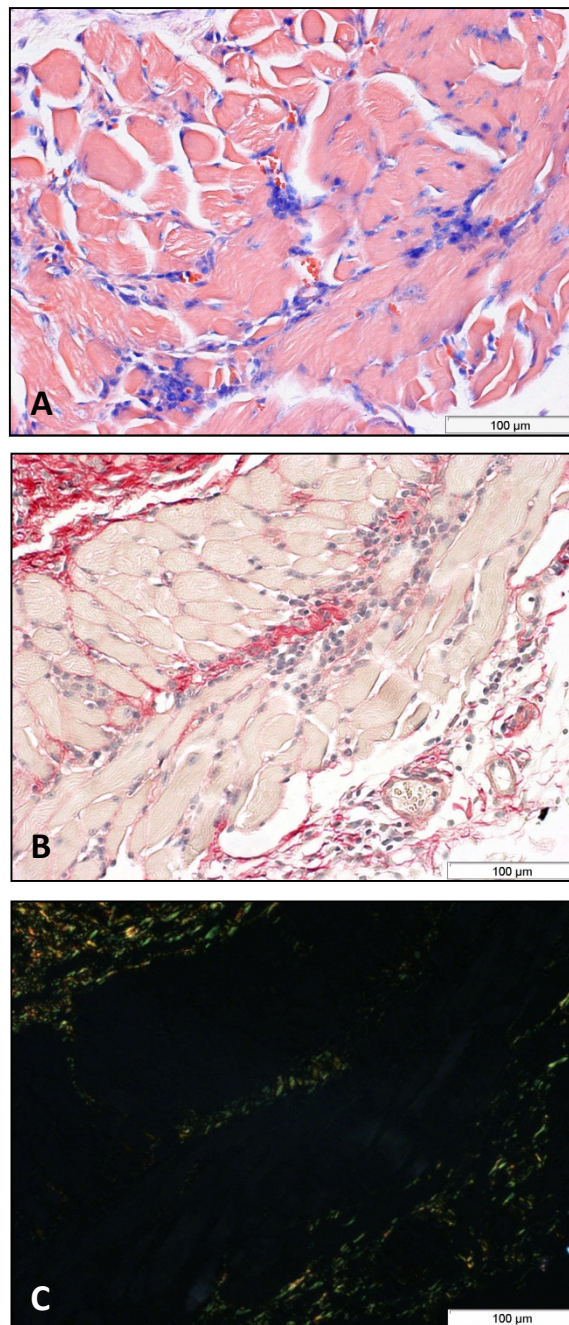


Figura 5.32 - Histopatologia do esôfago de animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Esôfago com infiltrados inflamatórios linfomonocitários focais, em “A” (Giemsa), associados ao aparente aumento das fibras colágenas na camada muscular, em “B”, sem polarização, e em “C”, com polarização, mostrando as fibras finas (marcadas em verde).

sistema colágeno foram observadas entre as fibras musculares, associados ao infiltrado inflamatório na camada muscular (Figura 5.33C, 5.33D, 5.33E e 5.33F).

Nos intestinos, um pequeno infiltrado focal linfomonocitário foi visto entre as fibras musculares (Figura 5.34A), associado à fibrose (Figura 5.34B e 5.34C). No tecido adiposo próximo ao intestino e no mesentério, poucas alterações foram observadas quando comparamos estes animais com os infectados IP (Figura 5.35A). Notou-se apenas um discreto infiltrado inflamatório essencialmente linfocitário, sem a evidência de parasitos. Assim como nos 18 dias de infecção nos animais infectados IP, observamos a placa de Peyer ativada e formação de centro germinativo com focos apoptóticos (Figura 5.35B). Ativação do “Milky spot” próximo ao estômago com células mielóides maduras e imaturas sugerindo hematopoiese extramedular também foi observado (Figura 5.35C).

O exame do coração mostrou infiltrado inflamatório difuso com predileção atrial e presença de plasmócitos no átrio esquerdo (Figura 5.36A). Também se observou, infiltrado inflamatório no endocárdio (Figura 36B) e pericárdio (Figura 5.36C) do ventrículo direito, com células de natureza predominantemente linfóide. Parasitos puderam ser visualizados em todas as regiões do órgão, contudo em menor quantidade que a observada nos animais infectados por via IP nos diferentes tempos de infecção (Figura 5.36D). Notou-se produção e redistribuição das fibras colágenas associadas ao infiltrado (Figura 5.36E e 5.36F).

O fígado apresentou focos de infiltrado inflamatório em menor quantidade que os observados nos animais infectados pela via IP, com predominância de linfócitos e células imaturas (Figura 5.37A). Notou-se, igualmente, a presença isolada de megacariócito (Figura 5.37B), infiltrado periductal no espaço porta, contendo células mielóides e pequenos focos hemorrágicos (Figura 5.37C). Além disso, um rearranjo do colágeno ao redor do vaso hepático foi evidente (Figura 5.38A e 5.38B).

O pâncreas mostrou lesões pouco significativas quando comparado com as registradas nos animais inoculados por via IP. Evidenciou-se discreto infiltrado inflamatório, edema (Figura 5.39A e 5.39B) e fibrose no tecido conjuntivo interacinar (Figura 5.39C e 5.39D). O tecido adiposo peripancreático apresentou



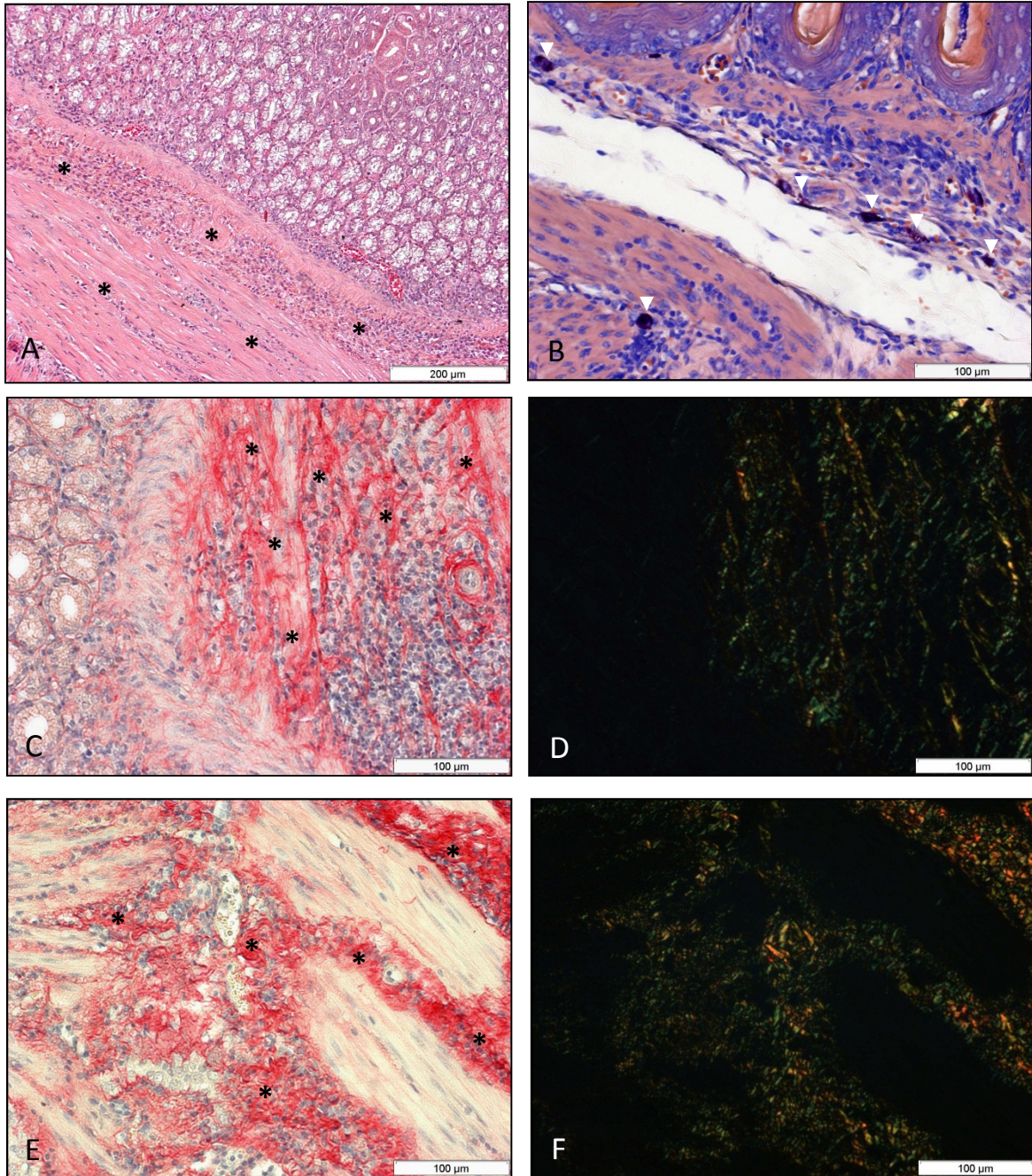


Figura 5.33 - Histopatologia do estômago de animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” estômago com infiltrado inflamatório heterogêneo na camada muscular (asteriscos) (HE); com monócitos, linfócitos, poucas células mielóides e numerosos mastócitos íntegros e degranulados (cabeça de seta), em “B” (Giemsa); em “C” e “E”, sem polarização, aparente colagenogênese (asteriscos) e, com polarização, redistribuição de fibras finas (marcadas em verde), em “D”, e espessas (marcadas em vermelho), em “F”, associadas ao infiltrado inflamatório na camada muscular (Picrosirius red).



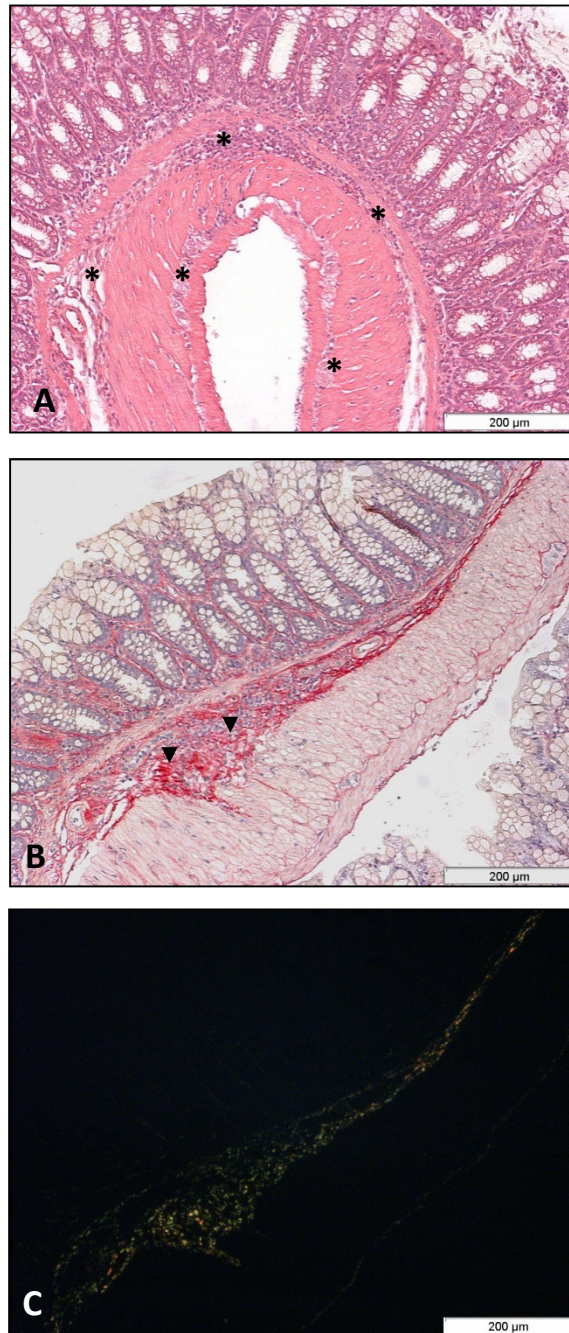


Figura 5.34 – Histopatologia do intestino de animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Intestinos com infiltrado inflamatório focal linfomonocitário entre as fibras musculares (asteriscos), em “A” (HE); em “B”, sem polarização, fibrose (cabeça de seta) associado ao infiltrado celular e, em “C”, com polarização, aumento das fibras finas (marcadas em verde) (Picrosirius red).

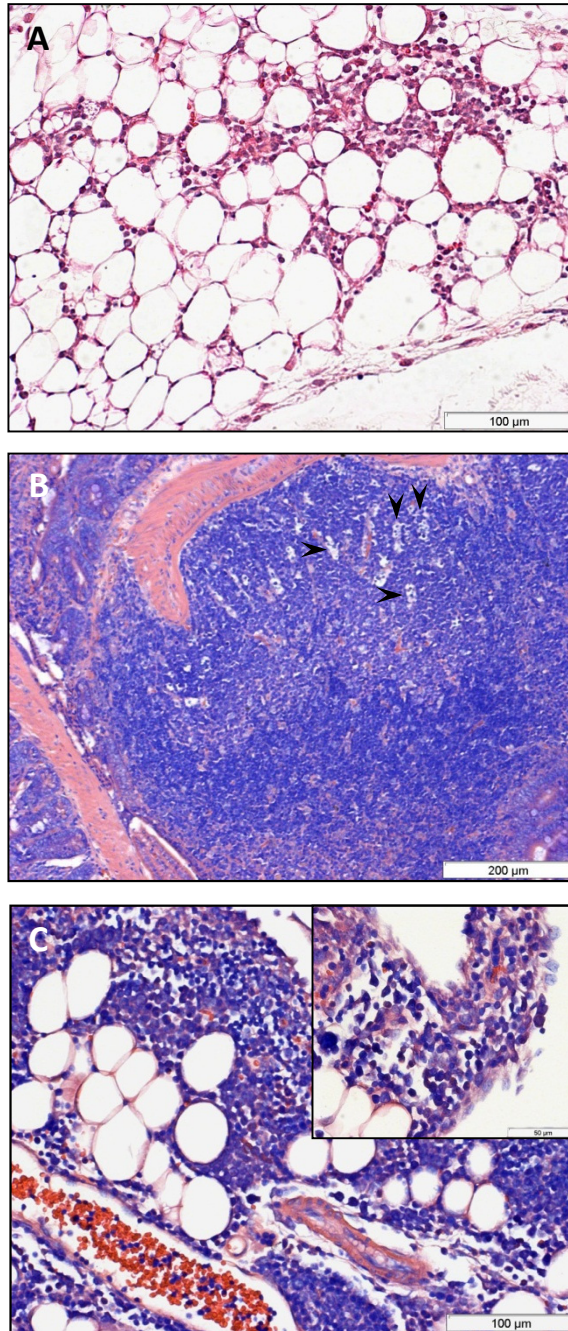


Figura 5.35 – Histopatologia do tecido adiposo próximo ao intestino, placa de Peyer e “milky spot” dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” tecido adiposo próximo ao intestino com discreto infiltrado inflamatório linfocitário (HE); em “B” placa de Peyer com formação de centro germinativo e focos apoptóticos (cabeça de seta) (Giemsa) e em “C” “milky spot” ativado próximo ao estômago com células mielóides maduras e imaturas (Giemsa).



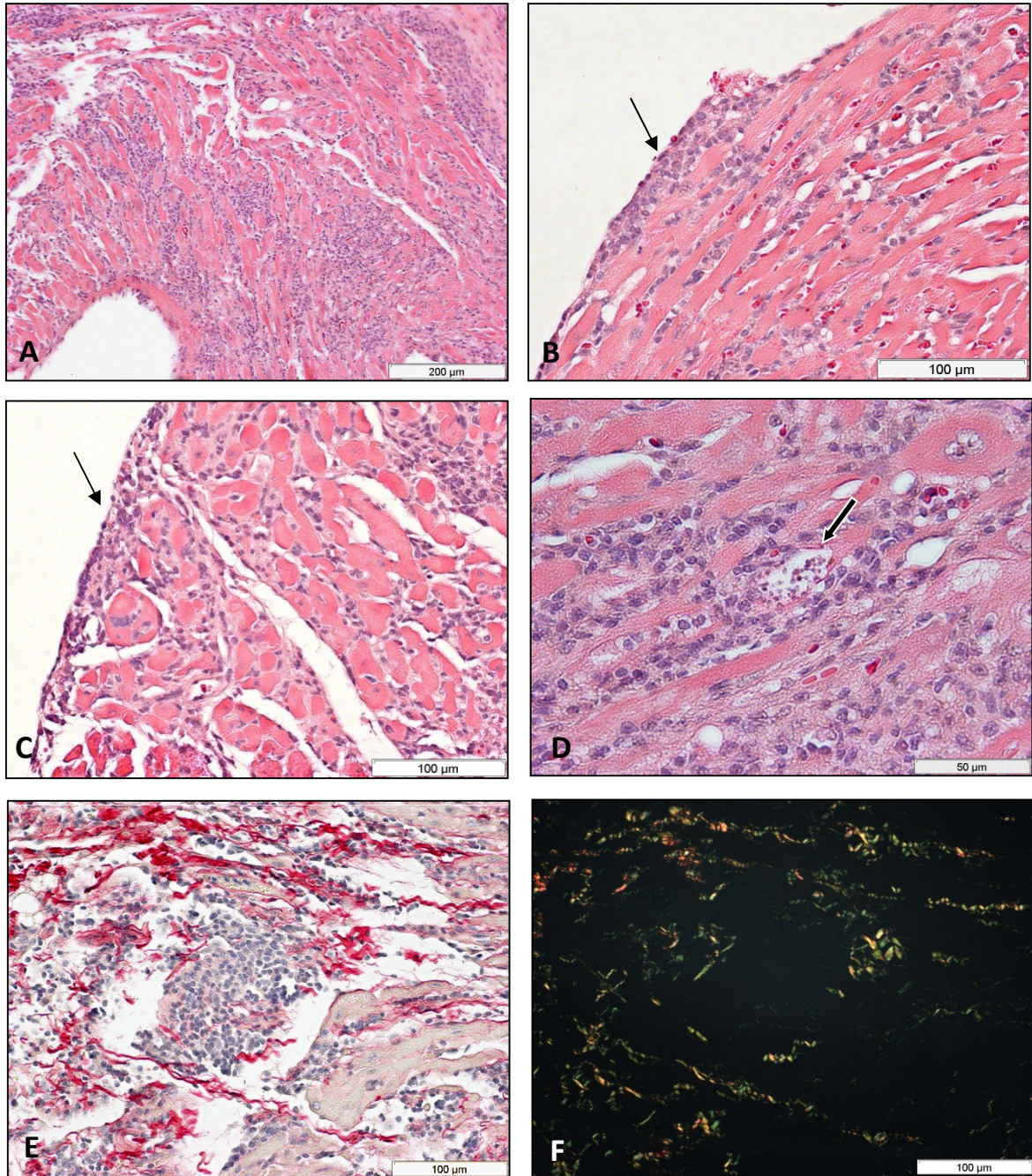


Figura 5.36 – Histopatologia do coração de animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Coração com infiltrado inflamatório difuso na região atrial, em “A”; em “B” infiltrado inflamatório linfóide no pericárdio (seta fina) e em “C” endocárdio (seta fina) do ventrículo direito; em “D” ninho de parasitos (seta) (HE); em “E”, sem polarização, e em “F”, com polarização, produção e redistribuição das fibras colágenas finas (marcadas em verde) e espessas (marcadas em alaranjado) associadas ao infiltrado (Picrosirius red).



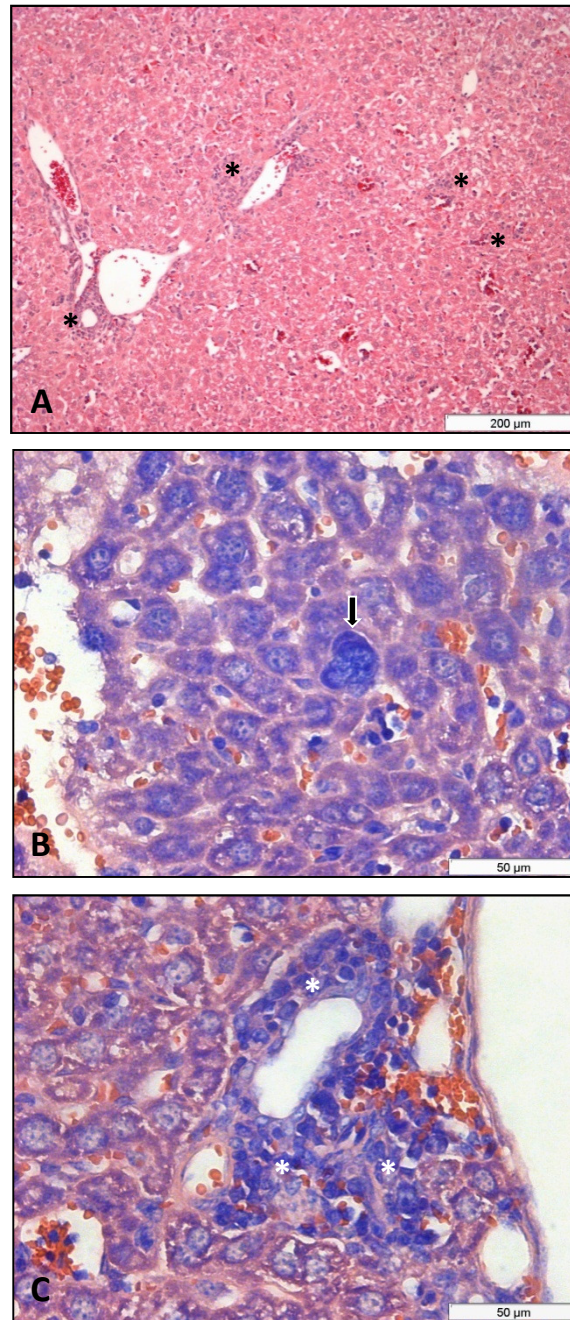


Figura 5.37 – Histopatologia do fígado dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Fígado com focos de infiltrado inflamatório (asteriscos) com predominância de linfócitos e células imaturas em “A”; megacariócito (seta), em “B” e infiltrado periductal no espaço porta (asteriscos) com células mielóides e pequenos focos hemorrágicos, em “C” (Giemsa).

