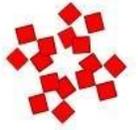




Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Ciências Médicas
Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



Transmissão Sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*

Adriano Rios da Silva

**Orientadora: Dra. Nadjar Nitz L. S. Araújo
Co-orientadora: Dra. Mariana M. Hecht**

Brasília – DF
2013

Adriano Rios da Silva

Transmissão Sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*

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

Brasília – DF
2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: CNPq / CAPE

Aprovada em 16 de agosto de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo (presidente)
Universidade de Brasília – UnB

Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves
Universidade de Brasília – UnB

Dr. Cleudson Nery de Castro
Universidade de Brasília – UnB

Dra. Carla Nunes de Araújo (suplente)
Universidade de Brasília - UnB

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que
as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia
impossível”*

(Charles Chaplin)

A Deus

*A minha família, meu **pai**, minha **mãe** e meus **irmãos**, por serem a minha paz, minha base*

Minha sobrinhas que tanto amo

*A minha futura esposa **Fernanda Santana Leite** que me deu toda base para que pudesse ser o que sou hoje. Te amo minha tuda (“**Só enquanto eu respirar vou me lembrar de você**”)*

AGRADECIMENTOS

“The imagination is more importante than Knowledge.”
(Albert Einstein)

Aos meu orientadores, **Nadjar Nitz, Mriana Hecht e Antônio Teixeira**, pela oportunidade de crescimento, ensinamento e coragem para seguir sempre em frente

Agradeço imensamente às pessoas que fizeram parte dessa minha trajetória: à **Eliete, Miguel,**

Ciro, Ester e Tamires, Ana Luisa, Marcelle, Perla, Seu Geraldo, Ana de Cássia, Rafael, Alessandro da Pós-Graduação, Carla, Carol, Lou, Thaís, Adriana, Roze, Glorinha, Mariana e Nadjar. Todos serão sempre lembrados com muito carinho, por estarem presentes nesta fase.

Em especial aos grande amigos que fiz, que sempre farão parte de minha vida, **Ciro**, por esta sempre disposto a escutar uma boa música, mesmo estando longe; **Alessandro e Camila** o casal que sempre guardarei em minhas recordações; **Fernando**, por ser este grande parceiro. Que ficava com os olhos brilhando quando falava do filho; **Marol**, por ser esta pessoal meiga e tão carinhosa; **Rafa e Lou**, parceiros de corrida no parque; **Manu**, uma grande amiga, te agradeço pelos ótimos conselhos; **Marcelle e Tamires**, companheiras de almoço e amigas de longa data.

Me desculpe se esqueci alguém.

Aos meus companheiros da Estação 23, vocês são meu heróis.

Aos amigos da Vida, **Eles sabem quem são.**

Ao meu sogro e minha sogra **Fernando e Marlene** que me acolheram com tanto carinho e ao meu cunhado **Henrique** por ser este grande parceiro.

Ao meus irmãos **Neurivan e Lucivânia** que tanto amo, meu cunhado **Flávio** que é um outro irmão, as minha sobrinhas **Laryssa e Lorena**, que são dois presentes que Deus me deu.

Agradeço aos meu pais **Geraldo e Nizete** que me deram o dom da vida, me mostraram o quanto vale ser honesto. Amo muito Vocês

Fernanda minha princesa te agradeço por ser esta pessoa tão amiga, por estar sempre ao meu lado me apoiando e me respeitando. “Não te amo como se fosse uma rosa de sal, topázio ou flechas de cravos que atiram chamas. Te amo como se ama certas coisas escuras, secretamente, entre a sombra e a alma Eu te amo sem saber como nem quando nem de onde, te amo simplesmente, sem complicações nem orgulho. Assim te amo porque não conheço outra maneira, tão profundamente que tu mão em mim é a minha, tão profundamente, que quando fecho os olhos contigo eu sonho” (Pablo Neruda)

Resumo

A doença de Chagas é uma patologia que acomete milhares de pessoas no mundo inteiro, principalmente no continente Americano. O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é transmitido principalmente pelo inseto triatomíneo durante o repasto sanguíneo. Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas pode ser adquirida por via transfusional, congênita ou pelo consumo de alimentos contaminados. A possibilidade da transmissão sexual da doença de Chagas foi sugerida por Carlos Chagas em 1909, entretanto, poucos trabalhos foram publicados sobre o tema desde então. O presente trabalho teve como objetivo investigar a transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* no modelo experimental murino. Para isso, foram feitos testes parasitológicos, sorológicos e moleculares em 20 camundongos infectados e em seus parceiros sexuais, inicialmente sadios. Os resultados mostraram que após o acasalamento com animais infectados, os parceiros sexuais apresentaram testes sorológicos positivos em 60% dos casos, enquanto que o DNA nuclear do parasito foi identificado no sangue dos animais analisados. Além disso, duas fêmeas inicialmente sadias apresentaram testes de hemocultura positivos após acasarem com machos infectados, confirmando assim a transmissão sexual do *T. cruzi*. Os resultados dos testes sorológicos e moleculares dos filhotes mostraram uma discrepância entre a sorologia e os resultados de PCR, sendo que o teste molecular apresentou uma maior sensibilidade. A taxa de infecção congênita obtida pelos métodos sorológicos revelaram que 14% dos filhotes provenientes dos Grupos A e B adquiriram a infecção, enquanto que o teste de PCR demonstrou uma positividade de 58%. A análise histopatológica não foi capaz de mostrar a presença de ninhos de amastigotas no coração dos animais infectados, tanto pela via intraperitoneal, como pela via sexual. No entanto, pôde-se observar a presença de extenso infiltrado inflamatório destruindo as fibras cardíacas em todos os animais infectados. A análise de imunohistoquímica realizada em cortes histológicos de testículos de camundongos infectados revelou uma grande quantidade de formas amastigotas no túbulo seminífero e epidídimo. A capacidade de infecção do sêmen proveniente de indivíduo infectado pelo *T. cruzi* foi verificada. As análises histopatológicas mostraram a presença de ninhos de amastigotas no coração de fêmeas infectadas a partir da inoculação intra-vaginal de sêmen humano. Dessa forma, nossos resultados mostram que ocorreu transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em camundongos.

Palavras-chave: Transmissão sexual, *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas.

Abstract

Chagas disease is a condition that affects thousands of people worldwide, mainly in the Americas. *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, is transmitted primarily by triatomine insect during blood feeding. Besides vectorial transmission, Chagas disease can be acquired by blood transfusion, congenital or by consumption of contaminated food. The possibility of sexual transmission of Chagas disease has been suggested by Carlos Chagas in 1909, however, few studies have been published on the subject since then. The present study aimed investigate sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in experimental murine model. For this, parasitological, serological and molecular infected mice and their sexual partners, initially healthy. The results showed that after mating with animals infected sexual partners serological tests showed positive in 60% of cases, while the nuclear DNA of the parasite was identified in blood from all animals analyzed. In addition, two healthy females initially showed positive blood culture tests after mating with infected males, thus confirming the sexually transmitted *T. cruzi*. The results of serological and molecular tests of pups showed a discrepancy between serology and PCR results, and the molecular test showed a higher sensitivity. Congenital infection rate obtained by serological methods showed that 14% of the from Groups A and B acquired infection, whereas the PCR test showed an 58% positivity. Histopathological analysis was not able to show the presence of nests of amastigotes in the hearts of infected animals, either by intraperitoneal as through sex. However, it was observed the presence of extensive inflammatory infiltrate destroying cardiac fibers in all infected animals. Immunohistochemical analysis performed in histological testis infected mice revealed a large amount of amastigotes in seminiferous tubule and epididymis. The ability of infection semen from individual infected with *T. cruzi* was verified. The histopathological analysis showed the presence of nests of amastigotes in the heart of infected females from intravaginal inoculation of human semen. Thus, our results show that there was sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice.