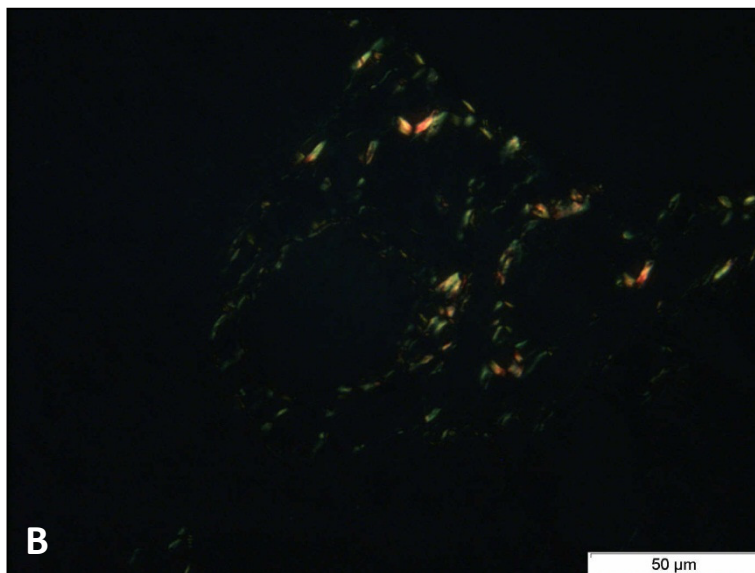
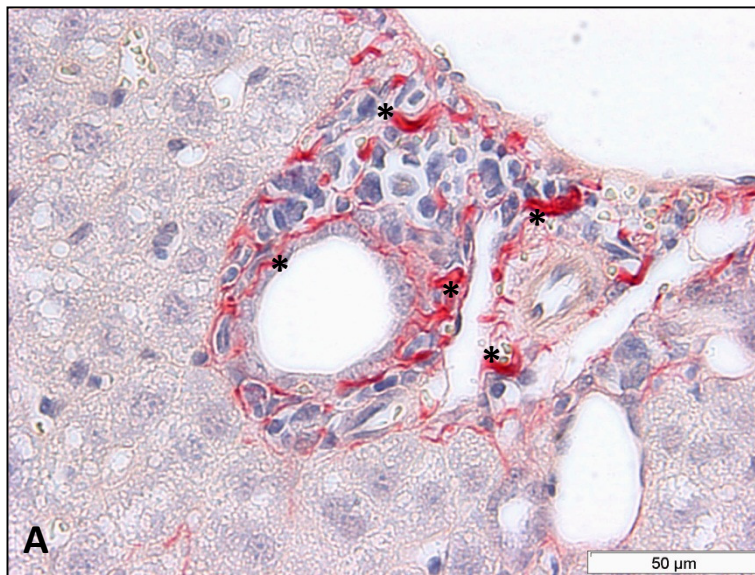


Figura 5.38 – Histopatologia do fígado de animais infectados por via intragástrica formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A”, sem polarização, redistribuição do colágeno ao redor do vaso hepático (asteriscos) e em “B”, com polarização, fibras finas (marcadas em verde) e espessas (marcadas em laranja) (Picrosirius red).



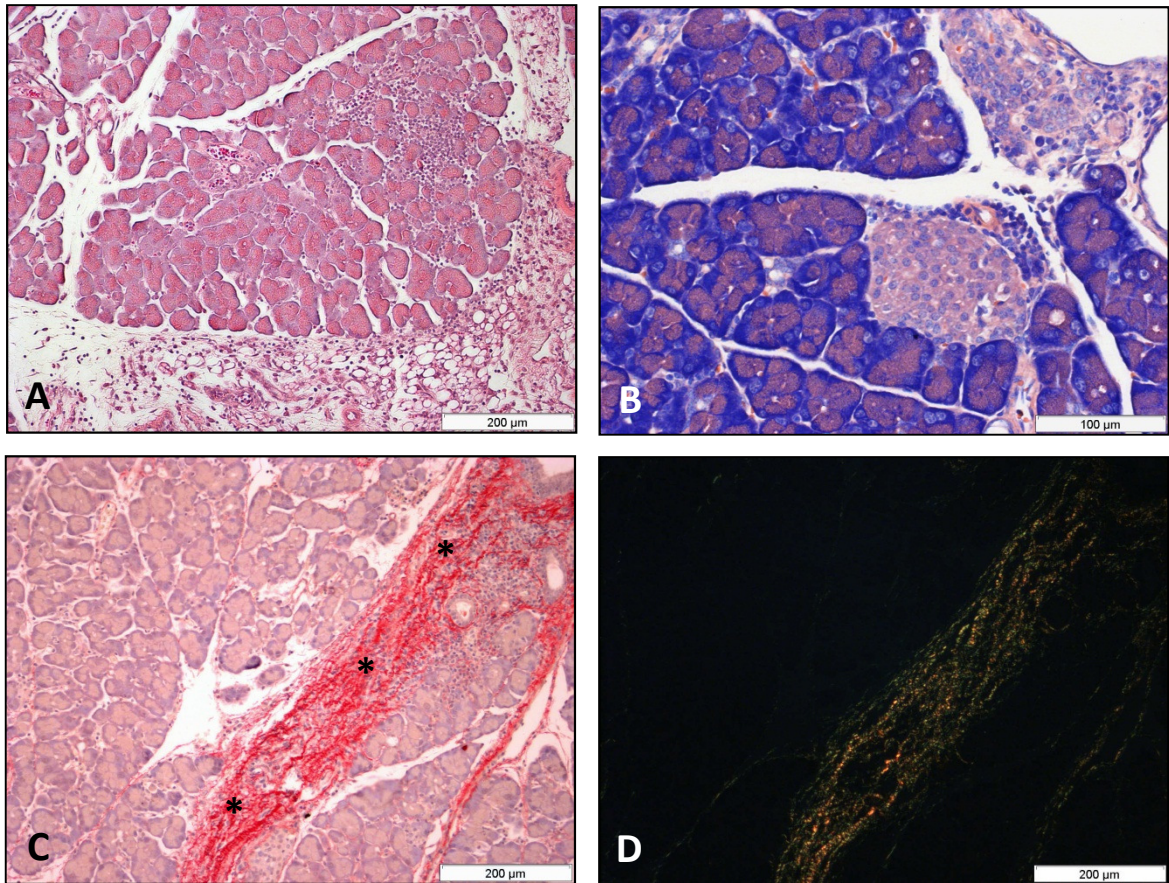


Figura 5.39 – Histopatologia do pâncreas de animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” pâncreas com discreto infiltrado inflamatório (asteriscos) (HE) e em “B” edema (Giemsa); em “C”, sem polarização, fibrose no tecido conjuntivo interacinar (asteriscos) e em “D”, com polarização, fibras espessas (marcadas em laranja) (Picosirius red).

focos de hemorragia e infiltrado inflamatório, essencialmente linfocitário, com monócitos e células mielóides (Figura 5.40A e 5.40B). Produção de fibras colágenas também foi observada (Figura 5.40C e 5.40D).

Os linfonodos próximos ao pâncreas, à traquéia e inguinal mostraram a formação de vários centros germinativos ativados e aparente exportação celular (Figura 5.41A e 5.41B). O baço também mostrou-se ativado, com a presença de centros germinativos na polpa branca. Não houve redução da polpa vermelha como nos animais infectados pela via IP (Figura 5.42A). Observou-se também a redistribuição do colágeno na cápsula esplênica (Figura 5.42B e 5.42C).

Pequenos focos de infiltrados inflamatórios, com a presença de linfócitos e plasmócitos perivascularares e na meninge foram observados no cérebro (Figura 5.43A e 5.43B).

O rim apresentou infiltrado inflamatório difuso com linfócitos ativos na região cortical e mastócitos no tecido adiposo ao seu redor (Figura 5.44A). Próximo ao ureter foi observado área de infiltrado inflamatório linfomononuclear (Figura 5.44B). O mesmo quadro e ninhos de parasitos foram evidenciados na camada muscular da bexiga (Figura 5.44C e 5.44D).

No útero e no tecido adiposo próximo foi observado infiltrado inflamatório linfomononuclear além de células mielóides (Figura 5.45A e 5.45B). Além disso, no útero, também foi possível notar a redistribuição e neoformação de fibras colágenas (Figura 5.45C e 5.45D).

O timo dos animais não apresentou alterações significativas.

#### **5.6.3.2 - 33º dia de infecção**

Neste ponto, pequenos focos de infiltrado inflamatório entre as fibras da camada muscular mais externa do esôfago, em menor intensidade que o observado no ponto anterior de infecção e nos animais infectados pela via IP, foram observados (Figura 5.46A). O estômago apresentou infiltrado inflamatório linfomonocitário, com a presença de mastócitos íntegros e degranulados na camada muscular e córion (Figura 5.46B e 5.46C) e presença de ninho de parasitos na



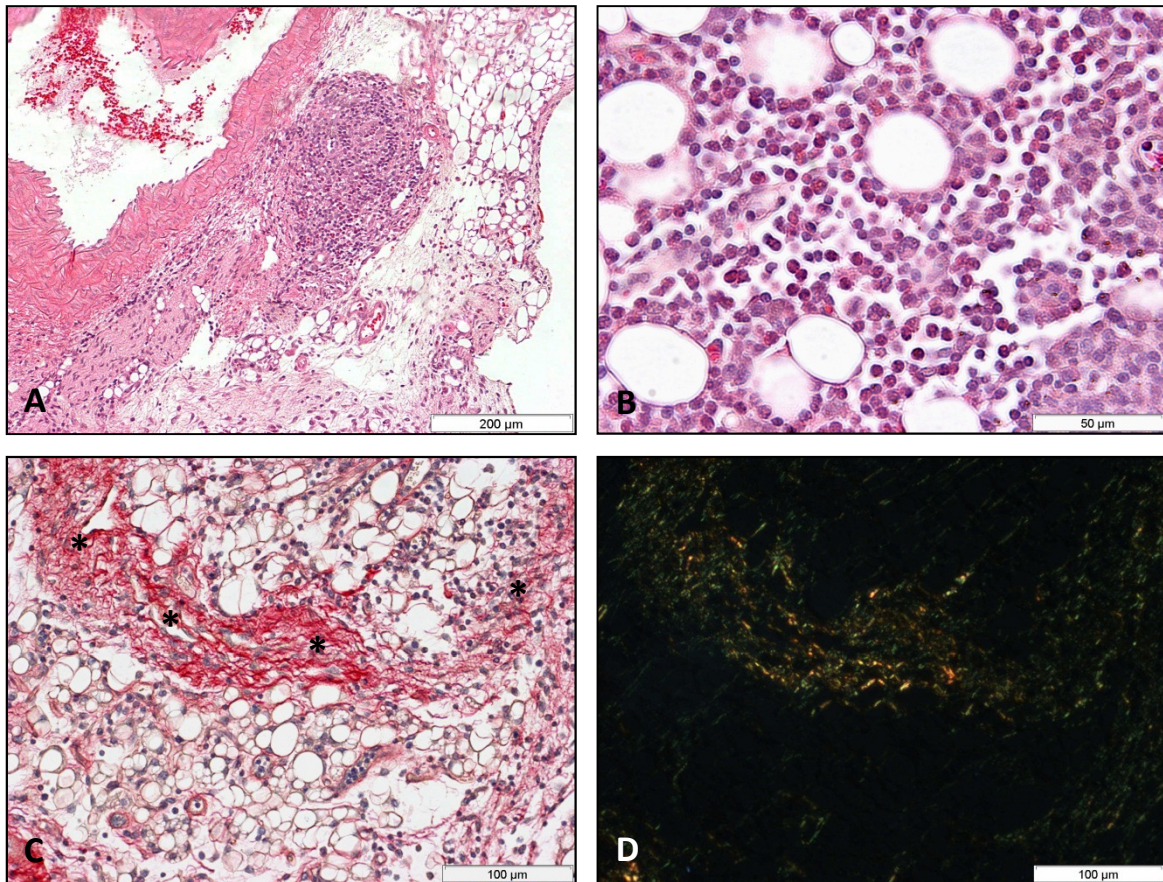


Figura 5.40 – Histopatologia do tecido adiposo peripancreático dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” tecido adiposo peripancreático com infiltrado inflamatório; com predominância de linfócitos, monócitos e células mielóides “B”, (HE). Em “C”, sem polarização, produção de fibras colágenas (asteriscos) finas (marcadas em verde) espessas (marcadas em laranja) em “D”, com polarização (Picrosirius red).

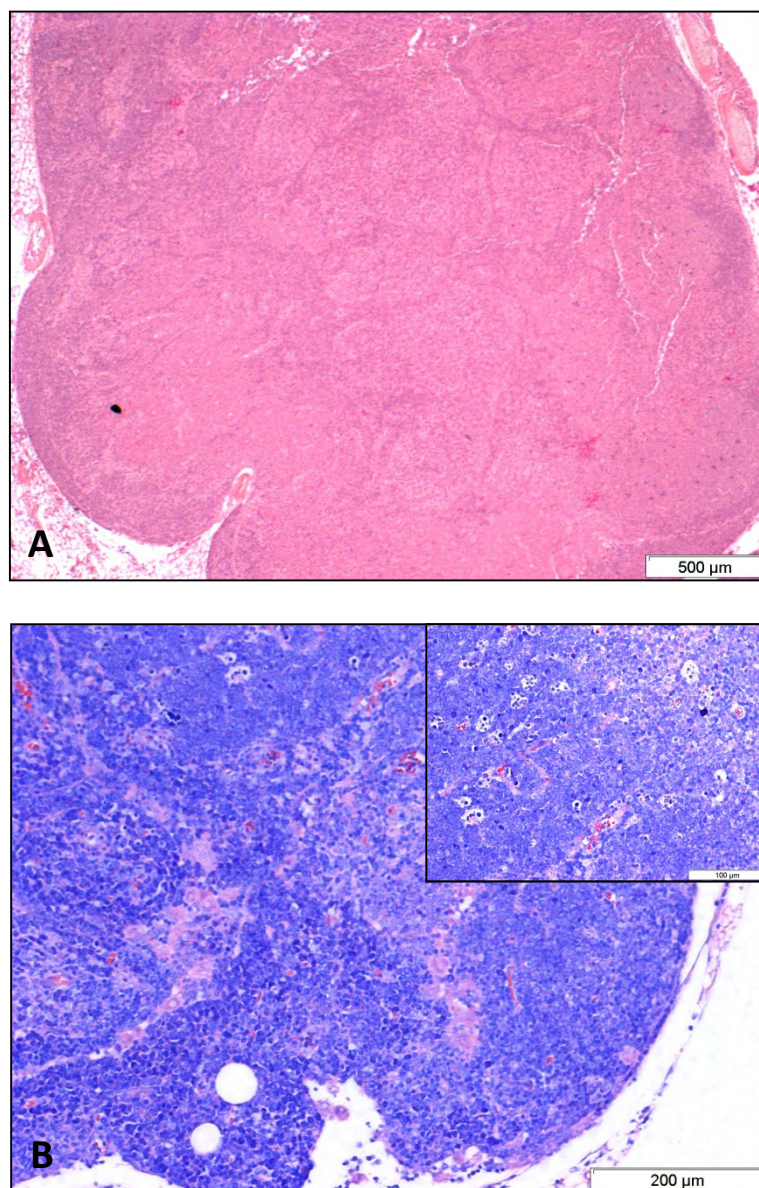


Figura 5.41 – Histopatologia dos linfonodos de animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” (HE) e em “B” (Giemsa), linfonodos próximos ao pâncreas, à traqueia e inguinal com formação de centros germinativos ativados e aparente exportação celular.



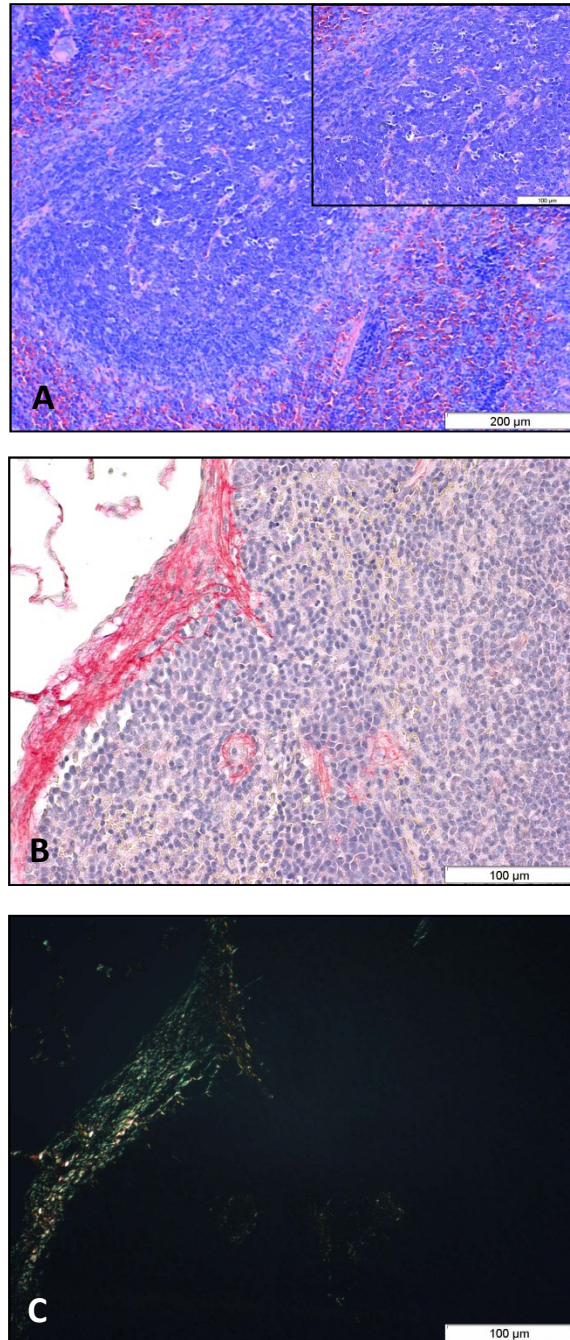


Figura 5. 42 – Histopatologia do baço dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” centros germinativos na polpa branca do baço sem redução da polpa vermelha (Giemsa); em “B”, sem polarização, e “C”, com polarização redistribuição do colágeno na cápsula esplênica, fibras finas (marcadas em verde) (PSR).

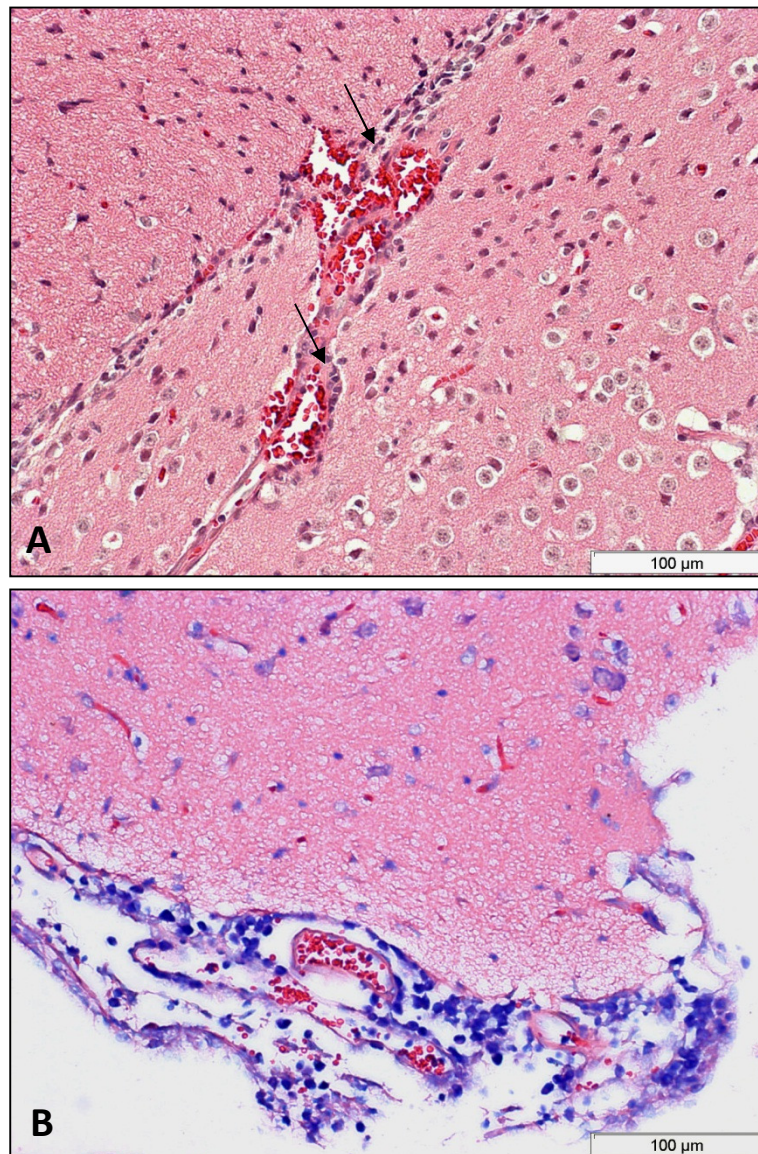


Figura 5.43 – Histopatologia dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” cérebro com pequenos focos de infiltrado inflamatório perivascular (setas) e em “B” na meninge (HE); presença de linfócitos e plasmócitos no infiltrado (Giemsa).