Keywords: Sexually Transmitted, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease

LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro humano.	04
Figura 2. Organização celular do <i>Trypanosma cruzi</i> (forma epimastigota).	06
Figura 3. Estrutura do DNA do cinetoplasto.	09
Figura 4. Validação do Diagnóstico Molecular pré-acasalamento.	36
Figura 5. Confirmação da transmissão sexual do <i>Trypanosoma cruzi</i> por diagnóstico molecular.	36
Figura 6. Confirmação da transmissão sexual do <i>Trypanosoma cruzi</i> por diagnóstico molecular na geração F1.	37
Figura 7. Produção de anticorpos específicos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> por camundongos dos grupos A e B	38
Figura 8. Detecção de anticorpos específicos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> por imunofluorescência indireta.	39
Figura 9. Títulos de anticorpos IgG anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> do grupo R após acasalamento	40
Figura 10. Comparação dos níveis de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> produzidos em camundongos que adquiriram a infecção por via intraperitoneal/sexual e congênita.	41
Figura 11. Aspectos histopatológicos da miocardiopatia inflamatória na doença de Chagas murina.	42
Figura 12. Presença de ninhos de amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> nos testículos de camundongos.	43

Figura 13. Aspecto histopatológicos do tecido cardíaco de camundongos inoculados com sêmen humano infectado com *Trypanosoma cruzi*. 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CN	Controle negative
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
gRNA	RNA guia
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i> – DNA do cinetoplasto
LMPDC	Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - complexo principal de histocompatibilidade
nDNA	DNA nuclear
NO	Óxido Nítrico
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - reação de polimerização em cadeia
rRNA	RNA ribossomal
TCD4	Linfócito T Auxiliar
TCD8	Linfócito T Citotóxico
TCR	Receptor de célula T
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> –Fator de transformação de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
Tm	Temperatura media
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Doença de Chagas	1
1.2 Dados Epidemiológicos	1
1.3 Agente Etiológico	2
1.3.1 Classificação Taxonômica	2
1.3.2 Ciclo Biológico	3
1.3.3 Invasão celular e tecidual	4
1.3.4 Organização celular	5
1.3.5 Organização genômica	6
1.3.6 Núcleo	7
1.3.7 kDNA	8
1.4 Sintomas clínicos	9
1.5 Patogênese	10
1.6 Resposta imunológica contra o <i>T. cruzi</i>	12
1.7 Diagnóstico	13
1.8 Tratamento	14
1.9 Vias Clássicas de Transmissão	16
1.9.1 Transmissão vetorial	16
1.9.2 Transmissão transfusional	17
1.9.3 Transmissão oral	18
1.9.4 Transmissão congênita	19
1.9.5 Transmissão sexual	20
1.10 Controle e Prevenção	21

1.11 O modelo murino no estudo da doença de Chagas	22
2. Justificativa	23
3. Objetivos	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. Material e Métodos	25
4.1 Grupo experimental	25
4.2 Cultura do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
4.3 Infecção dos camundongos	25
4.4 Infecção com sêmen humano	26
4.5 Pesquisa a fresco do <i>T. cruzi</i>	26
4.6 Hemocultura	26
4.7 Extração de DNA total de <i>T. cruzi</i>	27
4.8 Extração de DNA dos camundongos	27
4.9 Quantificação e análise eletroforética do DNA	27
4.10 Diagnóstico Molecular	28
4.10.1 Amplificação de nDNA de <i>T. cruzi</i>	28
4.10.2 Southern Blot	28
4.10.3 Marcação de sondas radioativas	29
4.10.4 Purificação de sondas radiomarcadas	29
4.10.5 Hibridização	29
4.11 Imunodiagnóstico	30
4.11.1 Amostra	30
4.11.2 Crescimento do <i>T. cruzi</i> para obtenção de antígenos	30
4.11.3 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	30
4.11.3.1 Preparo de antígenos	30

4.11.3.2 Sensibilização de placas de ELISA com antígenos	31
4.11.3.3 Incubação com anticorpo primário	31
4.11.3.4 Incubação com anticorpo secundário e revelação de imunocomplexos	31
4.12 Imunofluorescência Indireta	32
4.12.1 Preparo de antígeno para Imunofluorescência Indireta	32
4.12.2 Ensaio de Imunofluorescência Indireta	32
4.13 Histopatologia	33
4.14 Imunohistoquímica	33
4.15 Análise estatística	34
5. Resultados	35
5.1 Diagnóstico parasitológico	35
5.2 Diagnóstico molecular	35
5.3 Imunodiagnóstico	38
5.4 Análises histopatológicas	41
5.5 Imunoperoxidase	43
5.6 Avaliação de capacidade do sêmen humano infectado transmitir o <i>T. cruzi</i>	44
6. Discussão	45
6.1 A Doença de Chagas como uma DST	45
6.2 O uso de técnicas moleculares e sorológicas para a determinação da transmissão sexual do <i>T. cruzi</i>	47
6.3 Transmissão congênita do <i>T. cruzi</i> e possível tolerização aos antígenos parasitários	48

7. Limitações do Estudo	50
8. Considerações Finais	51
9. Perspectiva	51
10. Referências Bibliográficas	52

1. Introdução

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas surgiu no homem e em outras espécies de mamíferos em consequência da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A descoberta do seu vetor, agente etiológico e descrição de suas características clínicas foram relatadas pela primeira vez pelo médico e pesquisador Carlos Chagas (1909), durante trabalhos em uma campanha para o controle da Malária no estado de Minas Gerais. Nesse período, Carlos Chagas se deparou com uma garota, chamada Berenice, em estado febril, na qual observou a presença de um organismo flagelado nunca visto antes. Após este achado, Carlos Chagas também descreveu aspectos da epizootia resultante da infecção de mamíferos pelo *Trypanosoma cruzi* (Monocayo, 2003; Texeira e cols, 2006; Costa, 2008; Tanowitz e cols, 2009).

A doença de Chagas é uma doença nativa do continente americano, onde o vetor e o parasito podem ser encontrados em ecossistemas naturais e em outros ambientes, como casa de pau a pique, galinheiros e outras localidades onde se encontra o homem. Acredita-se que a tríade epidemiológica dessa doença (parasita – vetor – hospedeiro) tenha surgido há cerca de 100 milhões de anos (Teixeira e cols, 2006), permanecendo até os dias atuais. Assim, pode-se imaginar que os primeiros animais silvestres tendo contato com o protozoário apresentaram as lesões características da doença de Chagas, a qual alcançou a população humana há mais de 9000 anos (Rothhammer e cols, 1985; Fornaciari e cols, 1992).

1.2 Dados epidemiológicos

A infecção pelo *T. cruzi* abrange mais de 14 milhões de pessoas, onde o ônus econômico alcança cinco bilhões de dólares/ano. Calcula-se que o investimento anual dos governos dos países latino-americanos, visando o controle da doença de Chagas, é muito inferior à perda econômica causada por esta endemia (OPAS, 2006).

Dados mais recentes (WHO, 2013), entretanto, reduzem o número de indivíduos infectados no mundo para 8 milhões. Tal cenário deve ser tratado com

muita cautela, pois a população mundial aumentou nas últimas décadas e a ocorrência de surtos constantes de doença de Chagas em nosso país dificulta a explicação de uma diminuição tão brusca de indivíduos infectados por este protozoário (Castro, 2009). Uma possibilidade para a alteração dos dados estaria na diferença de sensibilidade entre os métodos de análise empregados (WHO 2002: 2007). Outro aspecto epidemiológico a ser abordado é que, na maioria dos casos (95%), a fase aguda da doença de Chagas passa despercebida pelo paciente ou pelo profissional de saúde (WHO, 2002), o que pode contribuir para a subnotificação dessa doença.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a continuidade da transmissão vetorial. Mesmo que a transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, principal vetor da doença de Chagas no Brasil, tenha sido controlada (WHO, 2002), o monitoramento da transmissão vetorial precisa ser permanente, pois ainda existem diversas espécies de triatomíneos potencialmente transmissores do *T. cruzi* em todo território brasileiro (Schofileld e cols, 2006; Teixeira e cols, 2006; Gurgel-Gonçalves e cols, 2012). Ademais, mesmo que a transmissão vetorial em uma determinada região seja controlada, as populações de animais silvestres podem transmitir a infecção para o homem pela contaminação direta com fluidos ou pela ingestão de alimentos contaminados.