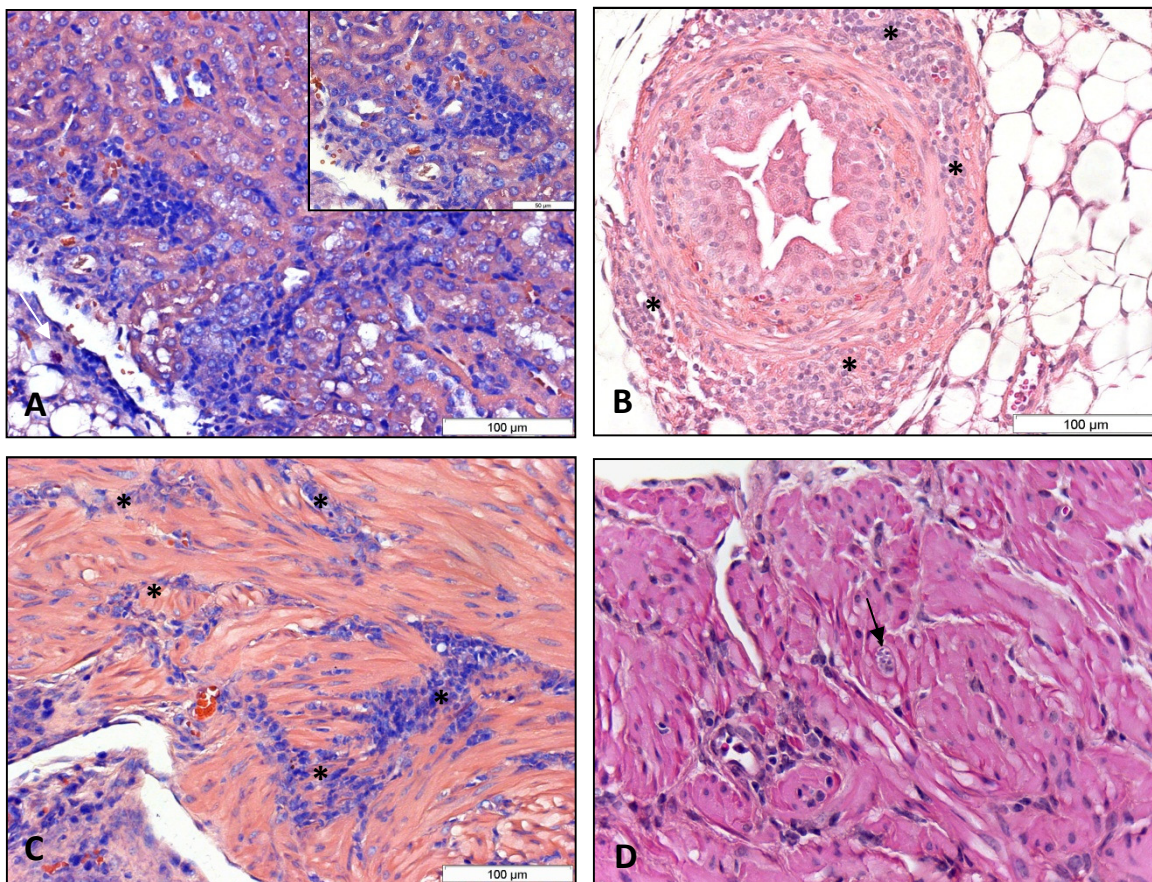


Figura 5.44 – Histopatologia do rim, ureter e bexiga dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” rim com infiltrado inflamatório difuso composto de linfócitos ativos na região cortical e mastócitos (seta) no tecido adiposo próximo (Giemsa). Em “B”, ureter com infiltrado inflamatório (asteriscos) linfomononuclear intenso ao seu redor (HE); em “C” infiltrado inflamatório (asteriscos) na bexiga (Giemsa); em “D” ninho de parasitos (seta) na camada muscular da bexiga (HE).

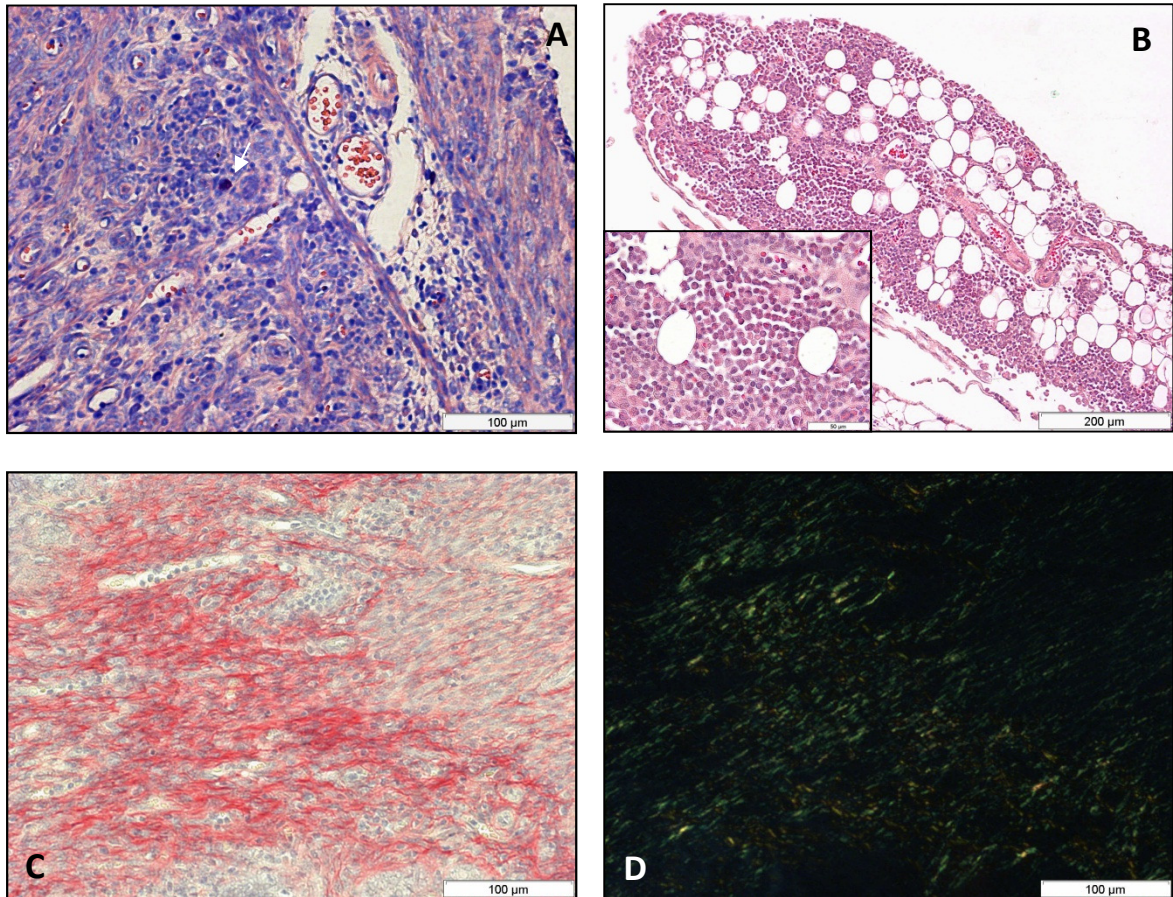


Figura 5.45 – Histopatologia do útero e tecido adiposo próximo ao útero dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 26 dias após a infecção. Em “A” útero (Giemsa); em “B” tecido adiposo próximo ao útero (HE) com infiltrado inflamatório linfomononuclear, células mielóides e mastócitos (seta) e em “C” sem polarização, redistribuição e neoformação de fibras também no útero (marcadas em verde), com polarização, em “D” (Picrosirius red).



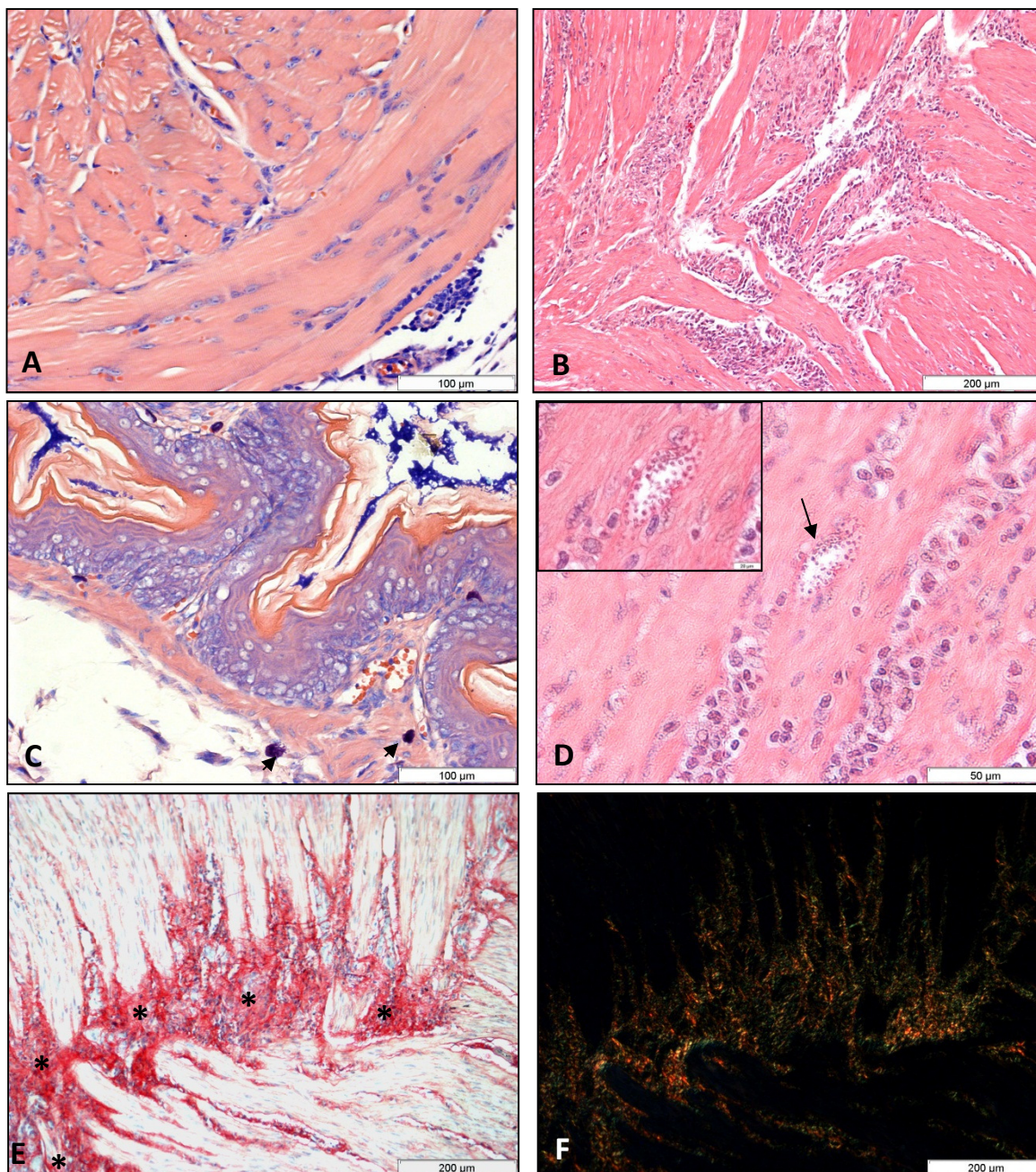


Figura 5.46 – Histopatologia do esôfago e estômago dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Em “A” esôfago com pequenos focos de infiltrado inflamatório entre as fibras da camada muscular mais externa (Giemsa); em “B” estômago com infiltrado inflamatório intenso (HE); linfomonocitário, com a presença de mastócitos (setas) íntegros e degranulados na camada muscular e córion, em “C” (Giemsa); ninho de parasito (seta) na camada muscular do estômago em “D” (Giemsa); em “E”, sem polarização, fibrose na camada muscular do estômago (asteriscos) associada ao infiltrado inflamatório e em “F”, com polarização, aumento das fibras finas (marcadas em verde) e espessas (vermelho) (Picrosirius red).



camada muscular (Figura 5.46D). Observamos também, associado ao infiltrado inflamatório, áreas de fibrose na camada muscular do órgão (Figura 5.46E e 5.46F).

O intestino apresentou-se com extensas áreas de infiltrado inflamatório, essencialmente linfocitário, entre as camadas musculares (Figura 5.47A). As placas de Peyer estavam ativadas com a presença de centros germinativos (Figura 5.47B). “Milky spot”, próximo ao estômago, também se mostrou ativado, com infiltrado composto por numerosos linfócitos e poucos eosinófilos (Figura 5.47C). O mesentério e o tecido adiposo próximo ao intestino, como no 26<sup>º</sup> dia pós-infecção, apresentaram apenas um discreto infiltrado inflamatório. Parasitos não foram nestes órgãos evidenciados.

O coração mostrou áreas de intenso e difuso infiltrado inflamatório, constituído predominantemente por linfócitos (Figura 5.48A), no átrio (Figura 5.48B) e endocárdio (Figura 5.48C) maior que o observado nos demais grupos examinados em todos os pontos de necropsia e via de infecção. Poucos ninhos de parasitos foram observados neste órgão (Figura 5.48D). Associada ao infiltrado inflamatório foi possível observar uma produção e redistribuição das fibras do sistema colágeno (Figura 5.49A e 5.49B). Extensas áreas de infiltrado inflamatório composto por linfócitos e monócitos também foram registradas no tecido conjuntivo próximo à traquéia (Figura 5.49C).

O fígado mostrou infiltrado inflamatório focal e periportal com a presença de eosinófilos, neutrófilos, eventuais megacariócitos e células imaturas, indicando hematopoiese extramedular de células mielóides, associado a áreas de hemorragia. Além disso, notou-se a reorganização e colagenogênese de fibras periportais (Figura 5.50A, 5.50B, 5.50C e 5.50D). O pâncreas apresentou-se ligeiramente inflamado, com infiltrado inflamatório de menor intensidade quando comparado com os animais infectados pela via IP, tanto na porção endócrina quanto na exócrina (Figura 5.51A e 5.51B). Presença de fibrose no tecido conjuntivo associado ao pâncreas também foi observado (Figura 5.51C e 5.51D), sem a presença de parasitos.

Os linfonodos próximos ao pâncreas, perirenal e inguinal mostraram-se intensamente ativados com centro germinativo evidente e seios linfonodais apresentando muitas células indicando grande circulação linfocitária (Figura 5.52A e

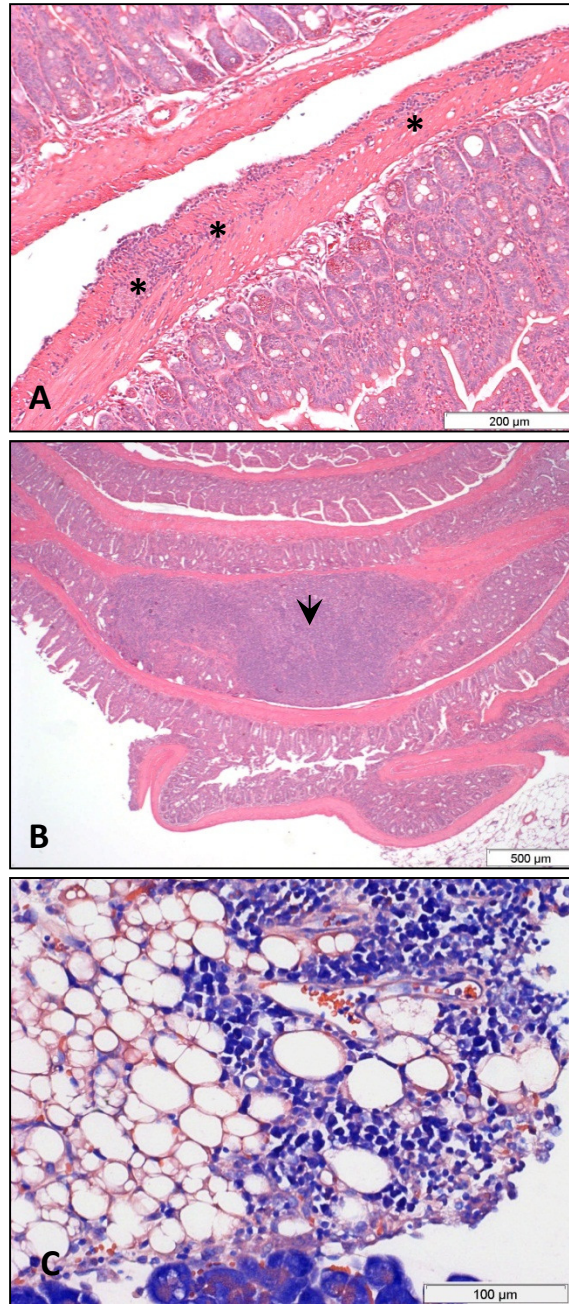


Figura 5.47 – Histopatologia do intestino, placa de Peyer e “milky spot” dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Intestino com extenso infiltrado inflamatório, essencialmente linfocitário, entre as camadas musculares (asteriscos), em “A” (HE); em “B” placa de Peyer (cabeça de seta) ativada com a presença de centros germinativos (HE); em “C” “milky spot” ativado, composto por numerosos linfócitos e poucos eosinófilos próximo ao estômago (Giemsa).

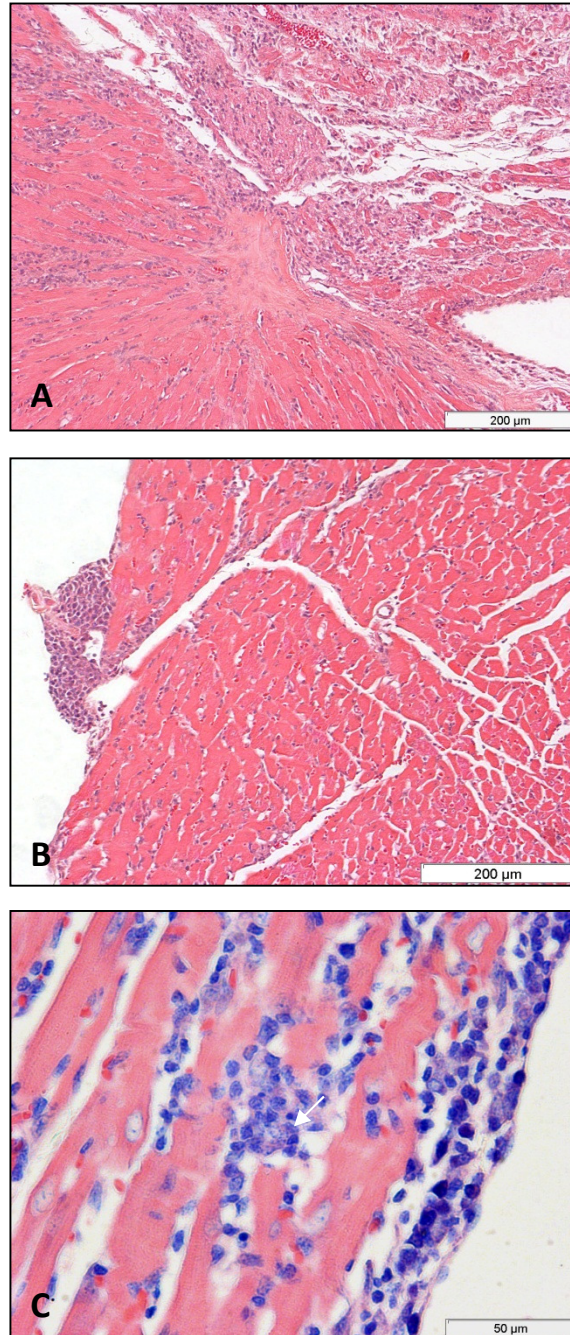


Figura 5.48 – Histopatologia do coração dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Coração com intenso e difuso infiltrado inflamatório predominantemente linfocitário no átrio, em “A”, e no endocárdio, em “B”, (HE) e poucos ninhos de parasitos (seta), em “C”, (Giemsa).



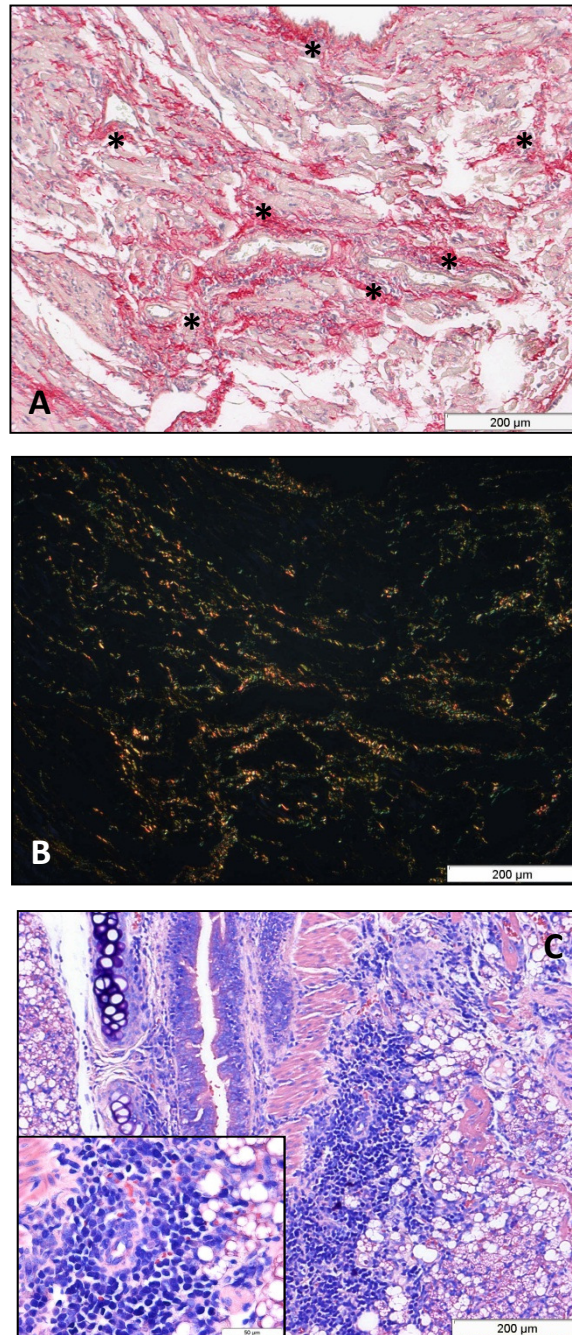


Figura 5.49 – Histopatologia do coração e tecido conjuntivo próximo a traquéia dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Em “A”, sem polarização, produção e redistribuição das fibras (asteriscos) do sistema colágeno associadas ao infiltrado inflamatório do coração, marcadas em verde e laranja em “B”, com polarização, (Picrosirius red); em “C” tecido conjuntivo próximo a traquéia com extenso infiltrado inflamatório composto por linfócitos e macrófagos (Giemsa).

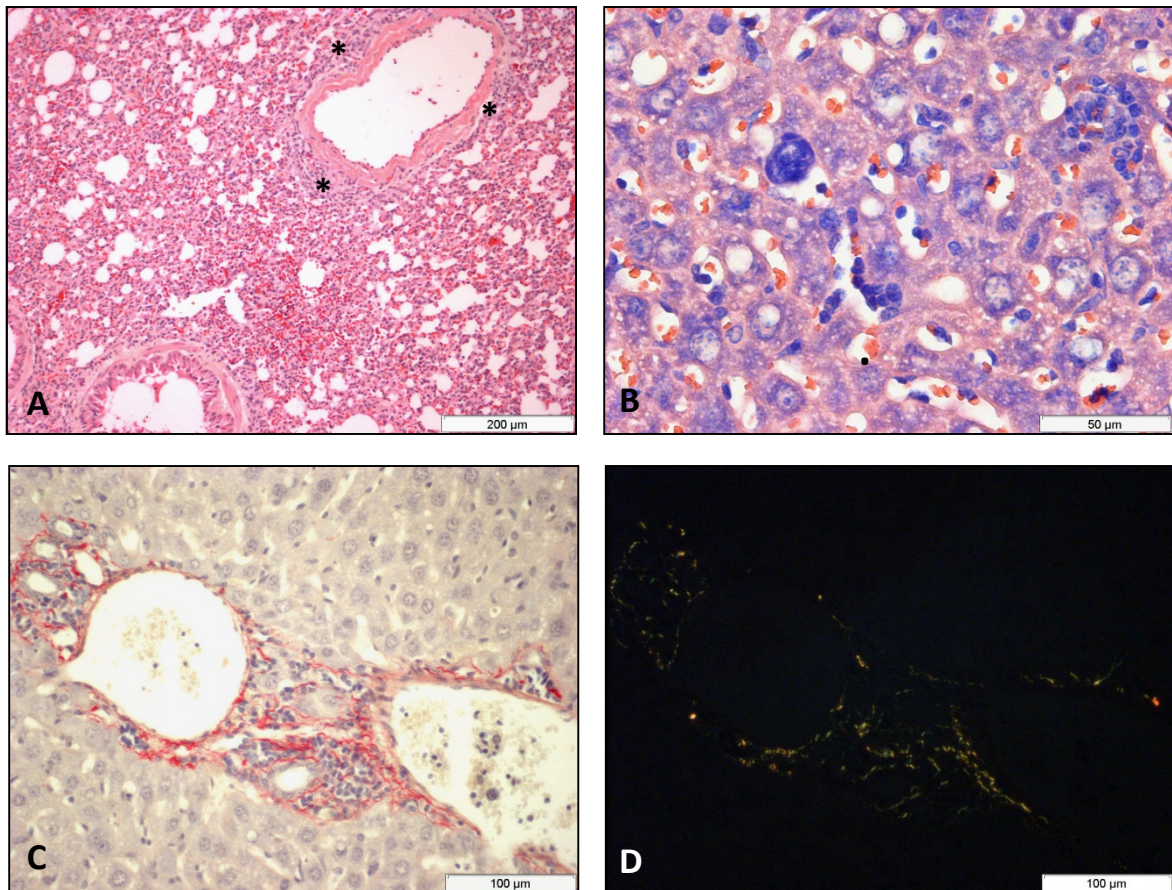


Figura 5.50 – Histopatologia do fígado dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Em “A” (HE) e “B” (Giemsa), fígado com infiltrado inflamatório focal e periportal (asteriscos) com a presença de eosinófilos, neutrófilos, megacariócito e células imaturas, indicando hematopoiese extracelular de células mieloides, associado à hemorragia; em “C”, sem polarização, e “D”, com polarização, reorganização e collagenogênese das fibras na região periportal (marcadas em verde) (Picrosirius red).



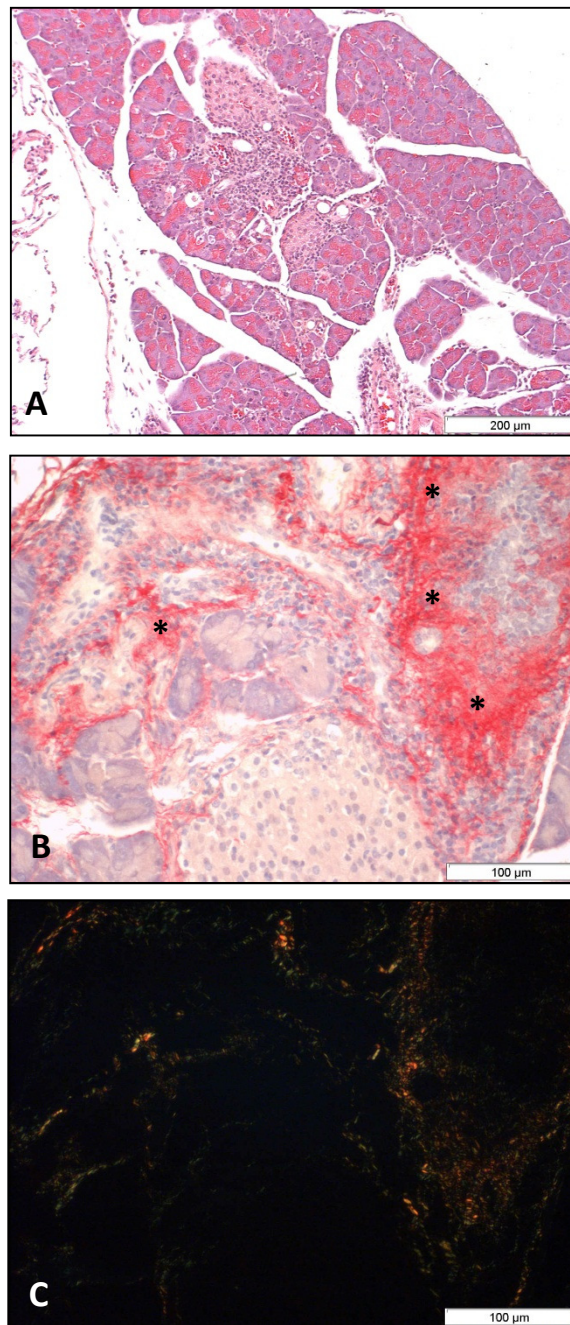


Figura 5.51 – Histopatologia do pâncreas dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Pâncreas com infiltrado inflamatório, em “A” (HE); em “B”, sem polarização, tecido conjuntivo associado ao pâncreas com fibrose (asteriscos) e fibras espessas (marcadas em laranja) em “C”, com polarização (Picrosirius red).

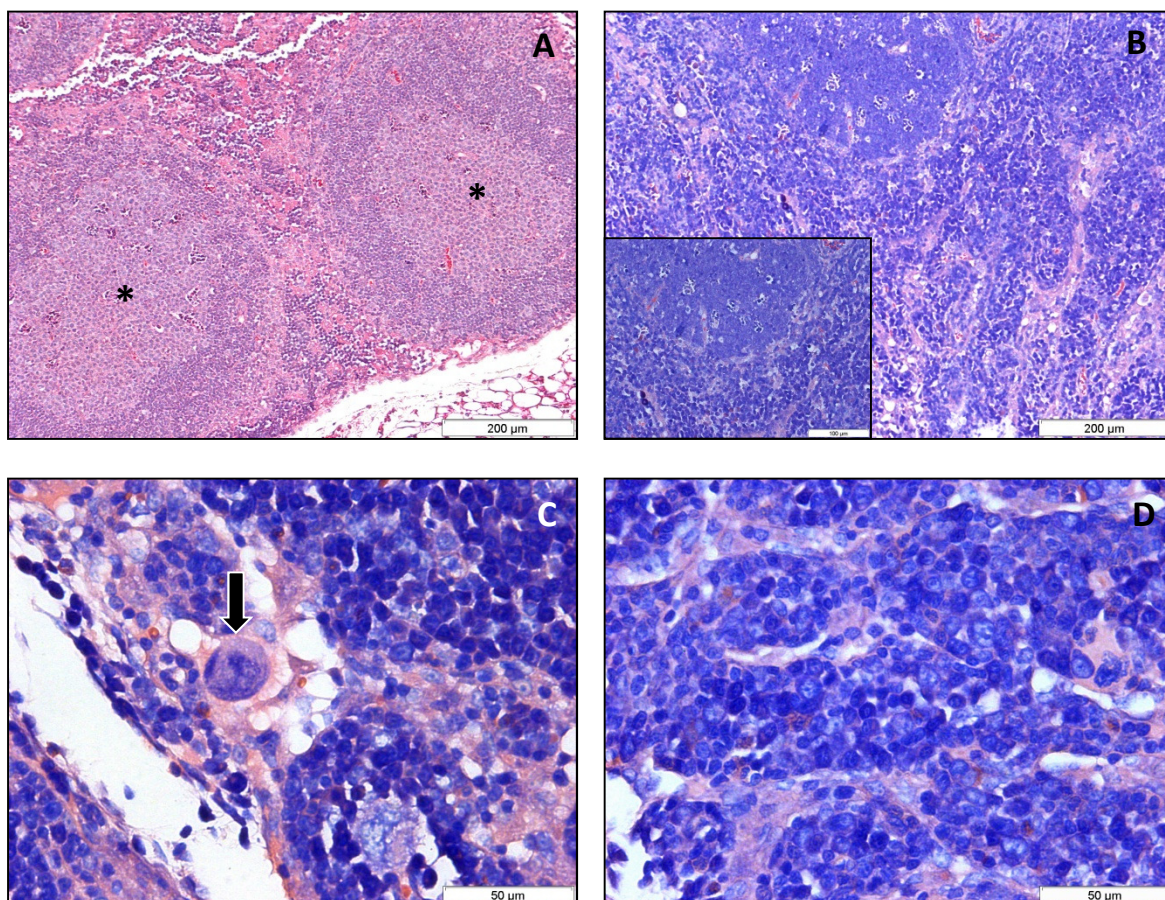


Figura 5.52 – Histopatologia dos linfonodos de animais infectados por via por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Linfonodo próximo ao pâncreas ativado com centro germinativo evidente (asteriscos), em “A” (HE) e seios linfonodais com muitas células indicando grande circulação linfocitária, em “B” (Giemsa); em “C”, presença de megacariócito (seta), plasmocitogênese centros germinativos independentes nos linfonodos peripâncreático, em “D” (Giemsa).

5.52B). Nos peripancreáticos notou-se também a presença de raros megacariócitos, plasmocitogênese e centros germinativos independentes (Figura 5.52C e 5.52D). O baço desses animais estava ativado e com formação de centro germinativo, como observado nos outros pontos de necropsia e vias de infecção (Figura 5.53A). Na região periarterial deste órgão foi possível notar a redistribuição das fibras colágenas (Figura 5.53B e 5.53C).

Pequenos focos de infiltrado inflamatório perivascular estavam presentes no cérebro e na meninge. No cérebro, plasmócitos e linfócitos foram evidentes no infiltrado (Figura 5.54A e 5.54B).

O rim mostrou-se congesto e com presença de infiltrado inflamatório periglomerular (Figura 5.55A). O tecido adiposo próximo ao órgão revelou infiltrado linfocitário associado a presença de parasitos (Figura 5.55B). Uma possível neoformação de fibras colágenas também foi observada nesta região (Figura 5.55C e 5.55D).

Na bexiga, congestão e discreto infiltrado entre as fibras musculares, associado à presença de mastócitos íntegros e degranulados foram evidenciados (Figura 5.56A e 5.56B). A camada muscular do útero apresentou infiltrado linfocitário e neoformação e redistribuição das fibras do sistema colágeno (Figura 5.57A, 5.57B, 5.57C e 5.57D).

O timo dos animais não apresentou alterações significativas.

### **5.7. Dosagem de anticorpos**

Os ensaios da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção dos anticorpos (IgM e IgG) anti-*T. cruzi* mostraram que os animais do grupo infectados pela via IP apresentaram títulos de anticorpos mais baixos que os infectados pela via IG (Tabela 5.1).

### **5.8. FACs**

A dinâmica da subpopulação de linfócitos T (LT) CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi avaliada pela citometria de fluxo no baço, linfonodo e sangue nos grupos infectados e grupo controle.



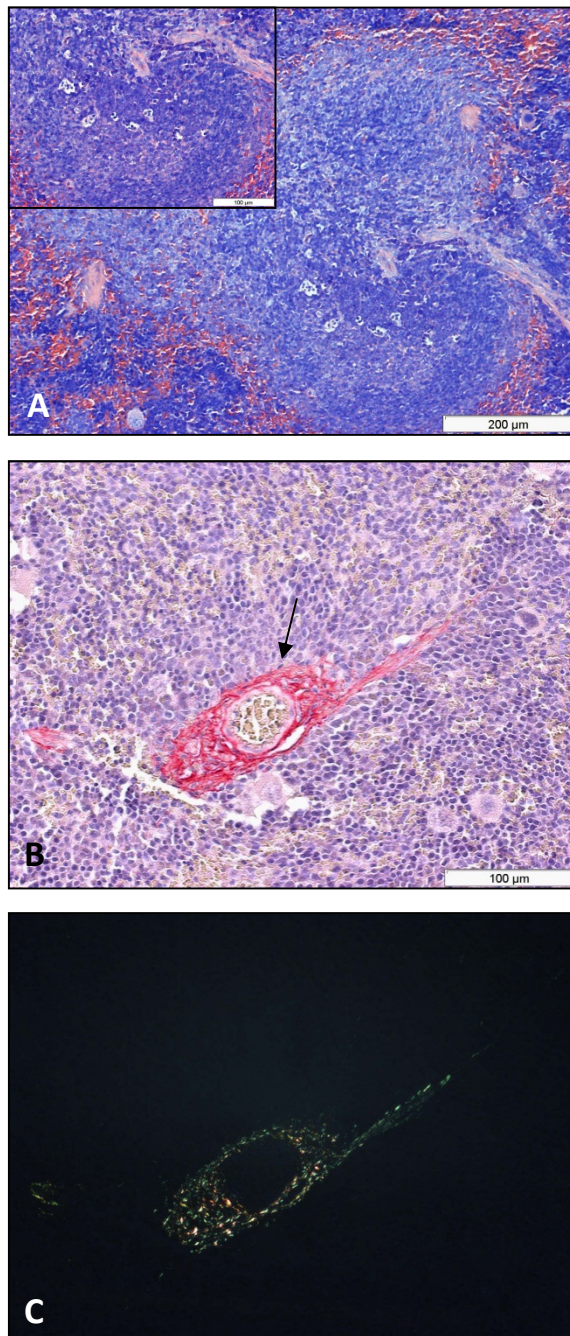


Figura 5.53 – Histopatologia do baço dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Em “A” baço ativado e com formação de centro germinativo (Giemsa); em “B”, sem polarização, redistribuição das fibras colágenas na região periarterial (seta); em “C”, com polarização, fibras finas (marcadas em verde) (Picrosirius red).

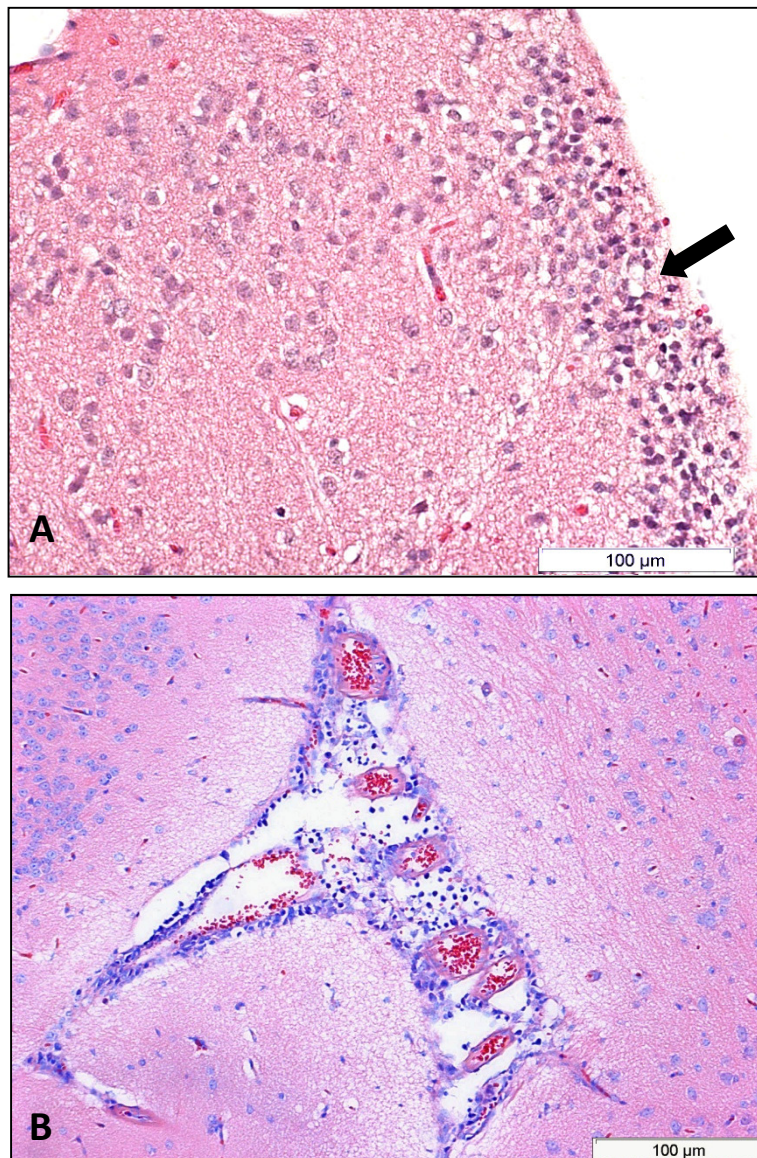


Figura 5.54 – Histopatologia do cérebro dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Em “A” cérebro com pequenos focos de infiltrado inflamatório na meninge (seta) (HE); e perivascular compostos por plasmócitos e linfócitos, em “B” (Giemsa).



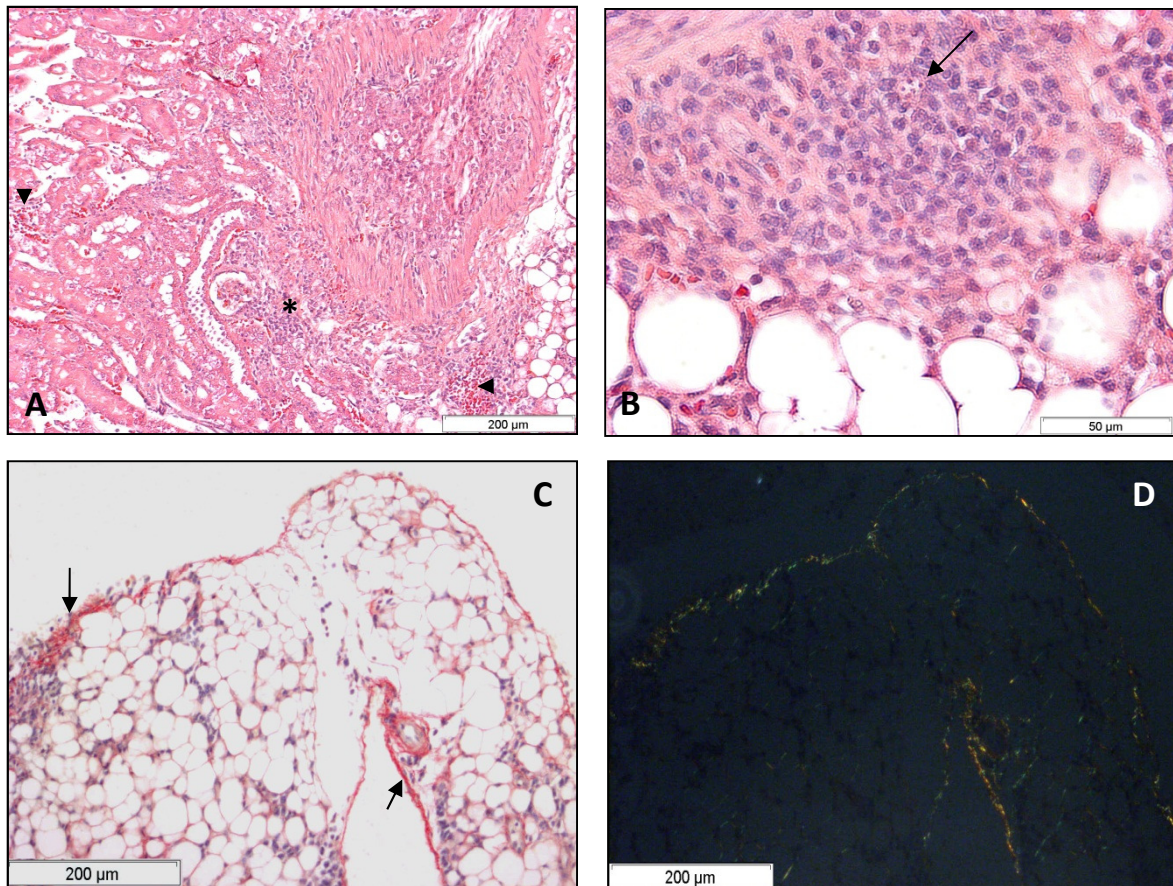


Figura 5.55 – Histopatologia do rim e tecido adiposo perirenal dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Em “A” rim com congestão (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório periglomerular (asteriscos); em “B” infiltrado linfocitário com parasitos (seta) no tecido adiposo perirenal (HE); em “C”, não polarizado, e “D”, com polarização, neof ormation (setas) de fibras colágenas no tecido adiposo perirenal (marcadas em amarelo) (Picosirius red).

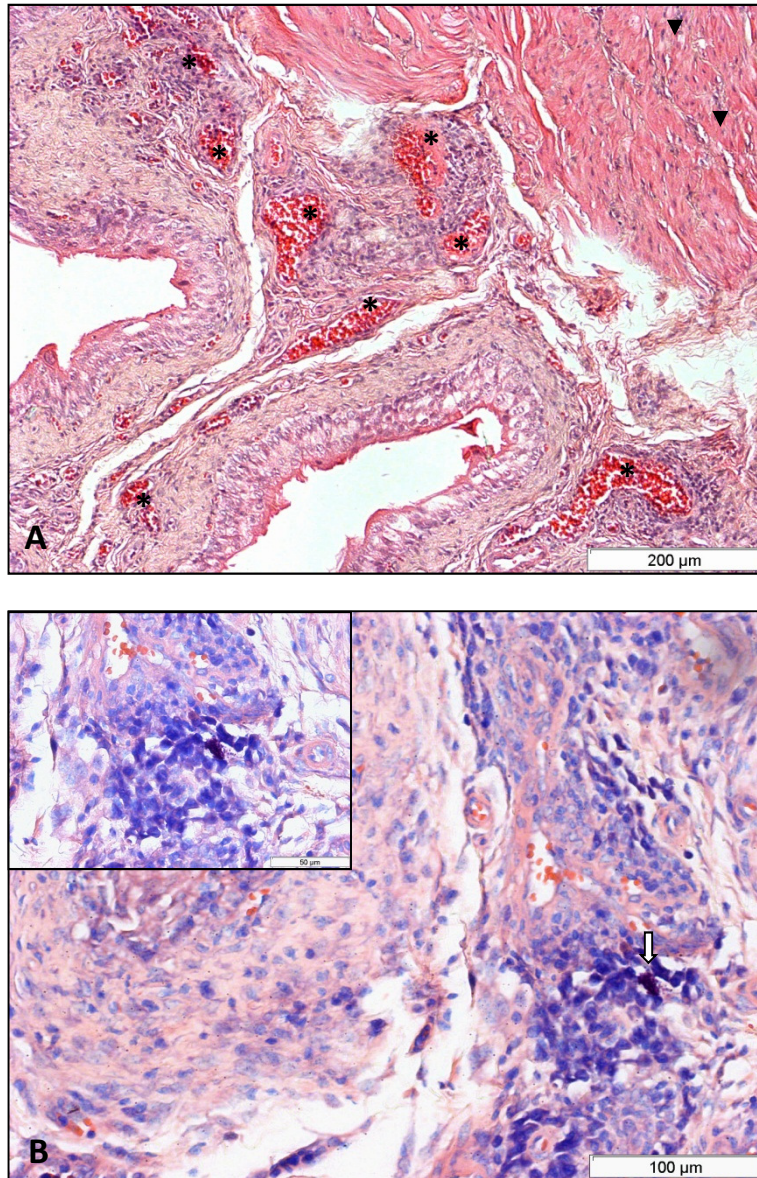


Figura 5.56 – Histopatologia da bexiga dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Em “A” bexiga com congestão (asteriscos) e discreto infiltrado (cabeça de seta) entre as fibras musculares (HE); em “B” presença de mastócitos (seta) íntegros e degranulados (Giemsa).