1.3 Agente etiológico

1.3.1 Classificação taxonômica

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é um parasito flagelado pertencente ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Este parasito infecta mamíferos e tem como hospedeiro invertebrado diversas espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae. Os mecanismos de invasão celular, multiplicação e disseminação deste protozoário são essenciais em seu ciclo de vida. O modo em que o parasito se comporta em cada fase de seu ciclo evolutivo é um fator determinante para o curso da infecção (Chagas, 1909; Teixeira e cols, 2006).

1.3.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida deste parasito inicia-se a partir da ingestão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado. No intestino médio, o parasito se diferencia em forma epimastigota e lá começa sua divisão. Após o processo de divisão, o protozoário migra para o intestino posterior onde se transforma em tripomastigota metacíclico. Ao picar um novo hospedeiro, o inseto libera formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes após o repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas metacíclicas penetram a pele, iniciando a infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro mamífero. Em seguida, as formas tripomastigotas ganham a corrente circulatória e migram para diferentes tecidos onde invadem diferentes tipos celulares, mediante um mecanismo de fagocitose induzida (Fernandes & Andrews, 2012). Dentro das células do hospedeiro, tripomastigotas se transformam em amastigotas que se replicam por fissão binária a cada 15 a 18 horas. Seguindo diversos ciclos de divisão, amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que disseminam a infecção pelos tecidos (Teixeira e cols, 2011a). Eventualmente, as formas tripomastigotas e/ou amastigotas podem ser sugadas pelo inseto vetor e transmitidas para outros hospedeiros (Dvorak & Hyde, 1973; Cuervo e cols, 2010; Bern, 2011; Teixeira e cols, 2011b).

Sabe-se que, no corpo humano, o *T. cruzi* pode parasitar qualquer tecido derivado do mesoderma, endoderma e neuroectoderma embrionários. Entretanto, a intensidade do parasitismo pelo *T. cruzi* no corpo do hospedeiro pode variar de caso para caso, provavelmente dependendo das características genéticas do parasita e também do hospedeiro. Tecido conjuntivo, músculos liso e estriado, medula óssea, sistema fagocitário mononuclear e células das gônadas podem ser intensamente parasitados (Teixeira, 2007).

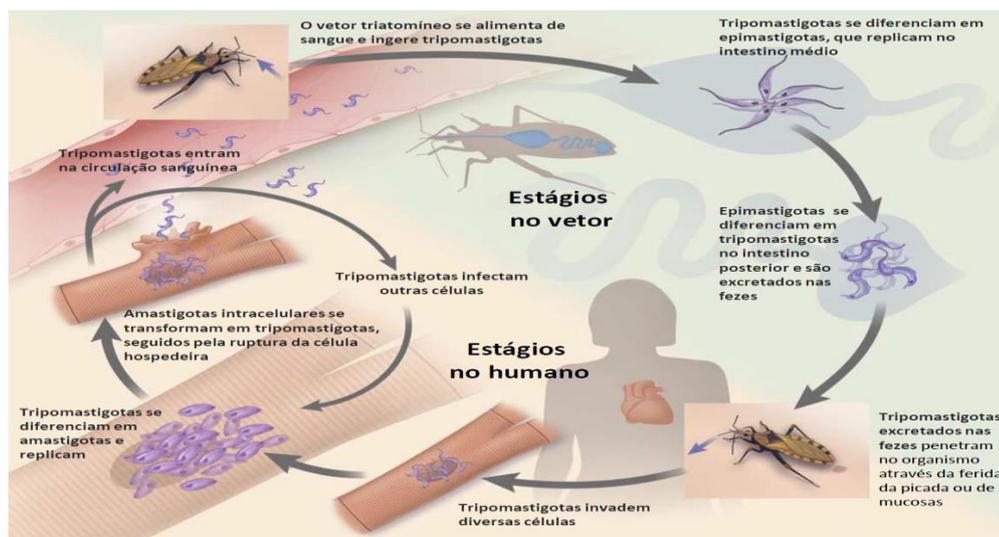


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro humano. Adaptado de Bern (2011).

1.3.3 Invasão celular e tecidual

O *T. cruzi* é um protozoário intracelular obrigatório com mecanismos de invasão bastante complexos. Formas tripomastigotas metacíclicas invadem o corpo de seu hospedeiro e normalmente infectam macrófagos, fibroblastos e tecido muscular (Andrade e cols, 1966; Epiting e cols, 2010). O parasito interage com moléculas específicas presentes nas células do hospedeiro e na matriz extracelular, a partir da interação de glicosilfosfatidilinositol, uma glicoproteína de superfície presente na membrana do parasito, com proteínas de membranas celulares das células do hospedeiro (Dvorak, 1984; Brown & Wanek, 1992; Zacks e Garg, 2006; Nagajyothi e cols, 2012).

O contato inicial do parasito com as células hospedeiras se dá a partir de moléculas de adesão, sendo as mais observadas a gp82 e a gp35/5 (Ramires e cols, 1993; Ruiz e cols, 1993). A partir do contato inicial, ocorre um processo de sinalização mediada por íons de cálcio no interior da célula hospedeira, dando início ao processo de invasão. No entanto, também já foram descritas outras moléculas com papel importante no processo de invasão do parasito a células, como a gp85, que se liga à fibronectina e outras proteínas de matriz extracelular; a serinoprotease oligopeptidase B, que libera uma substância solúvel envolvida no processo de sinalização aos íons de cálcio; a transialidase, que parece ter um papel na modulação da adesão do parasito a célula hospedeira; e a cisteínoprotease cruzipaína, cuja atividade proteolítica está ligada à capacidade de gerar bradicinina (Alves e cols, 1986;

Schekman e cols, 1993; Scharsfstein e cols, 2000; Alves & Colli, 2008; Teixeira e cols, 2011a).

1.3.4 Organização celular

Os tripanossomatídeos têm características peculiares quando se trata de sua organização celular. Estes protozoários possuem dois genomas, um presente no núcleo (nDNA) e o outro na mitocôndria, mais precisamente no cinetoplasto. Na porção da matriz mitocôndrial, localizada no corpúsculo basal há um arranjo complexo de fibrilas de DNA, formando uma estrutura denominada de cinetoplasto. Esta estrutura se encontra em forma de bastão perpendicular ao eixo do flagelo, no entanto a posição desta organela em relação ao núcleo varia nas diferentes formas do parasito (na porção anterior na forma epimastigota e porção posterior na forma tripomastigotas), mas está sempre localizada próximo ao corpo basal (Madison-Antenucci e cols, 2002; Ogbadoyi e cols, 2003).

O núcleo apresenta-se esférico com nucléolo grande e pequenas quantidades de heterocromatina, nas formas replicativas. Nas formas infectantes o nucléolo desaparece o núcleo se alonga e a quantidade de heterocromatina é aumentada (Elias e cols, 2001).