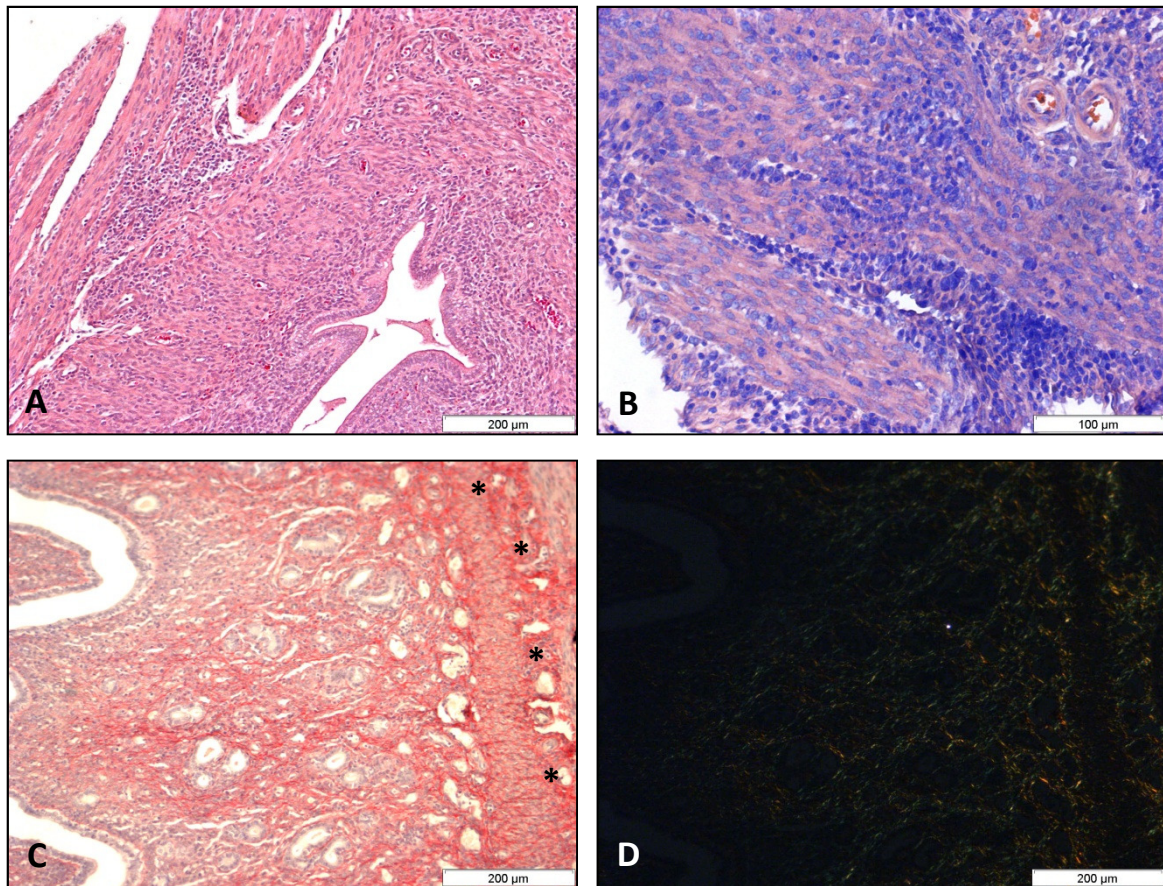


Figura 5.57 – Histopatologia do útero dos animais infectados por via intragástrica com formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, 33 dias após a infecção. Útero com do infiltrado linfocitário na camada muscular, em “A” (HE) e “B” (Giemsa); em “C”, sem polarização, presença de neofibração (asteriscos) e redistribuição das fibras do complexo colágeno, em “D”, com polarização (marcadas em amarelo) (Picrosirius red).



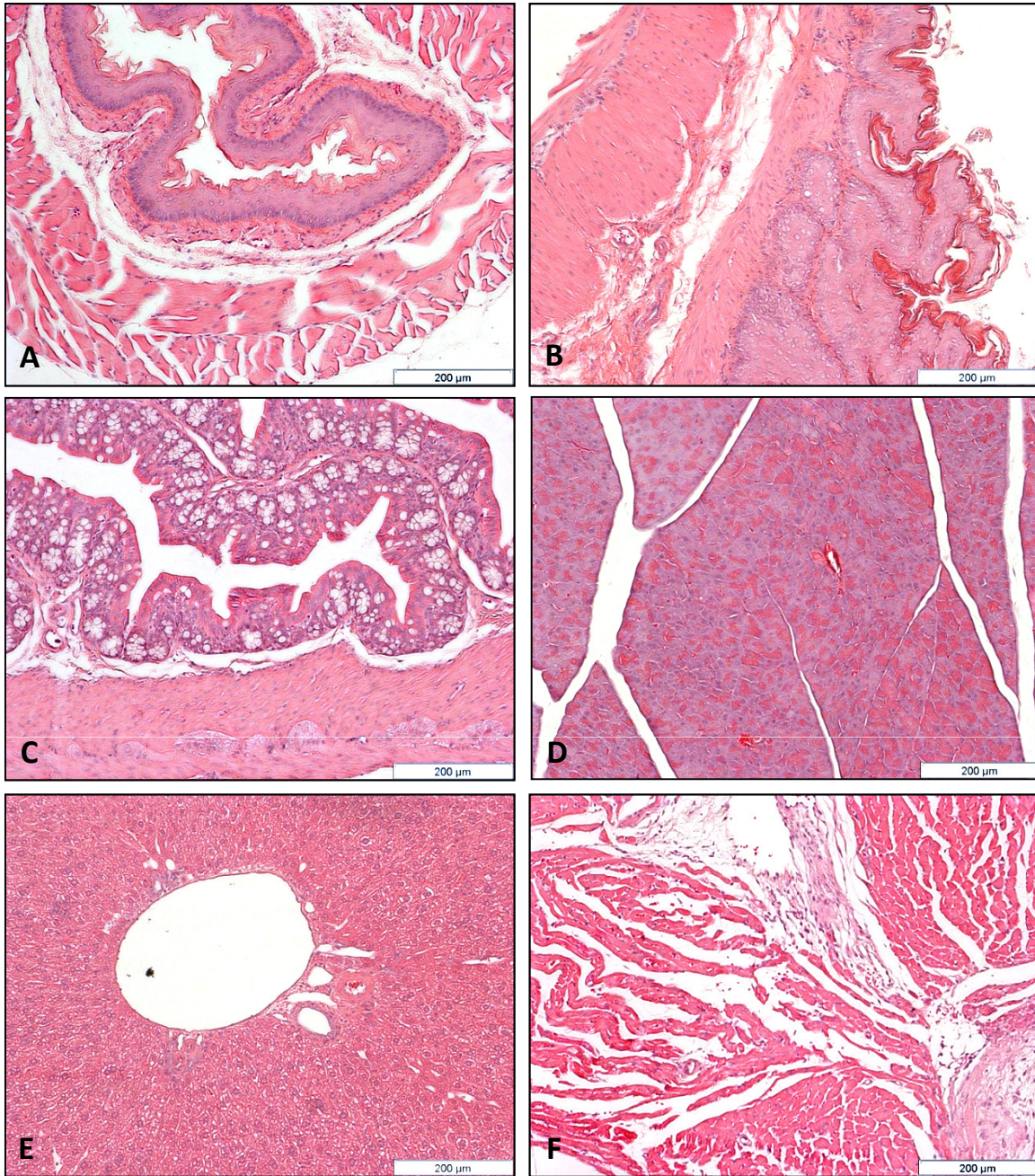


Figura 5.58 - Histologia dos animais controles não infectados. Em “A” esôfago; em “B” estômago; em “C” intestino; em “D” pâncreas; em “E” fígado e em “F” coração (HE). Todos os órgãos mostraram aspecto normal.

Tabela 5.1 – Titulação de anticorpos (IgM e IgG) anti-*T. cruzi*, pela técnica de imunofluorescência indireta no soro de camundongos infectados pela via IP ou IG..

<b>Grupo</b>	<b>Dias de infecção</b>	<b>Títulos IgM</b>	<b>Títulos IgG</b>
Infectados Via IP	11 <sup>º</sup>	1/40	1/40
	18 <sup>º</sup>	1/80	1/160
Infectados Via IG	26 <sup>º</sup>	1/80	1/320
	33 <sup>º</sup>	1/160	1/640



### **5.8.1. Baço**

Nos animais infectados pela via IP aos 11 dias de infecção a análise do baço mostrou diminuição do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e um discreto aumento de CD4<sup>+</sup>. Aos 18 dias pós-infecção foi registrado um aumento de 50% na quantidade dessas subpopulações celulares em comparação com os números obtidos pelas análises nos animais do grupo controle.

Pela via de infecção IG aos 26 seis dias, a análise do baço mostrou aproximadamente o mesmo número de células CD4<sup>+</sup> que o observado no grupo controle. A quantidade de células CD8<sup>+</sup> estava 68% maior que nos controles e aproximadamente 80 e 40% a mais que os animais inoculados pela via IP nos dois tempos de análise. As células duplo positivas apresentaram um aumento de aproximadamente 65% em relação ao controle e aos animais inoculados pela via IP. Aos 33 dias de infecção as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentaram perfis semelhantes aos observados nos animais com 26 dias de infecção. Uma redução de células duplo positivas foi observada quando comparado ao 26º dia de infecção. Entretanto, ainda assim, mostraram-se mais elevadas que as observadas no grupo controle e nos animais infectados pela via IP aos 11 dias de infecção (Tabela 5.2 e Figura 5.59).

### **5.8.2. Linfonodos mesentéricos**

Em linfonodo mesentérico a avaliação aos 11 dias de infecção, mostrou uma redução nas subpopulações celulares analisadas (linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) quando comparadas ao grupo controle. Nenhuma alteração na subpopulação de células dupla positivas foi verificada neste ponto. Aos 18 dias de infecção os LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentavam valores aproximados aos do controle, contudo um discreto aumento das células duplo positivas foi observado.

Nos camundongos infectados por via IG uma redução (41%) de células CD4<sup>+</sup> e manutenção dos valores de CD8<sup>+</sup> foram vistas aos 26 dias. O perfil de células duplo positivas foi semelhante ao apresentado pelo grupo controle. Aos trinta e três dias de infecção também foi observada uma redução do número de células CD4<sup>+</sup>, porém menor do que a apresentada aos 26 dias. As células CD8<sup>+</sup> mostraram o mesmo perfil observado pelos camundongos do grupo controle, infectados via IP com 18 dias e pela via IG com 26 dias de infecção. As células duplo positivas

apresentaram-se em quantidades semelhantes às vistas no grupo controle (Tabela 5.3 e Figura 5.59).

### **5.8.3. Sangue**

A análise do perfil de linfócitos T no sangue dos animais inoculados pela via IP 11 dias após a infecção não mostrou nenhuma alteração no número de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. As células duplo positivas mostraram-se praticamente iguais ao grupo controle. No dia 18 após a infecção não houve nenhuma alteração do número das células CD4<sup>+</sup>, entretanto um discreto aumento de células CD8<sup>+</sup> e de duplas positivas foi observado.

Vinte e seis dias após a infecção pela via IG observou-se uma redução de 62% de células CD4<sup>+</sup> e um aumento de 75% no número de células CD8<sup>+</sup>, além do aumento das células duplo positivas, quando comparadas ao controle. Com 33 dias de infecção a quantidade de células CD8<sup>+</sup> e duplas positivas foi igual a observada aos 26 dias. Por outro lado, a quantidade de células T CD4<sup>+</sup> estava mais elevada em relação a este grupo. O perfil de redução de LT CD4<sup>+</sup> foi observado em ambos os tempos quando comparado ao grupo controle (Tabela 5.4 e Figura 5.59).

### **5.9. PCR**

A PCR foi realizada para detectar a presença de DNA do *T. cruzi* nas amostras de esôfago, estômago e intestino de camundongos infectados pelas vias IP e IG em todos os pontos de necropsia. Para a verificação da qualidade da reação de PCR foi realizada a amplificação de um gene endógeno - GAPDH em três amostras escolhidas aleatoriamente. As amostras testadas apresentaram a banda correspondente a 171 pares de base, referente ao fragmento amplificado para o endogene (Figura 5.60), demonstrando que a reação ocorreu satisfatoriamente.

A PCR para a detecção do parasito demonstrou que todas as amostras apresentaram uma banda referente a um fragmento de 330 pares de base correspondente à presença do DNA do parasito nos três órgãos testados tanto nos animais infectados por via IP, no 11<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> (Figura 5.61) dias pós-infecção, quanto nos infectados por via IG, no 26<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> dias pós-infecção (Figura 5.62).

Tabela 5.2 - Análise do perfil de linfócitos T nos baços dos animais inoculados com formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, pela via IP e IG.

BAÇO					
Subpopulações celulares	Grupo Controle	Infecção via IP		Infecção via IG	
		11 <sup>o</sup>	18 <sup>o</sup>	26 <sup>o</sup>	33 <sup>o</sup>
<b>CD4+</b>	14,9% ± 2%	17,22% ± 2%	32,61% ± 0%**	12,51% ± 1%	12,29% ± 0%
<b>CD8+</b>	6,38% ± 1%	4,08% ± 0%	12,43% ± 0%	19,51% ± 1%**	20,92% ± 5%**
<b>CD4+/CD8+</b>	0,18% ± 0%	0,20% ± 0%	1,10% ± 0%	3,05% ± 1%	1,49% ± 0%

\*\* p<0,001 - \*p<0,05

Tabela 5.3 - Análise do perfil de linfócitos T nos linfonodos dos animais inoculados pela via IP ou IG com formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005.

LINFONODO					
Subpopulações celulares	Grupo Controle	Infecção via IP		Infecção via IG	
		11 <sup>o</sup>	18 <sup>o</sup>	26 <sup>o</sup>	33 <sup>o</sup>
<b>CD4+</b>	34,39% ± 3%	25,25% ± 0%*	38,05% ± 0%	20,51% ± 4%**	26,45% ± 1%*
<b>CD8+</b>	15,13% ± 2%	10,65% ± 1%	15,62% ± 0%	14,01% ± 2%	15,77% ± 2%
<b>CD4+/CD8+</b>	0,58% ± 0%	0,37% ± 0%	0,97% ± 0%	1,66% ± 1%	0,62% ± 0%

\*p<0,01 \*\* p< 0,001

Tabela 5.4 - Análise do perfil de linfócitos T no sangue dos animais inoculados pela via IP ou IG com formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005.

SANGUE					
Subpopulações celulares	Grupo Controle	Infecção via IP		Infecção via IG	
		11 <sup>o</sup>	18 <sup>o</sup>	26 <sup>o</sup>	33 <sup>o</sup>
<b>CD4+</b>	29,4% ± 3%	33,62% ± 3%	27,76% ± 0%	10,38% ± 0%*	18,92% ± 5%
<b>CD8+</b>	11,4% ± 2%	13,30% ± 5%	19,65% ± 0%	44,69% ± 0%**	48,11% ± 9%**
<b>CD4+/CD8+</b>	1,92% ± 1%	3,55% ± 2%	2,40% ± 0%	3,63% ± 0%	2,70% ± 0%

\*\* p<0,001 \*p<0,05

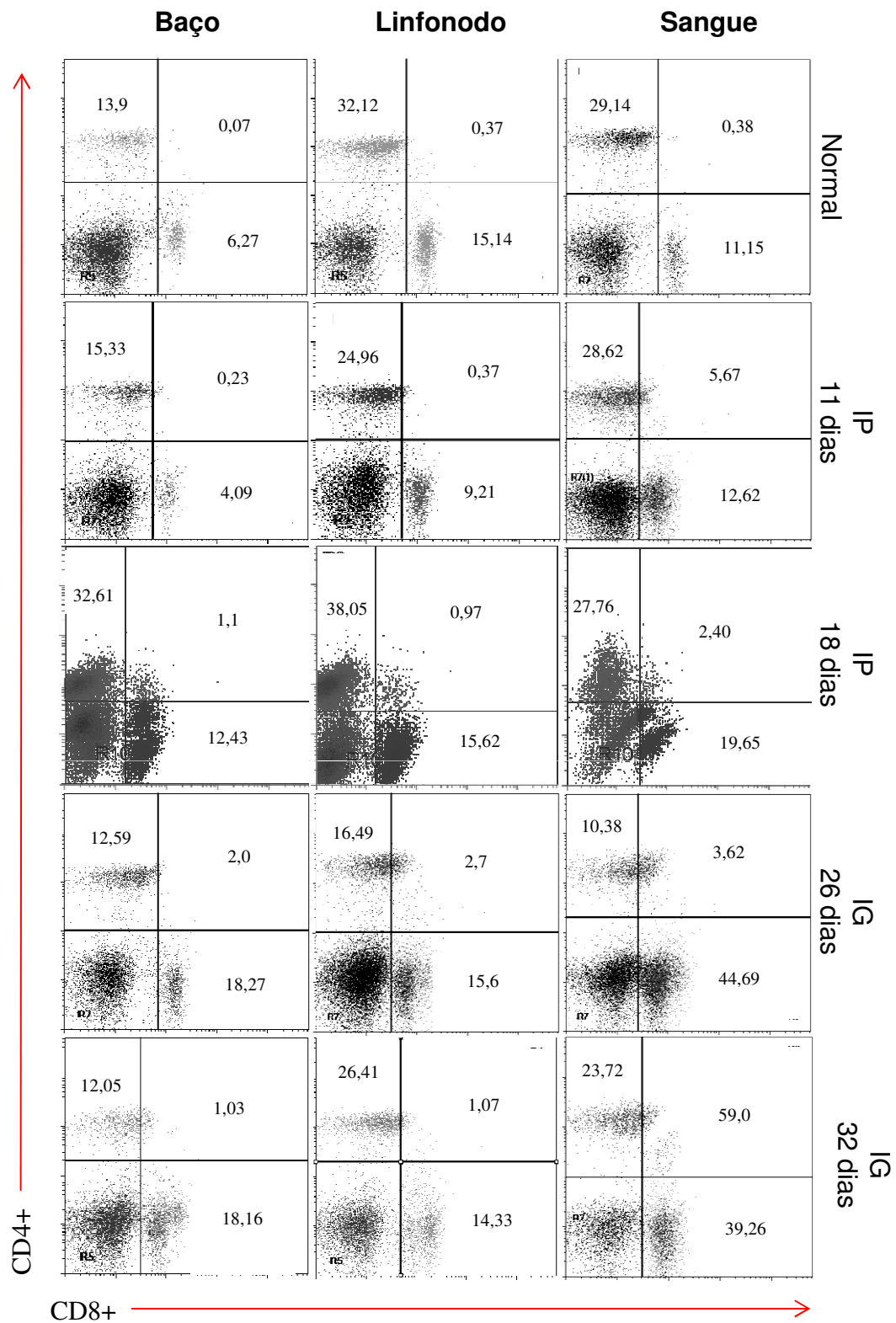


Figura 5.59 – Dot-Plot das análises dos perfis de linfócitos T dos animais do grupo controle e animais inoculados pela via IP ou IG, com formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005.

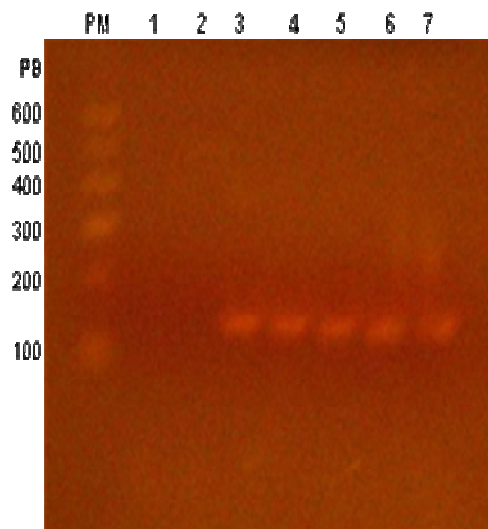


Figura 5.60 – Visualização em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR do endogene GAPDH (PM- Peso Molecular; 1- Controle negativo; 2- Controle negativo; 3- Controle positivo; 4- Esôfago controle, não infectado, 5- Esôfago infectado IP 18 dias, 6- Estômago infectado IG 26 dias, 7- Intestino IG 33 dias).



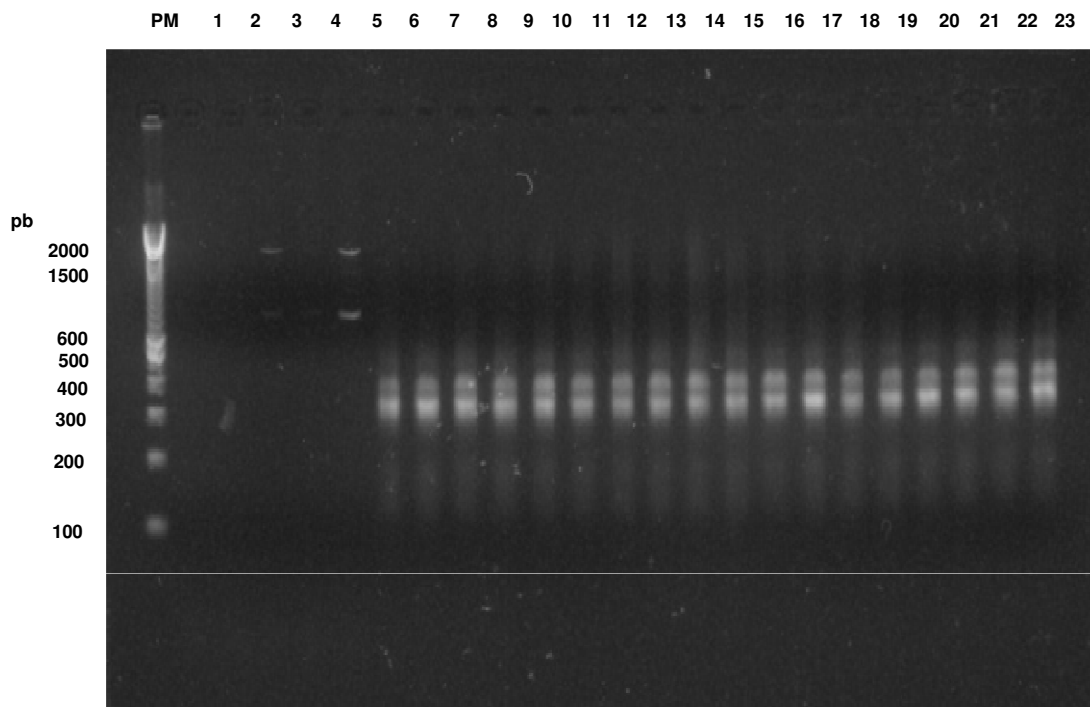


Figura 5.61 – Visualização em gel de agarose a 2% do DNA do parasito nos diferentes órgãos dos animais do grupo controle e dos animais infectados pela via IP. PM – Peso Molecular; 1 e 2 – Controles negativos (referentes as figuras 57 e 58); 3 a 5 grupo controle – (3- Esôfago; 4- Estômago; 5- Intestino; 6 a 15 – órgãos dos animais infectados, 11 dias após a infecção: 6- Esôfago camundongo 1 (C1); 7- Estômago (C1); 8- Intestino (C1); 9- Esôfago (C2); 10- Estômago (C2); 11- Intestino (C2); 12- Esôfago (C3); 13- Estômago (C3); 14-intestino (C3); 15 a 23 - órgãos dos animais infectados, 18 dias após a infecção: 15- Esôfago (C1); 16- Estômago (C1) 17- Intestino (C1); 18- Esôfago (C2); 19- Estômago (C2); 20- Intestino (C2); 21- Esôfago (C3); 22-Estômago (C3); 23- Intestino (C3).