O flagelo único dos tripanossomatídeos é uma organela de extrema importância para esta classe de protozoário, pois é importante na locomoção, morfogênese e divisão celular (Ralston & Hill, 2008). O flagelo deste parasito emerge o corpo basal e é formado pelo axonema, no qual é composto de microtúbulos que conduzem o movimento flagelar. Além desta característica o flagelo dos tripanossomatídeos também possui uma estrutura peculiar denominada de haste paraflagelar ou haste paraxial (PRF), onde este é essencial para a sobrevivência do parasito. O flagelo é envolvido por uma membrana própria, sendo que grande parte do seu comprimento permanece ligada ao corpo celular principalmente na forma tripomastigota através da zona de ligação do flagelo, FAZ (*flagellum attachment zone*), uma rede de filamentos e conexões de membrana que une o flagelo ao longo corpo celular do parasito (Ralston & Hill, 2008).

A membrana plasmática deste parasito é coberta por um glicocálice delgado composto por diversos glicoconjugados. Um fator importante acerca destes conjugados é que a maioria destes está ligada a membrana por âncoras

glicosilfosfatidilinositol, sendo que diversas dessas moléculas de superfície estão envolvidas no processo de interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira (Heise e cols, 1996).

Outras organelas são importantes para a sobrevivência do *T. cruzi*, os glicossomos são organelas esféricas especializadas, com uma matriz homogênea, onde ocorre a maioria das reações da via glicolítica (Oppenheimer & Boerst, 1977). Também possuem uma estrutura vacuolar contendo depósitos eletrodensos denominados de acidocalcisomo, devido à capacidade desta organela de transportar prótons e cálcio (Docampo e cols, 2005). Os reservossomos são outras organelas importantes para o *T. cruzi*, e recebe este nome devido a capacidade de acumular material ingerido. É encontrada na região posterior na forma epimastigota, onde também concentra hidrolases ácidas, como a cruzipaina e serina proteases, sendo o principal sítio de degradação e regulação proteica neste parasito (Cazzulo e cols, 1997; De Souza e cols, 2009).

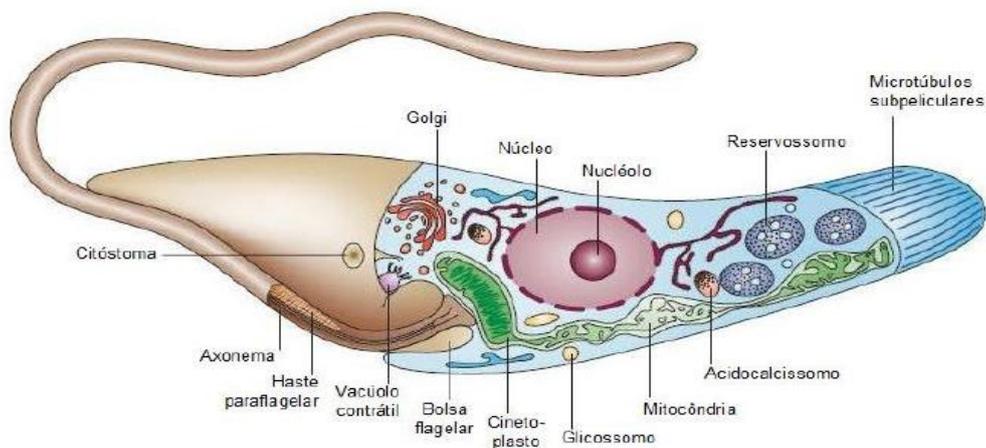


Figura 2: Organização celular de *T. cruzi* (forma epimastigota). Adaptado Docampo e cols, 2005.

1.3.5 Organização genômica

O DNA do cinetoplasto, também denominado de kDNA, possui estrutura bastante peculiar. O total de DNA do parasito (nDNA + kDNA) varia de acordo com as diferentes cepas e clones, existindo variação entre clones provenientes de mesma cepa. O genoma nuclear do *T. cruzi* é composto por seqüências de DNA que são agrupadas em três classes: seqüências que codificam proteínas, seqüências que codificam RNAs e seqüências repetitivas (Franco da Silveira, 2000).

As sequências repetitivas representam cerca de 40% do genoma nuclear e podem aparecer agrupadas ou dispersas no genoma nuclear. Estas cópias são provenientes de mecanismos de retrotransposição ou transposição. Com base nestes achados diversos autores sugerem que estes elementos podem estar envolvidos no rearranjo genético e no controle da expressão de genes em tripanossomas (Olivares e cols, 2000; Vásquez e cols, 2000).

No genoma do parasito, os genes codificadores de proteínas podem ser vistos em uma única cópia ou duplicados. A grande maioria destes genes codificadores de proteínas ou RNAs está presente em duas cópias, as quais podem ser localizadas em apenas uma região do cromossomo ou em cromossomos distintos. (Franco da Silveira, 2000). Este tipo de organização pode estar relacionado com mecanismos de transcrição do parasito. Além disso, a expressão gênica envolve processamento dos transcritos a partir de “*tras-splicing*” e editoração de RNA. Com a presença de promotores e RNAs polimerases pouco comuns. Estes dados levam a crer que o controle da expressão gênica no parasito deve agir principalmente em níveis pós-transcricionais (Gao e cols, 1998; Teixeira, 1998).

1.3.6. Núcleo

Os tripanossomatídeos apresentam características bem interessantes quanto aos processos que ocorrem no interior de seu núcleo, como transcrição e compactação do DNA, o que proporciona uma organização nuclear bastante diferente quando comparadas a outros eucariotos. O processo de transcrição do mRNAs é policistrônica: a RNA polimerase II parece não possuir promotores, de maneira que diversos genes são transcritos em um único RNA. Então, para que estes mRNAs maduros e independentes sejam formados, o RNA policistrônico deve sofrer *transsplicing*, adicionado um sequencia líder em sua extremidade 5' e poliadenilação na extremidade 3'. (Palenchar & Bellafotto, 2006).

A maneira que este processo ocorre dentro do núcleo do parasito também difere de outros eucariotos, nos quais são encontrados diversos pontos de transcrição espalhados por todo núcleo. Já no *T. cruzi*, o processo de transcrição ocorre no centro do núcleo. A replicação também se diferencia: em formas epimastigotas, a replicação

ocorre apenas na periferia nuclear, devido à migração de cromossomos da região central do núcleo para a periferia nuclear durante a fase S, permanecendo nesta região até o final da mitose (Cook, 1999; Elias e cols, 2002; Dossin & Schenkman, 2005).

1.3.7 kDNA

Um dos aspectos mais interessantes relacionado aos cinetoplastidas é a sua grande quantidade de DNA mitocondrial. No *T. cruzi*, o kDNA representa cerca 25% do DNA total deste protozoário. O material genético presente nesta organela está localizado dentro da matriz mitocondrial, próxima ao corpo basal (Lukes e cols, 2002; Lukes e cols, 2005; Simões-Barbosa e cols, 2006).

As diferenças entre o DNA nuclear e o DNA do cinetoplasto do parasito são representadas pela diferença de densidade, relação de base, grau de renaturação e pela composição circular do DNA do cinetoplasto. O kDNA é formado por uma rede de maxicírculos e minicírculos, topologicamente relaxados e interligados. Os maxicírculos apresentam de 40 a 50 cópias de DNA circular com 20 a 40 kb de tamanho e codificam genes mitocondriais que sintetizam proteínas do complexo respiratório e genes de rRNAs. Estes apresentam variações consideráveis em suas sequências tanto entre diferentes espécies de tripanossomatídeos, quanto entre cada linhagem (Leon e cols, 1980; Torri e cols, 1996; Westenberger e cols, 2006; Lukes e cols, 2005; Teixeira e cols, 2011b).

Os minicírculos possuem cerca de 15 mil cópias de DNA circular, com 1,4 kb de tamanho. Cada minicírculo é composto por quatro regiões conservadas de 120 a 160 pb, intercaladas por quatro regiões de sequência variável com 280 a 320 pb. São responsáveis pela transcrição de RNAs guias (gRNA), que auxiliam na editoração de mRNAs produzidos pelos maxicírculos (Lukes e cols, 2002; Teixeira e cols, 2011b).

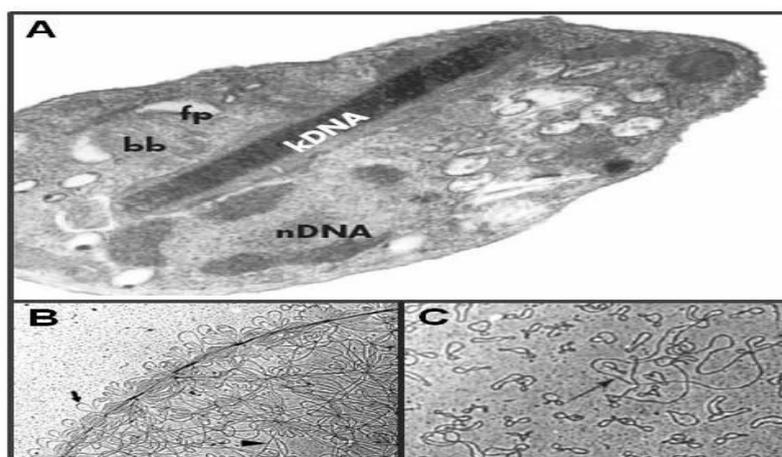


Figura 3. Estrutura do DNA do cinetoplasto. **A)** Microscopia eletrônica de um amastigota de *T. cruzi*, destacando as seguintes estruturas: núcleo (nDNA), cinetoplasto (kDNA), corpo basal do flagelo (bb) e o saco flagelar (fp). Microscopia eletrônica de uma rede de kDNA de *Crithidia fasciculata* mostrando: **B)** uma secção desta rede, com a seta indicando um minicírculo e com a ponta de seta indicando parte de um maxicírculo. **C)** a rede de kDNA decatenada pela topoisomerase II, apresentando os minicírculos e um único maxicírculo (seta). Adaptados, respectivamente, de Teixeira e cols (2006); Klingbeil e cols (2001); Liu e cols (2005).

1.4 Sintomas clínicos

As manifestações clínicas associadas à doença de Chagas são divididas em três fases: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda costumeiramente não causa nenhum sintoma ao indivíduo infectado, porém, em casos esporádicos, alguns pacientes apresentam febre, fraqueza muscular, sonolência, distúrbios respiratórios, cianose e um grande mal-estar. Dependendo do local de penetração do parasito, o indivíduo pode apresentar duas manifestações bem características, que são lesões cutâneas (chagoma de inoculação) e o sinal de Romaña, caracterizado pelo inchaço dos olhos em decorrência a uma reação de hipersensibilidade a antígenos do parasito (Barrett e cols, 2003; Teixeira e cols, 2006; Martins-Melo e cols, 2012).

A fase indeterminada da doença vem após a aguda e é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas. Esta fase é definida como silenciosa por vários anos (aproximadamente 37 anos). Nesta fase da doença, o paciente apresenta sinais sorológicos e parasitológicos positivos em testes específicos, porém sem nenhuma

alteração no sistema circulatório e no trato digestório (Andrade, 1999; Barret e cols, 2003; Teixeira e cols, 2011a).

Um terço dos pacientes infectados pelo *T. cruzi* irá apresentar sintomas durante a fase crônica. As principais características que são observadas são alterações cardíacas. Os pacientes apresentam sintomas como cansaço, edema, arritmias e hipertrofia da musculatura cardíaca, confirmadas pelo eletrocardiograma e pelo exame de Raio X. Outras manifestações observadas na fase crônica são as alterações no sistema digestivo, com dilatação e hipertrofia da parede do esôfago e do cólon (Bustamante, 2003; Teixeira e cols, 2006; Baranchuk e cols, 2012; Martins-Melo e cols, 2012).

1.5 Patogênese

Uma das questões mais discutidas em estudos sobre a doença de Chagas refere-se à determinação de sua patogênese. Na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, observa-se facilmente a presença das formas tripomastigotas no sangue de pacientes e de animais infectados. Porém quando analisados pacientes chagásicos crônicos, dificilmente se nota a presença dos parasitos, enquanto que um progressivo dano aos órgãos, como coração, esôfago e cólon, ocorre em 30-40% dos casos (Teixeira e cols, 2006; Gironès e cols, 2007). Uma das principais hipóteses acerca da patogênese da doença de Chagas foi associada diretamente à presença do *T. cruzi* nos tecidos de pacientes. De acordo com essa teoria, a divisão das formas amastigotas intracelulares causaria a ruptura mecânica da célula hospedeira. Além disso, essa hipótese sugere que as células inflamatórias que se infiltram no coração são importantes para atenuar as consequências das ações tóxicas de antígenos do parasito. A ausência do parasito nas lesões teciduais, entretanto, questiona essa teoria, uma vez que a grande maioria dos pacientes chagásicos crônicos que sucumbem à doença não mostram ninhos de amastigota em cortes histológicos do coração. Portanto, a incapacidade de demonstrar o parasito nos tecidos de pacientes com esta enfermidade representa a principal oposição à teoria da persistência do parasito (Higuchi e cols, 2003; Teixeira e cols, 2006; Teixeira e cols, 2011; Machado e cols, 2012).

Nas últimas décadas, a autoimunidade surgiu como um dos principais fatores responsáveis pela gênese das lesões cardíacas características da doença de Chagas crônica. O primeiro trabalho a esse respeito mostrou a destruição de células não parasitadas por células efetoras do sistema imune *in vitro* e *in vivo*. Diante da demonstração da rejeição acelerada de células cardíacas alogênicas pelos linfócitos imunes de coelhos cronicamente infectados por *T. cruzi*, ficou evidente a importância de mecanismos autoimunes na patogênese da Doença de Chagas (Santos-Buch & Teixeira, 1974).

A teoria da autoimunidade na Doença de Chagas foi corroborada por vários outros autores, que descreveram a participação de mecanismos de mimetismo molecular na gênese da patologia. As células B e T ativadas pela presença do *T. cruzi* reconheceriam proteínas próprias do tecido cardíaco, em decorrência da semelhança antigênica compartilhada por proteínas do parasito (Cunha-Neto e cols, 1995; Leon & Engman, 2001; Gironès e cols, 2007). Por exemplo, as lesões cardíacas presentes em pacientes com cardiopatia chagásica poderiam ser o resultado da resposta efetora de células contra a miosina cardíaca, disparada por reconhecimento autoimune. Esse fato ocorreria devido ao mimetismo molecular entre a miosina cardíaca e a proteína B13 presente no *T. cruzi* (Bilate & Cunha-Neto, 2008).

Outro mecanismo que poderia explicar a autoimunidade seria por ativação *bystander*. Este fenômeno ocorre quando há exposição antigênica devido a um dano tecidual e consequente ativação das células imunes. Este processo pode acontecer devido à lise das células miocárdicas pelo *T. cruzi*. A citólise leva à liberação de proteínas próprias proporcionando um ambiente proinflamatório, que resulta na ativação de células T auto reativas (Leon & Engman, 2001; Sfriso e cols, 2010).

A partir destes achados, o Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC) vem, ao longo de mais de duas décadas, investigando os mecanismos associados à autoimunidade da Doença de Chagas (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a). Utilizando técnicas de citogenética Teixeira e cols, em 1991 observaram a presença de DNA do *T. cruzi* ligado ao DNA de macrófagos peritoneais de camundongos infectados. Em 1994, Teixeira e cols, mostraram que sequências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* se integram no genoma de macrófagos humanos em cultura de células. Novos trabalhos foram

publicados demonstrando a integração das sequências de minicírculos de kDNA em elementos retrotransponíveis do genoma de aves, coelhos e humanos (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011a).