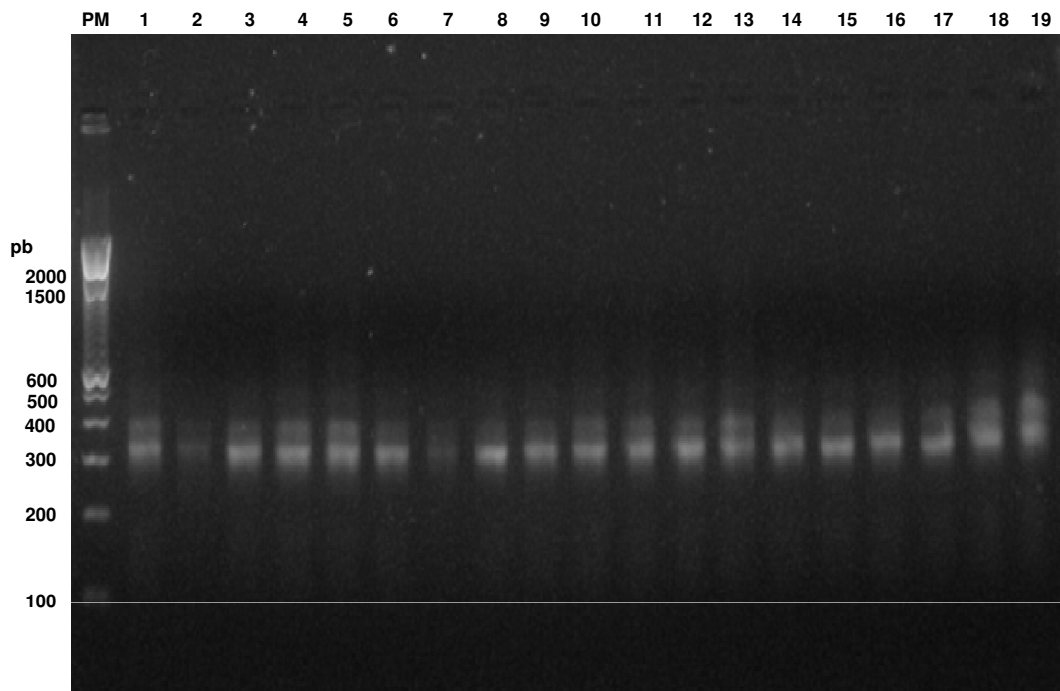


Figura 5.62: Visualização em gel de agarose a 2% do DNA do parasito nos diferentes órgãos dos animais do grupo controle e dos infectados pela via IG. PM - (Peso Molecular); 1 a 9 – órgãos dos animais infectados, 26 dias após a infecção. 1- Esôfago do camundongo 1 (C1); 2- Estômago (C1); 3- Intestino (C1); 4- Esôfago (C2); 5- Estômago (C2); 6- Intestino (C2); 7- Esôfago (C3); 8- Estômago (C3); 9- Intestino (C3); 10 a 18 – órgãos dos animais infectados, 33 dias após a infecção; 10- Esôfago (C1); 11- Estômago (C1); 12- Intestino (C1); 13- Esôfago (C2); 14- Estômago (C2); 15- Intestino (C2); 16- Esôfago (C3); 17- Estômago (C3); 18- Intestino (C3); 19- Controle positivo (referente as figuras 57 e 58)

## **6. DISCUSSÃO**

---

Desde a descoberta da doença de Chagas vários estudos sobre a patogênese da doença vêm sendo desenvolvidos. Em 1911, Gaspar Vianna relatou que o *T. cruzi* penetra nas células do hospedeiro e se multiplica sob a forma de amastigota formando pseudocistos que se rompem e dão origem a uma resposta inflamatória que cicatrizam como fibrose. Contudo, passados mais de 100 anos da descoberta desta doença muitos pontos sobre os aspectos patológicos continuam obscuros. O único achado que continua incontestável é o relato acima descrito por Gaspar Vianna, em 1911 (Coura e Borges, 2012).

É sabido que a infecção pelo *T. cruzi*, assim como em outras infecções parasitárias, acontece através da interação entre fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro. Dentre esses fatores podemos citar como exemplo, a linhagem do animal, a via de infecção, a cepa, a forma evolutiva e as condições de manutenção do parasito utilizado para a infecção, assim como o tamanho do inoculo e o número de passagens para manutenção do mesmo (Souza, 1999).

A via de infecção também é considerada um fator importante para a ocorrência da doença. Doenças parasitárias de origem alimentar são geralmente pouco consideradas, porém tornaram-se mais comuns ao longo dos anos (Dorny *et al.*, 2009). Dentre elas destacam-se os casos de doença de Chagas aguda proveniente dos surtos frequentemente observados pela ingestão de alimentos contaminados pelo parasito (Yoshida *et al.*, 2011). A transmissão oral do *T. cruzi* tem um caráter habitual primitivo no ciclo enzoótico pela ingestão de vetores infectados, por mamíferos suscetíveis (WHO, 2002).

Em 2005 um surto oral de doença de Chagas, ocorrido em Santa Catarina atingiu inúmeras pessoas de uma mesma localidade. Diferentes genótipos dos parasitos foram observados em amostras isoladas dos pacientes, de mamíferos silvestres (*Didelphis aurita* e *Didelphis marsupialis*) e do vetor (*Triatoma tibiamaculata*) encontrados na região, causando, muitas vezes, infecções mistas (Andrade, 2011). Um destes isolados, denominado SC2005 foi utilizado no presente trabalho, o qual foi caracterizado utilizando-se a técnica de PCR multiplex. Os resultados mostraram que os parasitos deste isolado utilizado pertencem ao grupo TCII, o qual está envolvido predominantemente em ciclos domésticos da doença de

Chagas na região sudeste e centrais da América do Sul (Fernandes *et al.*, 1999; Zingales *et al.*, 1999; Lisboa *et al.*, 2007).

No presente estudo camundongos *outbred* foram inoculados com *T. cruzi* utilizando-se as vias intragástrica e intraperitoneal de infecção. Após a realização de protocolos pilotos de infecção “*in vivo*” constatamos uma baixa metaciclogênese no isolado SC2005. Sendo assim, como essa característica dificultaria a obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas para infecção dos animais, optamos pelo uso de formas tripomastigotas derivadas de cultura de células para a realização do nosso estudo.

Para definição do inoculo de infecção nos baseamos nos trabalho de Hoft *et al.*, (1996) que utilizando camundongos BALB/c infectados com baixas dose de formas tripomastigotas provenientes de fezes de barbeiro e, apesar de observarem infecção, não observaram alterações inflamatórias ou presença de parasitos no sistema digestório dos animais. Portanto, estes dados e os resultados obtidos com nossos experimentospilotos, com camundongos suíços, nos auxiliaram a optar pela infecção com altas doses de parasitos.

As formas tripomastigotas de cultura vêm sendo usadas em experimentos de infecção pelo *T. cruzi* tanto *in vivo* usando a via intraperitoneal quanto *in vitro*. Taniwaki *et al.* (2007) infectaram BALB/c e *Calomys callosus* utilizando estas formas parasitárias e observaram infecção de células do músculo cardíaco associada a infiltrado inflamatório. Posteriormente Yoshida *et al.* (2012) mostraram que as moléculas de superfície das formas tripomastigotas de cultura que se ligam às células do hospedeiro iniciando o processo de invasão, como por exemplo as glicoproteínas da família gp85, estão implicadas na internalização do parasito.

Vários métodos foram utilizados para a avaliação da infecção dos camundongos no nosso estudo como: parasitemia, contagem de leucócitos totais e específicos, índice tímico e esplênico, dosagem de anticorpo (IgG e IgM), análise histopatológica, PCR, citometria de fluxo e mortalidade.

Parasitemia com picos irregulares entre os dias 12 e 20 após a infecção, quando a taxa máxima de mortalidade é atingida, são padrões de isolados pertencentes ao grupo biodema do tipo II. Esta classificação passou por uma revisão



e o biodema do tipo II foi inserido em um grande grupo chamado *T. cruzi* II (TcII) (Anonymous, 1999).

Avaliando a parasitemia dos camundongos dos nossos experimentos, a partir do 3º dia de infecção, nos inoculados IP, e a partir do 10º nos animais inoculados IG observamos um padrão de picos irregulares como descrito na literatura para os parasitos pertencente ao TcII, entretanto, houve uma variação dos dias destes picos provavelmente em função da via de inoculação e do tamanho do inoculo utilizados no presente trabalho.

Os dois grupos, animais infectados pela via IP e IG, apresentaram curvas parasitêmicas com picos em dias alternados, contudo os animais inoculados pela via IP além de apresentarem parasitemia mais precoce que os inoculados pela via IG, tiveram uma quantidade níveis maiores de parasitos no sangue que estes. Os dois grupos de animais apresentaram duplo pico parasitêmico, com o pico inicial baixo, característico do biodema do tipo II e um pico tardio que corresponde ao padrão parasitêmico do biodema tipo III. Achados similares foram observados por Andrade *et al.*, (2011) em experimentos com camundongos suíços inoculados com outros isolados, também do biodema do tipo II, provenientes do surto de Santa Catarina em 2005. Estes autores sugeriram a existência de uma infecção mista neste surto. Entretanto, apesar de nossos resultados mostrarem duplo pico parasitêmico o isolado utilizado foi classificado apenas como TcII.

A mortalidade dos animais também foi mais precoce em menor número, nos animais infectados pela via IP. Nossos resultados corroboram os achados de Camandaroba *et al.* (2002) que utilizaram camundongos suíços, infectados com a cepa Peruana, também caracterizada como TcII. A curva parasitêmica, descrita por estes autores, foi menor que a apresentada no presente estudo, provavelmente porque o inoculo utilizado na infecção tenha sido menor que o utilizado nos nossos experimentos. Segundo Dias (1982) e Bahia *et al.* (2002) o inoculo de infecção e/ou a cepa do parasito, assim como a fonte do inoculo e a via de infecção influenciam significativamente na evolução da doença. Andrade *et al.* (2011) em estudos com outros isolados do surto de SC 2005 observaram padrões variados de mortalidade e mesmo outros isolados pertencentes ao grupo TcII não mostraram o mesmo padrão de infecção que o observado no nosso estudo.

Segundo Tribullatti *et al.* (2005) moléculas produzidas na resposta imunológica durante a infecção pelo *T. cruzi*, como quimiocinas, anticorpos, óxido nítrico, citocinas pró e anti-inflamatórias, como IFN-gama, TNF-alfa, IL-10, IL-12, por exemplo, além de moléculas produzidas pelo próprio parasito, levam a alterações nos parâmetros hematológicos dos animais infectados. No presente estudo foi observada uma relação entre a parasitemia e as alterações hematológicas apresentadas pelos animais infectados. A análise dos leucócitos totais dos animais infectados pela via IP mostrou uma leucopenia no início da infecção, quando a parasitemia também se mostrava baixa. Entretanto, os níveis de leucócitos atingiram a normalidade quando no 10º dia após a infecção registrou-se um pico de parasitemia. A partir deste ponto, quando a parasitemia baixou, os níveis de leucócitos atingiram valores altos, exceto no 13º dia após a infecção, quando um novo pico de parasitemia foi observado. Neste ponto os leucócitos voltaram aos valores normais. Este mesmo padrão foi observado quando avaliamos os linfócitos isoladamente. Uma correlação significativa entre a parasitemia e a contagem de leucócitos totais, foi observada no nosso estudo, principalmente por conta da contagem de linfócitos e neutrófilos. Guedes *et al.*, (2012) também observaram uma relação, embora não significativa, entre os números de células sanguíneas e a parasitemia de cães infectados com tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* pela via IP. Entretanto, estes autores descreveram, durante o pico da parasitemia, uma leucocitose com o aumento das populações de linfócitos e monócitos, enquanto o número de eosinófilos e basófilos não sofreram alterações. Outros autores mostraram padrões de leucopenia durante o pico de parasitemia em camundongos infectados pela via subcutânea com *T. cruzi*, cepa CL (Marcondes *et al.*, 2000).

No nosso estudo, os animais infectados pela via IG mostraram um padrão de leucocitose a partir do maior pico de parasitemia, o qual permaneceu até o final do experimento. As populações de linfócitos e neutrófilos se apresentaram elevadas neste momento. Uma correlação significativa foi observada entre a parasitemia e a contagem de monócitos, onde um aumento desta população é observado no momento do maior pico da parasitemia. Indicando um importante papel da resposta imune do hospedeiro contra a presença do parasito. Esses achados se assemelham

aos descritos por Guedes *et al.*, (2012), exceto que estes não observaram significância na população de monócitos.

A população de eosinófilos se mostrou reduzida em alguns momentos da infecção independente da via de infecção utilizada. De acordo com Valent *et al.*, (2012) esta redução pode ser explicada, provavelmente, pela ação de citocinas responsáveis pelo controle do parasito e recrutamento de leucócitos durante a infecção, como IFN-gama, TNF-alfa, IL-10 e IL-12, as quais desempenham um papel inibitório sobre as populações de eosinófilos. Os mesmos padrões de eosinofilia foram observados por Quijano-Hernández *et al.*, (2012) em estudos com cães infectados com *T. cruzi* pela via IP.

Os órgãos linfóides exercem um importante papel na imunidade contra o *T. cruzi*. Estudos mostram uma atrofia tímica associada ao aumento de glicocorticoides circulantes observado na infecção pelo *T. cruzi*, diretamente relacionado às desordens observadas no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Lepletier *et al.*, 2012). Nossos resultados avaliando o índice tímico mostraram uma discreta diminuição do peso deste órgão somente nos animais inoculados pela via IP. Ao contrário, os animais infectados pela via IG tiveram aumento do peso do timo pequeno. Entretanto, ambas as variações não se mostraram significativas como a observada por outros autores (De Meis *et al.*, 2012). Por outro lado, a avaliação do índice esplênico mostrou um aumento significativo de peso deste órgão em ambos os grupos de animais infectados. Isto se justifica pela observação de centros germinativos ativados nestes órgãos. Segundo De Meis *et al.*, (2009) o aumento da celularidade no baço é consequência da ativação e expansão de linfócitos T e B. Tem sido mostrado que este órgão desempenha um papel importante no desenvolvimento da resposta imunológica contra protozoários parasitos (Maioli, *et al.*, 2011).

A infecção pela via oral e IG se inicia com lesões no local de entrada causadas pelo *T. cruzi*. Infiltrados inflamatórios, compostos por neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares, associados ao parasito levam a uma dilatação vascular, congestão e edema na mucosa digestiva. A propagação da infecção ocorre concomitantemente pela via linfática, observando-se linfadenopatia e inflamação do mesentério, e pela circulação sanguínea, através do sistema porta. Inicialmente são observadas lesões

no fígado e mais tarde o acometimento do coração (Dias-Ungría e Bracho, 1970). A partir deste ponto, a evolução da doença de Chagas acontece semelhantemente a observada pela transmissão vetorial, no entanto, com um período de incubação maior, que pode variar de acordo com a cepa e inóculo utilizados (Camandaroba *et al.*, 2002, Diaz-Ungría, 1968).

A infecção pelo *T. cruzi* no modelo murino reproduz muitas das alterações causadas pela doença de Chagas em humanos, como por exemplo, distúrbios na condução de impulsos elétricos, infiltrados inflamatórios, dano cardíaco e fibroses (Meuser-Batista *et al.*, 2011). O padrão dos achados histopatológicos em infecções com cepas de *T. cruzi* classificadas como TcII mostra lesões associadas à manifestações cardíacas, megaesôfago e megacólon (Zingales *et al.*, 2012). A análise histopatológica dos animais no presente estudo mostrou a presença de infiltrados inflamatórios composto predominantemente de células mononucleares localizados preferencialmente nas camadas musculares dos órgãos analisados, normalmente associados à redistribuição e neoformação de fibras do sistema colágeno. Ninhos de parasitos, quando observados, também se localizavam nestas camadas. Um padrão miotrópico é característico de cepas pertencentes tanto ao biotopo tipo II, quanto do biotopo tipo III (Zingales *et al.*, 2012). Infiltrados inflamatórios periductais no fígado foram observados em todos os animais do nosso estudo. Segundo Dias-Ungría e Bracho (1970) estes infiltrados se justificam uma vez que a infecção causada pelo *T. cruzi* se propaga, também, pela circulação sanguínea, via sistema porta.

Como descrito por diversos autores animais infectados pelo *T. cruzi* apresentam células inflamatórias mononucleares e parasitos no coração. A intensidade desta infecção varia de acordo com o inóculo, a cepa do parasito e a via de infecção utilizada em cada experimento (Engman e Leon, 2002; Camandaroba *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2011; Quijano-Hernandez *et al.*, 2012). No presente estudo essa variação foi observada nos animais independente da via de infecção utilizada. Observou-se que os animais infectados por via IG apresentaram um intenso infiltrado mononuclear e poucos ninhos de parasitos. Já os animais infectados pela via IP mostraram um infiltrado inflamatório moderado e um aumento do parasitismo, com maior presença de ninhos nos tecidos.

Quanto à localização de infiltrados inflamatórios e ninhos do parasito no coração, os resultados obtidos em nossos experimentos corroboram com estudos realizados em cães inoculados pela via IP utilizando doses que variavam entre  $2 \times 10^3$  e  $2 \times 10^5$  de *T. cruzi*. Um mesmo padrão com presença de infiltrados inflamatório mais severo no átrio e mais ninhos de amastigotas no ventrículo dos animais infectados com doses altas e médias do parasito (Quijano-Hernandez *et al.*, 2012) foi observado em ambas as vias de infecção. Segundo Quijano-Hernandez *et al.*, (2012) o parasitismo se inicia no átrio seguido de uma resposta inflamatória eficiente contra o *T. cruzi* e um posterior acometimento do ventrículo. Este mesmo padrão foi observado no nosso trabalho onde todos os animais estudados, independente da via e tempos de infecção. Os animais mostraram intenso infiltrado inflamatório no átrio, maior que o observado no ventrículo, o qual mostrou a presença de parasito, com exceção dos animais necropsiados no 32º dia de infecção quando o ventrículo mostrou um aumento do infiltrado inflamatório e diminuição do número de parasitos.

Segundo os relatos de Prado (2011) as alterações presentes no coração são preferencialmente de localização intramiocardial causadas por persistência do parasito, autoimunidade e envolvimento microvascular. No nosso estudo, as lesões observadas no coração dos animais infectados estavam preferencialmente no interior do miocárdio, alcançando regiões do endocárdio e pericárdio nos camundongos infectados por via IG. A presença de parasitos, assim como, de áreas de infiltrados inflamatórios, sem a presença destes foi observada em todos os animais.

Um estudo desenvolvido por Meuser-Batista *et al.*, (2011) utilizando linhagens de camundongos “inbred”, infectados pela via IP com a cepa Y de *T. cruzi*, mostrou que os mastócitos são importantes no controle da infecção aguda causada por este parasito. Segundo Wedermeyer *et al.* (2000) este tipo celular desempenha um papel significativo em órgãos afetados durante infecções parasitárias, incluindo remodelação tecidual. O infiltrado inflamatório presente nos diversos órgãos e no tecido adiposo, analisados no nosso estudo, estavam associados à presença de mastócitos em alguns animais. A presença de infiltrados inflamatórios mononucleares e de mastócitos nos tecidos e órgãos dos animais infectados apontam para uma grande atividade do sistema imunológico nestes animais. A grande ativação dos órgãos linfóides observada nos animais infectados contribui



para desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva contra o agente patogênico.

De Meis *et al.* (2009) e Morrot *et al.* (2011) relataram a expansão do baço e linfonodos subcutâneos durante a infecção pelo *T. cruzi*, devido ao aumento da ativação de linfócitos T e B, aumento da proliferação de linfócitos e ativação policlonal. Em nosso estudo observamos a formação e aumento de centros germinativos, além de uma grande circulação celular em linfonodos, polpa branca do baço e placas de Peyer no intestino. Além de grande atividade celular, foram encontrados também nos linfonodos de camundongos infectados pela via IG, aos 33 dias de infecção, megacariócitos e plasmocitogênese centro germinativo independente, sugerindo a ocorrência de hematopoiese extramedular neste órgão.

No fígado dos animais infectados por ambas as vias também foi observada a presença de megacariócitos e células imaturas, algumas vezes em apoptose, sugerindo também a ocorrência de hematopoiese extramedular. Este processo ocorre, por exemplo, quando existe uma destruição dos eritrócitos, anemia hemolítica ou mielofibrose. Processos de hematopoiese extramedular no fígado, baço, linfonodo e rim têm sido relatados na literatura (Ahuja *et al.*, 2010; Singhal *et al.*, 2011). Na infecção aguda pelo *T. cruzi* uma supressão da medula óssea com um significativo decréscimo no número de megacarioblastos, eritoblastos, mieloblastos e monoblastos foram descritas por Marcondes *et al.* (2000), além de severa anemia. Guedes *et al.* (2012) também observaram níveis de anemia relacionados com picos na parasitemia. Esta redução das células vermelhas, descritas durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*, contribui para a hipótese de ocorrência de hematopoiese extramedular no linfonodo e fígado dos animais infectados.