1.6 Resposta imunológica contra o *T. cruzi*

A infecção pelo *T. cruzi* acomete diversos hospedeiros apesar dos níveis de resistência natural serem diferentes. No entanto, o mecanismo natural de defesa contra o parasito mais importante é a fagocitose. Formas tripomastigotas metacíclicas se replicam no interior de macrófagos, apesar de muitos parasitos serem destruídos no vacúolo fagocítico. Amastigotas em fase de diferenciação se transformam em tripomastigotas, escapam para a corrente sanguínea, infectando qualquer outra célula do hospedeiro. A ativação de macrófagos por diferentes citocinas é o principal mecanismo no controle da infecção por este parasito. Trabalhos descrevem que o tratamento de macrófagos com INF- γ causa a morte de formas amastigotas *in vitro* (Teixeira, 1987; Golden & Tarleton, 1991; Teixeira e cols, 2011a).

A produção de óxido nítrico (NO) também pode ser umas das formas de proteção contra infecção pelo *T. cruzi*, pois, ao início da infecção, células NK produzem INF- γ e direcionam o parasito a um mecanismo de morte ao induzir a síntese de NO nas células microcíticas. Além do INF- γ , TNF- α também induz a ativação de macrófagos sendo outra linha de ataque contra o parasito (Silva e cols, 1991; Sardinha e cols, 2006; Melo e cols, 2012).

Uma das vias de resistência a infecções pode ser caracterizada a partir da produção de citocinas, que atuam como mediadores da imunidade natural. Elas são estimuladas por agentes infecciosos, pelos fagócitos mononucleares e pelos estímulos em resposta a antígenos específicos pelos linfócitos T. Isso promove o crescimento, diferenciação e ativação de linfócitos que estão diretamente relacionados à resistência a microrganismos e as lesões relacionadas a infecções (Teixeira e cols, 2011a). Diversos autores sugerem que o padrão de resistência à infecção por *T. cruzi* relaciona-se com o perfil de citocinas produzido pelo hospedeiro, principalmente citocinas com padrão Th1 que são altamente ligadas a fatores de proteção, logo este padrão de resistência estaria ligada a citocinas tais como INF- γ ,

TNF- α , e IL-2, enquanto TGF- β , IL-4 e IL-10 promoveriam suscetibilidade ao hospedeiro adquirir a infecção, devido a capacidade destas citocinas de inibirem a ativação de macrófagos (Silva e cols, 1992; Minoprio, 1993; Savino, 2007).

Outro fator importante em relação ao processo de defesa contra este parasito é a resposta mediada por linfócitos TCD4 e TCD8, pois estes ativam diferentes mecanismos efetores frente ao *T. cruzi*. Citocinas secretadas por células T CD4 Th1 desempenham um papel protetor contra o parasito como a produção de INF- γ , além de auxiliar os linfócitos B na produção de anticorpos específicos, onde desempenham um papel fundamental na eliminação do parasito extracelular, os anticorpos que se destacam são os de classe IgM, IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b. Estas imunoglobulinas agem no processo de defesa no sangue e tecido propiciando a remoção das formas tripomastigotas por células fagocíticas mononucleares que expressam receptores para a porção Fc de IgG (Alcantara & Brener, 1978; Takehara e cols, 1981; Abrahamson, 1998; Kumar & Tarleton, 1998; Martin e cols, 2006; Dos Santos e cols, 2011; Teixeira e cols, 2011a; Flores-Garcia e cols, 2012).

As células TCD8, além de exercerem uma ação citotóxica contra células do hospedeiro, têm sido consideradas como um importante mecanismo de defesa contra o parasito, principalmente na fase aguda da infecção, onde, juntamente com macrófagos e INF- γ , têm sido apresentadas como elemento de controle de disseminação do parasito (Brener & Gazzinelli, 1997; Teixeira e cols, 2006; Perez e cols, 2012).

1.7 Diagnóstico

O primeiro diagnóstico feito da infecção pelo *T. cruzi* aconteceu no ano de 1909 por Carlos Chagas, ao analisar um esfregaço sanguíneo de uma menina de três anos de idade. Atualmente, várias técnicas de diagnóstico são utilizadas para detectar a infecção pelo *T. cruzi*. Na fase aguda, o diagnóstico pode ser feito pela pesquisa de parasitos no exame microscópico do sangue fresco, pelo teste de hemocultura e pelo xenodiagnóstico (Lana & Tafuri, 2000; Luquetti & Rassi, 2000; Portella-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003). Na fase crônica, caracterizada pela baixa parasitemia, são empregados preferencialmente os testes de pesquisa de anticorpos específicos contra

o *T. cruzi*, como o ELISA, a imunofluorescência indireta e a hemaglutinação indireta. Além dos exames sorológicos, os testes moleculares são amplamente utilizados para identificar a presença de DNA do parasito (Luquetti & Rassi, 2000; Brener & Barral-Neto, 2000, Andersson, 2004; Teixeira, 2007; Hecht e cols, 2010).

A organização Mundial de Saúde recomenda a realização de três testes sorológicos com princípios diferentes, e o diagnóstico positivo é obtido quando a identificação de anticorpos anti- *T. cruzi* se der em dois ou mais testes. Contudo, os testes imunológicos apresentam algumas limitações, produzindo eventualmente resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas geradas por semelhança antigênica compartilhada entre microrganismos evolutivamente próximos, como é o caso do *T. cruzi* e das diferentes espécies de *Leishmania* (Vexanat e cols, 1996; Gadelha e cols, 2003; Coura & Borges-Pereira, 2012; Berrizbeitia e cols, 2012).

Em decorrência das restrições apresentadas pelos testes sorológicos, foram desenvolvidas ferramentas moleculares para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*. Os testes moleculares utilizam sequências aneladoras de DNA nuclear (nDNA) e DNA mitocondrial (kDNA) do parasito por meio de uma Reação de Polimerização em Cadeia (PCR). A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade quando respeitados os parâmetros de padronização e controle de qualidade dos reagentes utilizados. Os *primers* mais utilizados para o diagnóstico da infecção do *T. cruzi* são os que anelam na região conservada dos minicírculos de kDNA. Amplamente utilizados em laboratórios de referência, os *primers* de kDNA s35/36 (Sturm e cols, 1989) amplificam um produto de 330 pb e seus catâmeros, sendo considerados os aneladores mais sensíveis, capazes de detectar 0,015 fg de DNA do parasito. O DNA nuclear (nDNA) do parasito também pode ser alvo para a amplificação de DNA repetitivo do *T. cruzi*. Os *primers* mais utilizados para a amplificação de nDNA são Tcz1/Tcz2, descritos por Moser e cols, 1989. Estes *primers* produzem uma banda de 188pb e seus catâmeros, referentes à amplificação de uma sequência de microssatélite que corresponde a 9% do DNA nuclear do parasito.

1.8 Tratamento

Vários estudos em relação ao tratamento da doença de Chagas foram feitos até se chegar ao medicamento preconizado. Na década passada, mais de 30

compostos foram testados como agentes terapêuticos contra o *T. cruzi*, dentre os quais os que mais se destacaram no intuito de eliminar a parasitemia foram os derivados de nitrofuranos e, posteriormente, as nitrofurazonas. Experimentos feitos com animais utilizando a nitrofurazona 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona, administrada por via oral num período de 53 dias, mostrou a cura em 95,4 % destes animais, porém quando utilizado em humanos, este medicamento apresentou severa toxicidade, o que fez que seu uso na terapia clínica fosse interrompido (Coura e cols, 1961; Coura e cols, 1962; Cançado e cols, 1964; Brener, 1968; Navarro e cols, 2012; Pinazo e cols, 2012).