Observamos que a infecção pelo *T. cruzi* também afetou gravemente o tecido adiposo dos animais e reportamos a presença de ninhos do parasito neste tecido aos 33 dias da infecção oral. A presença deste parasito no tecido adiposo é relatada desde 1970, quando Shoemaker *et al.*, (1970) infectaram com *T. cruzi*, camundongos C3H pela via subcutânea, encontrando uma grande concentração de células inflamatórias e parasitos neste tecido. Segundo Tanowitz *et al.* (2011) a presença do parasito induz uma alta inflamação deste tecido, gerada inicialmente por um aumento da população de macrófagos e aumento de lipólise, levando a

liberação do parasito na circulação causando elevação da parasitemia. O processo de lipólise assim como a presença aumentada de macrófagos contribui para um influxo de células do sistema imunológico neste tecido (Kosteli *et al.*, 2010). É interessante notar que o tecido adiposo, próximo ao intestino dos camundongos infectados pela via IP mostrou-se mais afetado do que o observado nos camundongos infectados pela via IG. Este fato pode ser explicado pelo fato das formas tripomastigotas do *T. cruzi* alcançarem facilmente este tecido, quando inoculados pela via IP. A inflamação presente em alguns órgãos como a adrenal, o útero, e o ureter pode ter ocorrido pela continuidade do tecido adiposo próximo, que se mostrava sempre comprometido.

Nossos experimentos mostraram *milky spots* da região peritoneal ativadas durante a infecção em todos os animais infectados independente da via. Além disso, um grande número de células mielóides, linfócitos e macrófagos também foram encontrados. Nos camundongos infectados aos 33 dias, pela via IG, células mielóides maduras e imaturas foram descritas no *milky spot* da região peritoneal. Estas regiões são observadas ativadas também em infecções por outros parasitos, como o *Shistosoma sp*, onde os *milky spots* se apresentam todas as linhagens celulares com atividade hematopoiética (Panasco *et al.*, 2010).

A descrição inicial da doença de Chagas feita por Carlos Chagas demonstrou alterações ocorridas principalmente no coração e sistema digestório, os quais são exaustivamente estudados (Santos, *et al.*, 2004). Alterações nas gônadas, rins (Cabrine-Santos *et al.*, 2003), sistema nervoso central e glândulas endócrinas (Saldanha *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002) também foram documentadas. Entretanto, o comprometimento do pâncreas embora tenha sido descrito não é muito estudado (Santos, *et al.*, 2004). No presente estudo os animais infectados pela via IP, principalmente no 11º dia após a infecção, apresentaram uma severa pancreatite, com focos de necrose, principalmente nos acinos, que, possivelmente, ocasionou a morte destes animais entre o 13º e o 18º dias após a infecção. Também pode ser observada a presença de ninhos do *T. cruzi*. Já nos animais infectados pela via IG aos 26 dias de infecção, observou-se apenas uma pancreatite moderada associada à fibrose, sem a presença de parasitos. Estes dados corroboram com os descritos por Santos, *et al.* (2004) em hamsters infectados com *T. cruzi* pela via IP os quais desenvolveram um quadro de pancreatite envolvendo alterações nos acinos, ilhotas

e nervos, com atrofia, fibrose e infiltrado inflamatório mononuclear. Na doença de Chagas a ocorrência da pancreatite parece estar ligada com o parasitismo local, envolvendo liberação de enzimas pancreáticas devido à ruptura de células parasitadas (Corbett, *et al.*, 2002).

O acometimento do sistema nervoso central na doença de Chagas é relatado em indivíduos imunossuprimidos e crianças, No entanto, Silva *et al.* em 1999 em um experimento com camundongos C3H/HE infectados pela via IP, demonstraram a presença de intenso infiltrado inflamatório mononuclear no parênquima cerebral, meninge, plexo coróide, hipocampo, espaço perivascular e cerebelo, durante a fase aguda da doença. Já na fase crônica da infecção podem ser observados infiltrados inflamatórios discretos na meninge, plexo coróide e hipocampo. Em ambas as fases não se observaram a presença de antígenos do parasito associados ao infiltrado inflamatório, sugerindo mimetismo antigênico entre o *T. cruzi* e componentes neurais ou autoreatividade transitória. Nos camundongos infectados pela via IG, no nosso estudo, observamos a presença de pequenos infiltrados inflamatórios linfomonocitários localizados na meninge e ao redor de ductos no encéfalo, sem a observação da presença de parasitos nestes órgãos.

Inúmeras alterações ocorrem a nível celular, como resposta aos danos sofridos nos órgãos. Estas alterações são denominadas de remodelamento e envolve um alongamento celular, reorganização da matriz do tecido e morte celular (Opie *et al.*, 2006). A morte celular leva a um remodelamento do órgão por um tecido conectivo, formado principalmente por colágeno, sendo responsável pelo início de um processo de fibrose (Rassy *et al.*, 2000). Castro-Sesquen *et al.* (2013) demonstraram um aumento de deposição de colágenos no coração de cobaias infectadas pela via IP durante a infecção por *T. cruzi*. Este aumento foi observado no interstício do órgão e nos espaços perivasculares, próximos a infiltrados inflamatórios. Uma deposição de colágeno também foi observada próximo ao tecido adiposo epicárdico, associada a células inflamatórias. Nossos resultados mostraram uma redistribuição de colágeno associada aos infiltrados inflamatórios no útero, baço, fígado, coração, estômago, pâncreas, esôfago, intestino e bexiga, dos animais infectados, sugerindo uma alteração na conformação destas fibras devido à presença de células inflamatórias. Fibrose e formação de novas fibras do sistema colágeno também foram observadas, nos mesmos órgãos citados acima, além de tecido adiposo e tecido conjuntivo, sugerindo uma tentativa de reparação do tecido danificado.

O controle da doença de Chagas, desempenhado pelo sistema imunológico, é essencial para a minimização de danos ocorridos em órgãos acometidos durante a infecção, como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso (Tanowitz *et al.*, 1992; Brener e Gazzinelli, 1997). Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> atuam no controle do nível de parasitos no sangue e a depleção destas subpopulações leva conseqüentemente a uma exacerbação da inflamação no miocárdio e do parasitismo em camundongos infectados por *T. cruzi* (Tarleton *et al.*, 1994).

Em nosso experimento observamos uma flutuação na porcentagem de linfócitos nos tecidos analisados. A relação linfocitária no baço e no sangue dos animais infectados pela via IP não apresentou alteração na fase inicial da infecção, semelhante ao observado no grupo controle, não infectado. Com exceção da redução na proporção de células T CD4<sup>+</sup> no linfonodo mesentérico durante todo o experimento em todos os animais independente do grupo experimental, exceto no 18º dia de infecção. Por outro lado, notou-se um aumento das células TCD8<sup>+</sup> no fígado e no sangue indicando a proliferação destas células no fígado e redistribuição para locais de infecção. A variação das populações celulares em diferentes órgãos linfóides demonstra um perfil diferente de resposta em cada um desses compartimentos, levando a uma flutuação da população de linfócitos (Morrot *et al.*, 2012). As diferenças nas proporções celulares de linfócitos indicam papéis diferenciados das estruturas durante a infecção. Os esplenócitos estão envolvidos no controle da infecção assim como os linfonodos subcutâneos, provocando assim, uma grande ativação policlonal de linfócitos. Enquanto o timo e o linfonodo mesentérico se encontram diminuídos com depleção de linfócitos e aumento da taxa de apoptose. As variações observadas nas proporções de celularidade de linfonodos mesentéricos, subcutâneos, baço e timo, demonstram uma clara diferença regional nas taxas de expansão de linfócitos e apoptose de linfócitos T, que podem estar relacionadas à diferente produção de citocinas em cada região (de Meis *et al.*, 2009). Células CD8<sup>+</sup> são geradas em abundância na infecção pelo *T. cruzi* e parecem ser específicas contra este parasito. Estas células são enviadas para os locais de persistência do parasito para o controle da infecção e parecem estar envolvidas com o estabelecimento de uma memória estável em poucas semanas após a infecção (Padilla *et al.*, 2009).

Um aumento da celularidade e do tamanho dos linfonodos subcutâneos e do baço, causados pela exacerbação da ativação policlonal dos linfócitos T e B são descritos durante a infecção pelo *T. cruzi*. No entanto, pode ser observada também uma atrofia do timo e linfonodo mesentérico nesta infecção. Os subconjuntos dos tecidos linfóides durante esta infecção demonstram uma redistribuição e uma flutuação da população de linfócitos. Isto reflete em uma resposta específica e coordenada destes locais contra o parasito (Morrot *et al.*, 2012). Uma elevação nos níveis de subpopulações de linfócitos T duplo-positivas foi visto no baço e sangue dos camundongos infectados no nosso experimento. Este aumento foi observado por vários autores no sangue, timo, linfonodos subcutâneos e mesentéricos e fígado de camundongos e pacientes (Morrot *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2012; Giraldo *et al.*, 2011; de Meis *et al.*, 2009). Esses estudos revelam que as células duplo-positivas têm sua origem no timo, pela atrofia deste órgão, entretanto, a possibilidade de uma diferenciação periférica das células T, também é mencionada por Perez *et al.*, 2012.

A resposta humoral também foi avaliada para verificar possíveis alterações dos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* em função da via de inoculação utilizada. A imunidade humoral juntamente com a imunidade celular, deflagradas na presença do parasito, desempenham um papel de grande importância na resistência da infecção pelo *T. cruzi*, assim como no controle da parasitemia (Kretti e Brener, 1976). Uma imunidade protetora também induz a produção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (Maioli *et al.*, 2011).

Tem sido demonstrado que a capacidade do *T. cruzi* de colonizar células hospedeiras e assegurar sua sobrevivência depende de vários fatores. Na fase aguda o hospedeiro mamífero desenvolve uma resposta específica ao parasito que reduz eficazmente a carga parasitária nos tecidos e no sangue, para que possa sobreviver a esta fase. Estudos com isolados de *T. cruzi* TcV mostram a incapacidade destes parasitos em induzir uma resposta humoral (Ragone *et al.*, 2012). Entretanto, nossos estudos com o isolado SC2005, que é TcII, mostraram uma baixa resposta humoral no início da infecção com elevação dos títulos de anticorpos nos animais inoculados pela via IP no 18º dia de infecção e pela via IG durante todo o experimento. As diferenças entre os resultados observados nos diversos experimentos descritos na literatura estão relacionadas com o inoculo do parasito, via e idade do animal (Ragone *et al.*, 2012).



A introdução de técnicas mais sensíveis como o PCR, por exemplo, tem mostrado à alta frequência de antígenos de *T. cruzi* associado ao infiltrado inflamatório. No presente trabalho utilizamos esta ferramenta para demonstrar antígenos de *T. cruzi* no sistema digestório. Todos os órgãos analisados mostraram a presença do DNA do parasito, mesmo aqueles onde não se observou parasito na avaliação histopatológica.

A oportunidade de estudar a infecção experimental utilizando um isolado de *T. cruzi* proveniente de um surto oral de doença de Chagas possibilitou a descrição e a análise das alterações apresentadas por este modelo, permitindo melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção aguda humana. Diante dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos concluir que existem diferenças marcantes na infecção com o isolado SC2005 do *T. cruzi*, as quais são dependentes da via de infecção utilizada.

## **7. CONCLUSÕES**

---

1. Formas tripomastigostas de *Trypanosoma cruzi* derivadas de cultura de células, isolado SC2005, são capazes de promover infecção pelas vias intragástrica (IG) e intraperitoneal (IP) no modelo murino.
2. A parasitemia dos animais infectados pela via intragástrica foi menos intensa do que a apresentada pelos animais inoculados intraperitonealmente.
3. A mortalidade dos camundongos infectados pela via IP foi mais elevada que nos animais infectados pela via IG.
4. Houve uma relação entre os níveis de parasitos e a variação do número de células inflamatórias no sangue dos animais independente da via de infecção.
5. O isolado SC 2005 de *T. cruzi* apresenta, além de um padrão miotrópico, um tropismo pelo tecido adiposo.
6. Os órgãos colonizados pelo *T. cruzi* (isolado SC2005) foram os mesmos em ambos os grupos de animais inoculados, independente da via de infecção, porém com diferente intensidade de colonização.
7. A produção e reorganização do colágeno nos órgãos e tecidos dos animais infectados estão associadas à presença de infiltrados inflamatórios em ambos os grupos de animais infectados.
8. Ocorreu hematopoiese extramedular no fígado dos animais infectados por ambas as vias de inoculação.
9. Houve um aumento do número de mastócitos íntegros e desgranulados no estômago dos animais infectados em associação com focos de necrose, independente da via de inoculação.
10. Houve uma flutuação da população de linfócitos T no sangue, linfonodo mesentérico e baço dos animais infectados por ambas as vias de inoculação.
11. Altos títulos de anticorpos foram observados no sangue de animais infectados pela via IG.
12. O DNA do parasito estava presente nos órgãos do sistema digestório dos camundongos infectados, independente da via de infecção.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

Ahuja S, Grover G, Jha AK, Sodhi K, Bansal D, Dey P. Extramedullary hematopoiesis presented as solitary renal mass: a case report with review of literature. *Diagn Cytopathol.* 2011;39(6):435-7.

Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 May 25;100(2):163-172.

Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005 Oct;3(10):819-823.

Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, Almeida MC, Reis JN, Santos VC, Valadares HM, Reis MG, Macedo AM. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensus (2009). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(8):948-56.

Andrade, Z. Immunopathology of Chagas disease. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 1994; 94(1), 71–80.

Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999;94: 429–432.

Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Des Devel Ther.* 2010 Sep;24 (4):243-53.

Aras R, Veiga M, Gomes I, Mota G, Rodrigues B, Rabelo R, Guzman-Bracho C, Melo A. Prevalence of Chagas' disease in Mulungu do Morro northeastern Brazil. *Arq Bras Cardiol* 2002 May;78(5):441-443.

Bahia MT, Tafuri WL, Caliani MV, Veloso VM, Carneiro CM, Coelho GL, Lana M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(4):339-45.

Baptista CS, Vencio RZN, Abdala S, Carranza JC, Westenberger SJ, Silva MN, Pereira CAD, Galvao LMC, Gontijo ED, Chiari E, Sturm NR, Zingales B. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Dec;150(2):236-248.

Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Almeida de Souza JA, Sherlock IA. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980 74(1):84-90

Barros H., Beltrão M., Cerroni M.P., Roberto D., Freitas C., Pinto A.Y.N., Valente V.C., Valente S.A., Costa E.G. & Sobel J. Investigation of two outbreaks of



suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Pará State, Brazil, in 2007. *Tropical Doctor*. 2009;39:231-2.

Bastin P, Gull K . Assembly and function of complex flagellar structures illustrated by the paraflagellar rod of trypanosomes. *Protist*. 1999 Aug;150(2):113-23.

Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, Freire MS, de Araújo EG, Prazeres J, Grassi, M.F. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Neg Trop Dis* 2010;15;4(6):e711.

Bastos CJC, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, Freire MS, de Araujo EG, Prazeres J, Grassi MFR. Clinical Outcomes of Thirteen Patients with Acute Chagas Disease Acquired through Oral Transmission from Two Urban Outbreaks in Northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Jun;4(6).

Beltrao HDM, Cerroni MD, de Freitas DRC, Pinto AYD, Valente VD, Valente SA, Costa ED, Sobel J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. *Trop Doct* 2009 Oct;39(4):231-232.

Benchimol-Barbosa PR. Predictors of mortality in Chagas' disease: The impact of atrial fibrillation and oral transmission on infected population. *Int J Cardiol* 2009 Apr 3;133(2):275-277.

Bilate AMB, Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: Current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008 Mar-Apr;50(2):67-74.

Bittencourt AL, Sadigursky M, Da Silva AA, Menezes CA, Marianetti M, Guerra SC, Sherlock I. Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988 Jan-Mar;83(1):37-9.

Bolton JS. On the Nature of the Weigert-Pal Method. *J Anat Physiol*. 1898;32(2):247-66.

Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, Breniere SF. *Trypanosoma cruzi*: Study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp. Parasitol*. 1996 Aug;83(3):275-28.

Bosseno MF, Barnabe C, Gastelum EM, Kasten FL, Ramsey J, Espinoza B, Breniere SF. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol* 2002 Feb;40(2):627-632.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*.1997 Oct;114(2):103-110.

Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2000 Jan;30(1):35-44.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001 Sep;31(11):1218-1226.

Brumpt E. Le *Trypanosoma cruzi* evolue chez le *Conorhinus megistus*, *Cimex levtularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull. Soc. Phat. Exot.* 1912(a); 5:360-364.

Brumpt E. Pénétration du *Shozotrypanum cruzi* à travers la muquese oculaire saine. *Bull Soc Path Exot* 1912 (b); 5:724-729.

Brumpt E. *Precis de Parasitologie*, Paris: Masson; Vol 1. 1931.

Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell. Microbiol.* 2002 Nov;4(11):701-711.

Cabrine-Santos M, Santos VM, Lima MA, Abreu MEA, Lages-Silva E, Ramírez LE. Genitourinary changes in hamsters infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:523–528.

Calabrese KS, Lagrange PH, da Costa SC. *Trypanosoma cruzi*: histopathology of endocrine system in immunocompromised mice. *Int J Exp Pathol.* 1994 Dec;75(6):453-62.

Calvo Méndez ML, Nogueira Torres B, Alexandre Aguilár R. The oral route: an access port for *Trypanosoma cruzi*. *Rev Latinoam Microbiol.* 1992 Jan-Mar;34(1):39-42.

Camandaroba EL, Pinheiro Lima CM, Andrade SG. Oral Transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotype in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002 Mar-Apr;44(2):97-103.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic *trypanosoma* in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 1964;6:93-100.

Camargo ME, Leser PG, Leser WSP. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. *Rev Inst Med trop São Paulo.* 1976; 215-26.

Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortes A, Levin MJ, Gonzalez A, Degraeve W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requena JM, Dasilveira JF. Molecular Karyotype of Clone CI Brener Chosen for the *Trypanosoma-Cruzi* Genome Project. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 May;71(2):273-278.

Cardoso FA. Sur le mechanisme de la transmission de la maladie de Chagas. *Ann Parasitol Humaine* 1933 ; 16: 341-9.

Carme B, Aune I, Nguyen G, Aznar C, Beaudet B. Four cases of acute chagasic myocarditis in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg* 2001 Mar-Apr;64(3-4):162-163.

Carvalho LO, Abreu-Silva AL, Haridoim Dde J, Tedesco RC, Mendes VG, da Costa SC, Calabrese KS. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *Int J Exp Pathol*. 2009 Feb;90(1):52-7.

Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Paico H, Yauri V, Angulo N, Ccopa F, Bern C. Cell Death and Serum Markers of Collagen Metabolism during Cardiac Remodeling in *Cavia porcellus* Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e1996.

Cavalcanti LPG, Rolim DB, Neto RJP, Vilar DCLF, Nogueira JOL, Pompeu MML, Teixeira MJ, Sousa AQ. Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará. *Cad. Saúde Colet*. 2009 17(4):911-921.

Chagas C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909 Ago;1(2):159-218.

Chagas C. Processos patojenicos da tripanozomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1916 8(2):5-35.

Chagas C. American trypanosomiasis: Study of the parasite and of transmitting insect. *Proc. Inst. Med. Chicago*. 1921; 3:220-237.

Chagas C. Quelques aspects évolutifs du *Trypanosoma cruzi* dans l' insecte transmetteur. *C. R. Soc. Biol*. 1927 97:829-849.

Corbett CE, Scremin LH, Lombardi RA, Gama-Rodrigues JJ, Okumura M. Pancreatic lesions in acute experimental Chagas' disease. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002;57(2):63-6.

Cortez C, Yoshida N, Bahia D, Sobreira TJ . Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. *PLoS One*. 2012;7(7):e42153.

Cortez M, Neira I, Ferreira D, Luquetti AO, Rassi A, Atayde VD, Yoshida N. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infect Immun*. 2003 Nov;71(11):6184-6191.

Cortez M, Silva MR, Neira I, Ferreira D, Sasso GRS, Luquetti AO, Rassi A, Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes Infect*. 2006 Jan;8(1):36-44.

Coura Jr. Relatório apresentado ao Instituto Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde, sobre surto de doença de Chagas Aguda ocorrido em Teutônia, Município de Estrela, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro, junho de 1966.

Coura Jr, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002 Apr;18(4):171-176.

Coura Jr, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease-100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009 Jul;104:31-40.

Coura Jr, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 2010 Jul-Aug;115(1-2):5-13.

Coura Jr, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011 Sep;106(6):641-645.

Coura Jr, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review Doença de Chagas. O que é conhecido e o que deve ser melhorado: uma visão sistêmica. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45(3):286-296.

D'Avila DA, Gontijo ED, Lages-Silva E, Meira WSF, Chiari E, Galvao LMC. Random amplified polymorphic DNA profiles of *Trypanosoma cruzi* isolates from chagasic patients with different clinical forms. *Parasitol Res.* 2006 Apr;98(5):455-461.

De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira ACV, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SDJ. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2006 Mar;2(3):226-235.

De Meis J, Morrot A, Farias-De-Oliveira DA, Villa-Verde DMS, Savino W. Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Jul;3(7):e417.

De Meis J, Aurélio Farias-de-Oliveira D, Nunes Panzenhagen PH, Maran N, Villa-Verde DM, Morrot A, Savino W. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. *J Parasitol Res.* 2012;574020.

Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch ACC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med* 2002 Feb 18;195(4):401-413.

Dias E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Rio de Janeiro: Faculdade Nacional de Medicina; 1933.

Dias E. Transmissão do *Schizotrypanum cruzi* entre vertebrados, por via digestiva. *Brasil Médico* 1940; 54: 775-6.

Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobregó G, Chagas' disease- a clinical, epidemiologic and patologic study. *Circulation.* 1956 Dec;14(6):1035-60.

Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 1989 Jul-Sep;22(3):147-156.

Dias JC. Cecílio Romaña, Romaña's sign and Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 1997 Sept-Oct;30(5):407-413.

Dias JC, Machado EM, Fernandes AL, Vinhaes MC. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2000 Jan;16(suppl.2):13-34.

Dias JC. Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. *Cad Saude Publica* 2000 16(suppl. 2):43-59.

Dias JC. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2006 Ago;39(4):370-375.

Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Netto EM, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonca J, Araujo RF, Shikanai-Yasuda MA, Aras R. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med Trop.* 2008 May-Jun;41(3):296-300.

Dias JCP. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. PhD Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, 376 pp. 1982.

Diaz-Ungria C. Estudio experimental del *Trypanosoma cruzi* en el perro y otros vertebrados. El problema de la transmisión. *Kasmera (Venezuela)* 1968; 3:73-88.