Uma década após os testes com nitrofuranos e nitrofurazona, dois novos compostos com atividade tripanocida foram testado tanto *in vitro* quanto *in vivo* com efeitos promissores para o tratamento desta enfermidade. O nifurtimox, 3-metil-4(5-nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4H-1,4-tiazida-1,1-dióxido, que começou a ser comercializado com o nome de Lampit®, logo teve sua autorização para comercialização descontinuada no Brasil e em diversos outros países da América Latina. Há também o benzonidazol (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida), que é comercializado como Rochagam®. Contudo não foi comprovada a eficiência desta droga na fase crônica da doença, pois as lesões encontradas no coração de pacientes chagásicos não se alteram, logo esta droga se mostra eficaz na diminuição da parasitemia somente na fase aguda, onde a intensidade da infecção é mais severa (Lauria-Pires e cols, 2000; Teixeira e cols, 2006; Caldas e cols, 2008; Fuentes e cols, 2012; Santos e cols, 2012; Fabbro e cols, 2013).

Além disso, devido a aspectos bioquímicos, a utilização do benzonidazol não afeta apenas o parasito, mas também os pacientes que recebem o tratamento. Pacientes no uso deste medicamento apresentam reações de hipersensibilidade como dermatites, erupções cutâneas, edemas e dores articulares e musculares; alterações hematológicas graves como neutropenia, agranulocitose, púrpura trombocitopênica e em casos mais severos depressão da medula óssea, além de danos neurológicos periféricos e polineuropatias (Docampo, 1990; Courae De Castro, 2002 Irigoien e cols, 2008; Santos e cols, 2012). Além dessas alterações, efeitos mutagênicos são observados devido à produção de radicais livres e metabolitos sobre o DNA. Trabalhos em animais também já demonstraram que o uso deste medicamento causa o aparecimento de tumores malignos, sendo assim um dos

efeitos mais severos desta droga no tratamento desta enfermidade. Por esse motivo, o FDA proibiu a comercialização do benzonidazol nos Estados Unidos (Walton & Workman, 1987; Ferreira e cols, 1988; Teixeira e cols, 1990; Teixeira e cols, 1990a; Santos e cols, 1994; Andrade e cols, 2003).

1.9 Vias clássicas de transmissão

1.9.1 Transmissão vetorial

A principal via de transmissão deste protozoário é a vetorial, que se dá a partir do contato do hospedeiro com fezes contaminadas por tripomastigotas metacíclicos após o repasto sanguíneo do vetor. Os vetores são insetos hematófagos conhecidos com barbeiros pertencentes à família *Ruduviidae* e subfamília *Triatominae*. Há 145 espécies de triatomíneos conhecidas no mundo, sendo que 64 destas espécies são encontradas no Brasil, no entanto apenas algumas espécies podem transmitir o *T. cruzi*, fazendo com que o controle e a erradicação da transmissão vetorial seja extremamente dificultados em áreas endêmicas (Moncayo, 2003; Abad-Franch & Monteiro, 2005; Gurgel-Gonçalves e cols, 2012; Hashimoto e cols, 2012).

Dentre as várias espécies de triatomíneos que se destacam na transmissão do *T. cruzi* pode-se citar o *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* como os principais vetores na América Latina. Há espécies que são facilmente encontradas em ambientes domiciliares como o *Triatoma infestans*, enquanto outras espécies habitam os ambientes peridomiciliares ou silvestres. Em alguns países da América Latina o *Triatoma dimidiata* é encontrado em casas da área urbana em pequenas colônias, na área rural pode ser encontrado entre pedras ou tocas de animais onde se alimentam, no peridomicílio pode ser encontrado em montes de lenha, matérias de construção ou galinheiros, podendo se alimentar de diferentes fontes aumentando assim a possibilidade de se infectar pelo *T. cruzi* ou outra espécie de *Trypanosoma* (WHO, 1991; Schofield, 1999; Noireau, 2009)

As espécies com maior significado epidemiológico são aquelas que estão adaptadas ao ambiente domiciliares, que participam da transmissão e que possuem alta dispersão no meio ambiente. Em alguns países da América do Sul como Brasil e

Argentina, os vetores com maior relevância são o *Triatoma infestans* e o *Panstrongylus megistus*, estas espécies são especialmente encontradas no nordeste brasileiro. No entanto, diversas espécies podem ter um papel importante na transmissão deste protozoário, como *Triatoma brasilienses*, *Triatoma pseudomaculata* e *Rhodnius nasutus* (Costa, 1999; Costa e cols, 2002).

1.9.2 Transmissão transfusional

A transmissão transfusional é a principal via de infecção em países fora da América Latina, com muitos casos descritos na Espanha, França, Suíça e Canadá. Além disso, estima-se que mais de 200 mil pessoas estejam infectadas nos Estados Unidos (Bonney & Engman, 2008; Castro, 2009; Sánchez & Ramírez, 2012; Irueta e cols, 2012).

A possibilidade da transmissão transfusional foi especulada inicialmente em 1936 e, posteriormente, confirmada no Brasil em 1952. Esse tipo de transmissão se deu a partir do processo de industrialização do Brasil, na década de 1950, que promoveu a migração da população do campo para as grandes cidades. Diante desse processo, veio o aumento de doadores chagásicos nos bancos de sangue (Mazza, 1936; Freitas e cols, 1952; Schmunis e cols, 1991).

A alta prevalência de indivíduos chagásicos nos grandes centros urbanos associada à falta de programas de controle e técnicas eficazes para detecção da doença fez que essa via de transmissão fosse responsável, na década de 1970, por aproximadamente 20 mil novos casos anuais da doença apenas no Brasil. Diante do controle da transmissão pela via vetorial, a transmissão transfusional se tornou mesmo em alguns países endêmicos e, principalmente, em não endêmicos, o principal mecanismo de disseminação da doença ao longo das décadas de 1980 e 1990 (Dias, 1991; Moraes-Souza & Ferreira-Silva, 2011).

Em países não endêmicos, a real ocorrência de transmissão por essa via não é conhecida, pois, em muitos casos, a infecção passa despercebida ou o *T. cruzi* não foi identificado como o agente etiológico. Nos EUA e Canadá, foram notificados sete casos de transmissão do parasito por transfusão e cinco casos após transplantes, segundo dados da American Association of Blood Banks (AABB, 2006; Perez de Pedro e cols, 2008; Flores-CHazes e cols, 2008; Pereira e cols, 2011). Já na Espanha, foram

descritos pelo menos três casos de transmissão transfusional (AABB, 2006; Perez de Pedro e cols, 2008; Flores-Chazes e cols, 2008; Pereira e cols, 2011).

1.9.3 Transmissão oral

O primeiro relato da transmissão oral do *T. cruzi* em humanos foi descrito em 1936 por Mazza e cols, a partir da ingestão do leite materno. Após este achado, diversos autores demonstraram a presença do parasito no leite de modelos experimentais (Ferreira e cols, 2001). Em 1991 e 1996, trabalhos conduzidos em um povoado indígena do Equador mostraram, por meio de testes sorológicos, que 6% de um população de 1001 indígenas estavam com resultados positivos. A partir desses resultados, os pesquisadores sugeriram a possibilidade da infecção ter sido adquirida por via vetorial ou pela via oral, a partir da ingestão de carne de animais silvestres (Amúnarriz e cols, 1991; Aguilar & Yépes, 1996; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).

Em 2007, observou-se uma microepidemia por transmissão oral em uma escola na cidade de Chacao, Venezuela. Funcionários e alunos do colégio haviam ingerido um suco de goiaba produzido em condições inadequadas, sendo que insetos vetores foram encontrados próximos ao local do processamento do suco. Dos 128 casos notificados, 58 eram jovens com menos de 18 anos de idade que apresentaram sintomatologia característica de fase aguda da doença. Do total, 12 pacientes foram hospitalizados e, dentre estes, houve um óbito (Villalobos, 2007; Miles, 2010; Noya e cols, 2010).