Dias-Ungria C, Bracho JS. Camino que sigue el *Tripanosoma cruzi* en perros infectados por la vía bucal: nuevos estudios. *RevVet Venez.* 1970; 29: 271-8.

Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S. Emerging food-borne parasites. *Vet Parasitol.* 2009;163(3):196-206.

dos Santos VM, de Lima MA, Cabrine-Santos M, de Stefani Marquez D, de Araújo Pereira G, Lages-Silva E, Ramírez LE. Functional and histopathological study of the pancreas in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 2004;94(2):125-33.

Eickhoff CS, Giddings OK, Yoshida N, Hoft DF. Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010 Aug;105(5):687-691.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005 Jul 15;309(5733):409-415.

Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop.* 2002 Feb;81(2):123-132.



Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 1999;118 (2):161-6.

Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J Oral Pathol.* 1974;3(6):291-316.

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GAJ, Acosta N, de Arias AR, Miles MA. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* 2003 Feb 27;421(6926):936-939.

Gerência de epidemiologia da Fundação de vigilância à Saúde/Amazonas. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas Aguda AM. 13/01/2010.

Gibson WC, Miles MA. The Karyotype and Ploidy of *Trypanosoma-Cruzi*. *Embo J.* 1986 Jun;5(6):1299-1305.

Giordano R, Fouts DL, Tewari D, Colli W, Manning JE, Alves MJM. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J. Biol. Chem.* 1999 Feb 5;274(6):3461-3468.

Giraldo NA, Bolaños NI, Cuellar A, Guzman F, Uribe AM, Bedoya A, Olaya N, Cucunubá ZM, Roa N, Rosas F, Velasco V, Puerta CJ, González JM. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1294.

Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS, Bauer PG, Savino W, Lagrange PH. Studies of the thymus in Chagas' disease: III. Colonization of the thymus and other lymphoid organs of adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathol Biol (Paris).* 1991 Feb;39(2):91-7.

Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS, Zaverucha do Valle T, Lagrange PH. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histol Histopathol.* 2002;17(3):837-44.

Guedes PM, Veloso VM, Mineo TW, Santiago-Silva J, Crepalde G, Caldas IS, Nascimento MS, Lana M, Chiari E, Galvão LM, Bahia MT. Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012;21(2):151-6.

Guimarães FN, da Silva NN, Clausell DT, de Mello AL, Rapone T, Snell T, Rodrigues N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). *Hospital ( Rio J.)* 1968 Jun;73(6):1767-17804.

Gus I, Molon ME, Bueno AP. Chagas disease--review of 8 simultaneous cases of acute Chagas myocarditis: 25 years later. *Arq Bras Cardiol* 1993 Feb;60(2):99-101.

Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 2009 Nov;31(11):673-685.

Hasslocher-Moreno AM, do Brasil P, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, da Silva GMS. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012 May;67(5):1261-1266.

Herrera L, Xavier SD, Viegas C, Martinez C, Cotias PM, Carrasco H, Urdaneta-Morales S, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Exp. Parasitol.* 2004 May-Jun;107(1-2):78-88.

Higuchi ML, Fugasawa S, de Brito T, Parzianello LC, Bellotti G, Ramires JA. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart* 1999; 82(3):279-285.

Higuchi ML. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 (Suppl 1):263-267.

Hoare CA. *The Trypanosomes of mammals.* Oxford and Edinburger: Blackwell Scientific Publications; 1972. 749 p.

Hoff R, Teixeira RS, Carvalho JS, Mott KE. *Trypanosoma-Cruzi* in Cerebrospinal-Fluid During Acute Stage of Chagas Diseases. *New England Journal of Medicine* 1978; 298(11):604-606.

Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun.* 1996;64(9):3800-3810.

Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 1998 Mar;66(3):1208-1215.

Huang H, Chan J, Wittner M, Jelicks LA, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, Braunstein VL, Bacchi CJ, Yarlett N, Chandra M, Shirani J, Tanowitz HB. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Mol Cell Cardiol* 1999 Jan;31(1):75-88.

Ianni BM, Mady C. The indeterminate form of Chagas's disease. Myths vs facts. *Arq Bras Cardiol.* 1997 Mar;68(3):147-148.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host

immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010 Sep 15;12:e29.

Kendall G, Ashall F, Miles MA, Kelly JM. Genes Encoding Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in *Trypanosoma-Cruzi*. *Biochem. Soc. Trans.* 1988 Dec;16(6):1067-1067.

Kofoed CA, Donat F. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* from the intestine of cone-nose bug *Triatoma protracta*. *Proc Soc Exp Biol*. 1933; 30: 489-91.

Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, Ferrante AW Jr. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3466-79.

Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 1976 Mar;116(3):755-60.

Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas' disease- a clinical, epidemiologic and patologic study. *Circulation* 1956;14, 1035-1060.

Leedale, G.F. & Vickerman, K. Phylum Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981. In: Lee, J.J., Leedale, G.F. & Bradbury, P., *An Illustrated Guide to the Protozoa*, Second Edition, vol. 2. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, U.S.A. 2000. 1135-1185.

Lennert K, Parwaresch MR. Pathology of tissue mast cells. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1978;62:546.

Lepletier A, de Frias Carvalho V, Morrot A, Savino W. Thymic atrophy in acute experimental Chagas disease is associated with an imbalance of stress hormones. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1262:45-50.

Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. *Am J Trop Med Hyg* 2009 Dec;81(6):1041-1049.

Lisboa CV, Pinho AP, Monteiro RV, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Exp Parasitol*. 2007;116(2):150-5.

Macedo AM, Oliveira RP, Pena SDJ. Chagas disease: role of parasite variation in pathogenesis. *Expert. Ver. Mol. Med*. 2002 Mar;5(4):1-16.

Macedo AM, Pimenta JR, Aguiar RS, Melo AI, Chiari E, Zingales B, Pena SDJ, Oliveira RP. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Apr;96(3):407-413.

Machado FS, Tyler KM, Brant F, Esper L, Teixeira MM, Tanowitz HB. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan;1(4):1743-17458.

Maioli TU, Assis FA, Vieira PM, Borelli P, Santiago H, Alves R, Romanha AJ, Carneiro CM, Faria AM. Splenectomy increases mortality in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol*. 2011;73(1):36-45.

Marcondes CB, Guedes LA, Arruda JR ER, Mendonça D, Santa Rosa MG, Dias JCP, Coura JR. Surtos de Doenças de Chagas com provável infecção oral na Paraíba: Observações preliminares. Resumo de Tema Livre. XXIII Cong Bras Med Trop. Curitiba-PR, 1987.

Marcondes MC, Borelli P, Yoshida N, Russo M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect*. 2000;2(4):347-52.

Marsden PD. *Trypanosoma cruzi* Infections in Cfi Mice .2. Infections Induced by Different Routes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1967;61(1):62-67.

Mazza S, Montana A, Benitez C, Janzi E. Transmisión del *Schizotripanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas. *MEPRA* 1936; 28: 41-9.

Medeiros MB, Guerra JA, Lacerda MV. Meningoencephalitis in a patient with acute Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2008 Sep-Oct;41(5):520-521.

Meuser-Batista M, Corrêa JR, Carvalho VF, de Carvalho Britto CF, Moreira OC, Batista MM, Soares MJ, Filho FA, E Silva PM, Lannes-Vieira J, Silva RC, Henriques-Pons A. Mast cell function and death in *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2011;179(4):1894-904.

Miles MA. *Trypanosoma-Cruzi* - Milk Transmission of Infect Immunfrom Mother to Young. *Parasitol* 1972 Aug;65(1):1-9.

Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. Identification by Isoenzyme Patterns of 2 Distinct Strain-Groups of *Trypanosoma-Cruzi*, Circulating Independently in a Rural Area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg*. 1977 71(3):217-225.

Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ. Isozymic Heterogeneity of *Trypanosoma-Cruzi* in 1st Autochthonous Patients with Chagas-Disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978 272(5656):819-821.

Miles MA, Lanham SM, Souza AAD, Póvoa M. Further Enzymic Characters of *Trypanosoma-Cruzi* and Their Evaluation for Strain Identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 1980;74(2):221-237.

Miles MA, Póvoa MM, Prata A, Cedillos RA, de Souza AA, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet 1981 June;1(8234):1338-1340.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde, 2005a. Doença de Chagas Aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina. Nota técnica, disponível: [http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/.240305\\_nota.pdf](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/.240305_nota.pdf). Acessado em 3/01/2009.

Ministério da Saúde do Brasil. Nota técnica - 4/4/2005 b. Doença de Chagas Aguda no município de Santana – Amapá <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Ver. Soc. Bras Med Trop 2005c; 38 (3): 1-29.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Brasil. Doença de Chagas Aguda. Nota técnica, 9 de Outubro de 2007. [HTTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_chagas\\_091007.pdf](HTTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas_091007.pdf).

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

Ministério da Saúde. Secretaria de Estado da Saúde do Tocantins. Nota técnica. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Doença de Chagas. 2009.

Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância da Saúde. Aspectos epidemiológicos. [internet]. 2012. [acesso em 2012 dez]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454).

Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância da Saúde. 2012. Aspectos epidemiológicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saud>.

Minoprio PM, Eisen H, Forni L, Lima MRD, Joskowicz M, Coutinho A. Polyclonal Lymphocyte-Responses to Murine Trypanosoma-Cruzi Infection .1. Quantitation of Both T-Cell and B-Cell Responses. Scandinavian Journal of Immunology 1986 Dec;24(6):661-668.

Moncayo A. Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003 Jul;98(5):577-591.

Moncayo A. Progress towards the interruption of transmission of Chagas disease in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(suppl. I):401-404.

Moolenbeek C, Ruitenberg EJ. The 'Swiss Roll': A Simple Technique For Histological Studies Of The Rodent Intestine Laboratory Animals. Lab Anim. 1981;15(1):57-9.



Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and Clones of *Trypanosoma-Cruzi* Can Be Characterized by Pattern of Restriction Endonuclease Products of Kinetoplast DNA Minicircles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1980 77(11):6810-6814.

Morris SA, Tanowitz HB, Wittner M, Bilezikian JP. Pathophysiological Insights into the Cardiomyopathy of Chagas-Disease. Circulation 1990 Dec;82(6):1900-1909.

Morrot A, Barreto de Albuquerque J, Berbert LR, de Carvalho Pinto CE, de Meis J, Savino W. 2012. Dynamics of Lymphocyte Populations during *Trypanosoma cruzi* Infection: From Thymocyte Depletion to Differential Cell expansion/Contraction in Peripheral Lymphoid Organs. J Trop Med.;2012:747185.

Mukherjee S, Huang H, Petkova SB, Albanese C, Pestell RG, Braunstein VL, Christ GJ, Wittner M, Lisanti MP, Berman JW, Weiss LM, Tanowitz HB. *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. Infect Immun 2004 Sep;72(9):5274-5282.

Nattan-Larrier L. Infections à Trypanosomes et voies de penetration des virus. Bull Soc Path Exot 1921;14:537-542.

Neira I, Silva FA, Cortez M, Yoshida N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. Infect Immun 2003 Jan;71(1):557-561.

Neri Guimarães, F.; Da Silva, N.N.; Clausel, D.T.; Mello, A.L.; Rapone, T.; Snell, T. & de Rodrigues, N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teotônia (Estrêla-Rio Grande do Sul). O Hospital, 1968; 73(6): 73-110.

Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SDJ. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1998 Mar 31;95(7):3776-3780.

Oliveira RP, Melo AIR, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: Expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94:65-70.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. Lancet 2006; 367(9507):356-67.

Organização Pan-Americana da Saúde. Documento sobre a Iniciativa do Cone Sul. Washington DC; 1992 (OPAS. PNSP/92-18).

Organização Pan Americana de Saúde. Quantitative estimation of Chagas disease in the Americas. Montevideo; 2006 (OPAS/HDM/CD/425-06).

Organização Pan Americana de Saúde. Informe de la Consulta Técnica en Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA). Rio de Janeiro. 2006;46p.

Organização Pan-Americana de Saúde. [internet]; 2012. [acesso em 2013 jan]. Disponível em:[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2382&Itemid=3921&lang=fr](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2382&Itemid=3921&lang=fr)

Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21(4):385-90.

PAHO. The Newsletter of the Pan American Health Organization ([http://www.paho.org/English/DD/PIN/ptoday24\\_aug06.htm](http://www.paho.org/English/DD/PIN/ptoday24_aug06.htm)). Acessado em 2 março de 2013.

Panasco MS, Pelajo-Machado M, Lenzi HL. Omental and pleural milky spots: different reactivity patterns in mice infected with *Schistosoma mansoni* reveals coelomic compartmentalisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(4):440-444.

Pérez AR, Morrot A, Berbert LR, Terra-Granado E, Savino W. Extrathymic CD4+CD8+ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. *Ann N Y Acad. Sci*. 2012;1262:27-36.

Pinto AY, Harada GS, Valente VC, Abud JE, Gomes FS, Souza GC, Valente AS. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2001 set-out;34(5):413-419.

Pizzi T, Prager R. Estabilizacion de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por passaje seriado en ratones de constitucion genetica uniforme: analisis cuantitativo del curso de la infection. *Biologica* 1952;16-17:3-12.

Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA. The vasculature in chagas disease. *Adv Parasitol*. 2011;76:83-99.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001 Sep; 1(2): 92-100.

Previato JO, Jones C, Goncalves LPB, Wait R, Travassos LR, Mendoncapreviato L. O-Glycosidically Linked N-Acetylglucosamine-Bound Oligosaccharides from Glycoproteins of *Trypanosoma-Cruzi*. *Biochem J* 1994 Jul 1;301:151-159.

Punukollu G, Gowda RA, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 2007 Feb 14;115(3):279-283.

Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines* 2011 Nov;7(11):1184-1191.

Quijano-Hernández IA, Castro-Barcena A, Aparicio-Burgos E, Barbosa-Mireles MA, Cruz-Chan JV, Vázquez-Chagoyán JC, Bolio-González ME, Dumonteil E Evaluation of clinical and immunopathological features of different infective doses of *Trypanosoma cruzi* in dogs during the acute phase. *Scientific World Journal*. 2012;635169.

Ragone PG, Pérez Brandán C, Padilla AM, Monje Rumi M, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, Tomasini N, Cimino RO, Romero NM, Portelli M, Nasser JR, Basombrío MA, Diosque P.. Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. *Acta Trop*. 2012 Sep; 123(3):196-201.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol*. 2000; 23:883–9.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010 Apr 17;375(9723):1388-1402.

Rassi A Jr, Rassi A, de Rezende JM. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012 Jun;26(2):275-291  
Rezende JM, Rassi A. Manifestações digestivas na fase aguda da doença de Chagas. In: Raia AA (ed). *Manifestações digestivas da moléstia de Chagas*. São Paulo: Salvier, pp. 97-107, 1983.

Romaña C. Investigaciones sobre la enfermedad de Chagas. I. Comprobación de formas agudas de tripanosomiasis americana en el Chaco Austral y Santafecino. 1934 pp. 1-24 pp.

Romaña, C. Comprobación de formas agudas de tripanosomiasis americana en el Chaco Austral y santafesino. *Mepra* 1934; 14: 21-24.

Romaña C. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. Las conjuntivitis esquizotripanósica unilateral (hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *M.E.P.R.A.*, 1935; 22: 16-28.

Romanha AJ. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi* [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1982.

Saldanha JC, Santos VM, Reis MA, Cunha DF, Teixeira VPA. Morphologic and morphometric evaluation of pancreatic islets in chronic Chagas' disease. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2001; 56:131–138.

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

Schofield CJ, Dujardin JP. Chagas disease vector control in Central America. *Parasitol. Today* 1997 Apr;13(4):141-144.

Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 1999 42:1-27.

Secretaria do Estado de Saúde Pública do Pará. Simpósio alerta para doenças cardíacas associadas ao mal de Chagas. 2012. <http://www.saude.pa.gov.br/index.php/noticias/197-simposio-alerta-para-doencas-cardiacas-associadas-ao-mal-de-chagas>.

Secretaria de Estado de Saúde Pública. Portaria da Sespa define fluxo de assistência em doença de Chagas [Internet]. Belém, Pará, 2011. [acesso em 2013 jan 15]. Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br/index.php>

Shapiro TA, Englund PT. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Ann. Rev. Microbiol.* 1995 49:117-143.

Shaw J, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 1969 Dez;3(2):153-157.

Shikanai-yasuda MA, Marcondes CB, Cuedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JCP, Neto VA, Tolezano E, Peres BA, Arruda ER, Lopes MH, Shiroma M, Chapadeiro E. Possible Oral-Transmission of Acute Chagas-Disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*1991 Sep-Oct;33(5):351-357.

Shikanai-Yasuda MA. Transmissão da doença de Chagas aguda por via oral: surto epidêmico em Catolé do Rocha, Paraíba, 1986. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Depto.Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP.In: Informe Final Consulta Técnica e Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA); 4-5 mayo 2006; Rio de Janeiro. Pp. 35-8.

Shoemaker JP, Hoffman RV Jr, Huffman DG. Trypanosoma cruzi: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. *Exp Parasitol.* 1970;27(3):403-7.

Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240:72-91.

Silva AA, Roffe E, Marino AP, dos Santos PV, Quirico-Santos T, Paiva CN, Lannes-Vieira J. Chagas' disease encephalitis: intense CD8+ lymphocytic infiltrate is restricted to the acute phase, but is not related to the presence of Trypanosoma cruzi antigens. *Clin Immunol.* 1999;92(1):56-66.

Silva CV, Luquetti AO, Rassi A, Mortara RA. Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi amastigotes. *Microb Infect.* 2006; 8: 2120-2129.

Silveira AC. O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991-2001. *In: Silveira AC (org) O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional 1991-2001. Pan-americana da Saúde, Brasília. 2002; p.15-43.*

Silveira AC. Factores de riesgo implicados en la transmisión oral de la enfermedad de chagas. Informe de la Consulta Técnica en Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA)/ Organización Panamericana de la Salud, Unidad Regional de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles (DPC/CD/CHA), Grupo Técnico Especializado en Inocuidad de Alimentos (DPC/VP/FOS). Rio de Janeiro, 2006. 16-19.

Silveira AC. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2011; 44 (suppl.2):122-124.

Singhal N, Tahlan A, Bansal C, Handa U, D'Cruz S. Coexistence of leukemic infiltration and extramedullary hematopoiesis in a lymph node: A cytological diagnosis. *J Cytol.* 2011;28(3):138-40.

Souza Wd. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 July;104 (suppl. I):89-100.

Souza, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. *In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1999.*

Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJ. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 1993 60(1):71-80.

Storino R, Jörg ME. Vias de infeccion y aspectos clinicos. *In: Storini R. Milei (eds) Enfermedad de Chagas. Doyma, Argentina, 1994.*

Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2010 Jul-Aug;115(1-2):35-43.

Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius red f3ba as a stain for connective tissue. *Arch Pathol.* 1964;78:69-72.

Taniwaki NN, da Silva CV, da Silva S, Mortara RA. Distribution of *Trypanosoma cruzi* stage-specific epitopes in cardiac muscle of *Calomys callosus*, BALB/c mice, and cultured cells infected with different infective forms. *Acta Trop.* 2007;103(1):14-25.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(4):400-19.



Tanowitz HB, Kaul DK, Chen B, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, Wittner M. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Parasitology* 1996 Feb;82(1):124-130.

Tanowitz HB, Jelicks LA, Machado FS, Esper L, Qi X, Desruisseaux MS, Chua SC, Scherer PE, Nagajyothi F. Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. *Adv Parasitol.* 2011;76:235-50.

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

Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006 Aug;101(5):463-491.

Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews* 2011 Jul;24(3):592-630.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural-Populations of *Trypanosoma-Cruzi*, the Agent of Chagas-Disease, Have a Complex Multiclonal Structure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1986 Jan;83(1):115-119.

Tibayrenc M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: Integrated genetic epidemiology of infectious diseases. *Parasitol. Today* 1998 Aug;14(8):323-329  
Torres CM. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1941 36(3):391-404.

Torres JP, Ortiz S, Munoz S, Solari A. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. *Parasitol.* 2004 Feb;128:161-168.

Toso A, Vial F, Galanti N. Oral transmission of Chagas' disease. *Revista Medica De Chile* 2011 Feb;139(2):258-266.

Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS, Campetella O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun.* 2005;73(1):201-7.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6):472-481.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LMC, Reis DD, Pereira MES, Simpson AJG, Tostes S, Pena SDJ. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.* 1996 Dec;149(6):2153-2159.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis DD, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S, Moreira MDV, Brasileiro G, Pena SDJ. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly

from tissues of patients with chronic Chagas disease - Differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* 2000 May;156(5):1805-1809.

Valent P, Gleich GJ, Reiter A, Roufousse F, Weller PF, Hellmann A, Metzgeroth G, Leiferman KM, Arock M, Sotlar K, Butterfield JH, Cerny-Reiterer S, Mayerhofer M, Vandenberghe P, Haferlach T, Bochner BS, Gotlib J, Horny HP, Simon HU, Klion AD. Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. *Expert Rev Hematol.* 2012;5(2):157-76.

Valente SAS, Valente VC, César MJB, Santos MP 1997. Registro de 15 casos autóctones de doença de Chagas no Estado do Amapá com evidências de transmissão oral, p. 53. XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte.

Valente SAS, Pimentel PS, Valente VC et al. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém, primeiro registro no oeste do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34(1): 19-20.

Valente SAS, Vera CV, Pinto AYN. Epidemiologia e transmissão oral da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. Informe de la Consulta Técnica en Epidemiología, Prevención y Manejo de la Transmisión de la Enfermedad de Chagas como Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA)/ Organización Panamericana de la Salud, Unidad Regional de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles (DPC/CD/CHA), Grupo Técnico Especializado en Inocuidad de Alimentos (DPC/VP/FOS). Rio de Janeiro, 2006. 21-26.

Valente VC, Pinto AYN, Valente SAS. Novo episódio familiar com 7 casos de doença de Chagas aguda e autóctone em Bagre Estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33 (1):388-9.

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas": esquizotripanoze humana ou tireoidite parasitária. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1911 3(2):276-292.

Villela, E. Moléstia de Chagas. *Folha Med.* 1923, 4: 33-35.

Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(6):624-31.

WHO. Control of Chagas' disease. World Health Organization Tech. Rep. Ser. 1991; 811: 1-91.

World Health Organization. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser; 2002.109p.

WHO. World Health Report, Making health research work for poor people. *Tropical Disease Research Progress 2003-2004.* 2005: 30-33.

World Health Organization. [internet]. 2012. [acesso em 2012 dez]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication; 2010.

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

Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: Lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 1996 Jan;26(1):102-109.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 1998 Jan;28(1):105-112.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(1):159-64.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009 Nov;104(7):1051-1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):240-53.