Na Colômbia, também ocorreram casos de possível transmissão oral do *T. cruzi*: seis soldados de um grupamento militar que haviam ingerido carne contaminada desenvolveram manifestações clínicas de DCA. Carceres e cols, em 1999, registraram a doença cardíaca em 13 habitantes do povoado de Guamal, onde animais silvestres infectados foram coletados em palmeiras próximas às residências. A suspeita levantada pelos pesquisadores é de que o *vinã de palma*, uma bebida típica da região, poderia estar contaminado (Hernández e cols, 2008). Ainda na Colômbia, em 2008, 10 pessoas se contaminaram a partir da ingestão de um suco de tangerina contaminado pelo parasito (Hernández e cols, 2009)

No Brasil, ocorreram diversas notificações devido à ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*. Os prováveis primeiros casos de transmissão oral no Brasil foram notificados em 1968 no Rio Grande do Sul, a partir da ingestão de verduras contaminadas. Anos após este ocorrido, um surto ocorreu na cidade de Catolé (PB) em uma festa comemorativa de bodas de ouro onde a possível fonte de contaminação foi o caldo de cana e outros alimentos servidos na festa. No entanto, a via oral teve seu maior destaque no ano de 2005, a partir de uma microepidemia em Santa Catarina. Nesse episódio, foram notificados ao Ministério da Saúde 45 casos de DCA, relacionados à ingestão de caldo-de-cana. Entre os anos de 2005 e 2007, SVS/MS havia recebido 22 notificações de possíveis surtos de DCA em diversos Estados, a partir da ingestão de alimentos *in natura*, como caldo-de-cana, e açaí (Silva e cols, 1968; Coura, 1997; Ianni & Madt, 2005; Dias, 2006).

Ainda em 2006 ocorreram diversas microepidemias nos Municípios de Macaúbas e Ibipitanga no Estado da Bahia, no primeiro caso uma família inteira foi infectada pelo parasito, sendo que foram constatados dois óbitos, onde a via de contaminação também seria a água contaminada com fezes de triatomíneos (Dias e cols, 2006).

1.9.4 Transmissão congênita

As primeiras suspeitas a cerca desta forma de transmissão foram descritas em 1911 por Carlos Chagas em um dos seus relatos clínicos. Porém, o primeiro caso de transmissão vertical do protozoário em humanos foi comprovado por Dao (1949). Posteriormente, vários artigos relataram a ocorrência dessa via de transmissão, principalmente em áreas endêmicas. (Moya e cols, 2005; Sánchez & Ramírez, 2013). A transmissão congênita do *T. cruzi* pode causar aborto, nascimento prematuro ou lesões fetais em órgãos como fígado, baço, coração e sistema nervoso central. De acordo com a Organização Panamericana de Saúde (OPAS), estima-se que, na América Central e do Sul, mais de 14 mil casos de transmissão congênita são notificado por ano (Sánchez & Ramírez, 2013). Estima-se que a taxa de transmissão do *T. cruzi* por via transplacentária seja de 3 a 8%, podendo alcançar até 30% em determinadas regiões (Carlier & Torrico, 2003). De interesse, há relatos de doença de

Chagas transmissão congênita da infecção na Europa, Ásia e Estados Unidos (Carabarin-Lima e cols, 2013).

Existem vários fatores que influenciam para que ocorra a infecção congênita: tempo, pois com o aumento das semanas de gestação o risco de infecção é menor; parasitemia, o risco de infecção é mais elevado em mulheres grávidas na fase aguda da doença; alteração na barreira materno-fetal. Estes três fatores aumentam bastante a possibilidade de ocorrer a transmissão vertical do *T. cruzi* (Carlier, 2005; Sánchez & Ramírez, 2013). Outro aspecto importante em relação à gestante infectada pelo *T. cruzi* é a falta de tratamento específico, pois o benzonidazol, medicamento preconizado pela OMS, apresenta ação tóxica e teratogênica (Sánchez & Ramírez, 2012).

1.9.5 Transmissão sexual

A questão da transmissão sexual da doença de Chagas é um assunto discutido desde sua descoberta, entretanto há poucos trabalhos publicados. O primeiro relato foi feito por Vianna (1911), quando observou que os testículos são afetados pelo *T. cruzi*, descrevendo diversas alterações histológicas. Estudos feitos em cortes histopatológicos de um menino de 18 meses de idade e de uma menina de 4 meses de idade, que sucumbiram à doença de Chagas aguda, revelaram ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* dentro de células de gonioblastos de tubos seminíferos dos testículos e de células da teca dos ovários (TEIXEIRA, 1970). Dias, em 1979, sugeriu que a presença de *T. cruzi* no sangue menstrual poderia ser uma possibilidade de transmissão.

Outros estudos puderam verificar a colonização do trato urogenital de cobaias pelo *T. cruzi*. Camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* apresentaram uma grande quantidade de parasitos nos ovários, testículos, células intersticiais e túbulos seminíferos. A migração do *T. cruzi* para o fluido seminal pode ocorrer pela contração das células mióides, havendo a liberação de formas amastigotas para os ductos seminíferos (Gonçalves da Costa e cols, 1986; Carvalho e cols, 1991, Carvalho e cols, 2009). Em 1996 e 1998, estudos feitos por Lenzi e cols, descreveram a presença de *T. cruzi* na vagina, útero, teca do ovário, mesovário, epidídimo, células de Leydig, vesícula seminal, ductos deferentes, próstata, uretra de animais infectados.

Outros trabalhos sugerem a possibilidade de transmissão do *T. cruzi* mediante o acasalamento, uma vez que o parasito pode atravessar a mucosa vulvovaginal e o pênis não representa uma barreira contra o *T. cruzi*, devido sua fragilidade, frequentes erosões e microfissuras (Storino e Jorg, 1994; Lenzi e cols, 1998).

Alencar e cols, (1987) investigaram a possibilidade da transmissão da doença de Chagas pelo sêmen. Inicialmente, infectou camundongos com sêmen proveniente de animais infectados, e os resultados mostraram um percentual de infectividade de 91,3 %. A análise histopatológica do coração evidenciou a miocardite e a presença de ninhos de amastigota. Posteriormente, foram introduzidos sêmen e sangue contaminados sobre a mucosa vaginal de camundongos saudáveis, obtendo 100% de positividade. Em 2010, Hecht e cols, demonstraram a presença de DNA nuclear do parasito no sêmen de indivíduos infectados, fortalecendo a hipótese de transmissão via sexual do *T. cruzi*.

1.10 Controle e prevenção

Devido a falta de medicamentos eficientes no processo de cura da doença de Chagas e da ausência de profilaxias efetivas contra a infecção pelo *T. cruzi*, as medidas de controle desta enfermidade focam o nível primário de prevenção, sendo as principais vias de transmissão a vetorial e a transfusional, estas atividades de controle voltaram-se no sentido de interromper esses mecanismos por meio do combate aos vetores e o controle de bancos de sangue (Dias, 1993; Schofield, 1994; Dias & Schofield, 1999; Dias, 2007; Dias, 2009).

Com o êxito na redução da transmissão vetorial que ocorreu na década de 80 o número de doadores de sangue infectados também diminuiu, assim como o número de mulheres em idade fértil infectadas, refletindo positivamente na diminuição das transmissões transfusional e congênita (Dias, 2009).

A doença de Chagas é a quarta maior causa de mortes no Brasil superando as mortes decorrentes da infecção pelo vírus HIV e não ultrapassando apenas hepatite B, hepatite C e sífilis. Com isso foi criado em 2008 a Rede Global para Eliminação da doença de Chagas, este programa tem como objetivo combater e alertar sobre os

riscos da doença e estender a conscientização para todo o mundo, incluindo países não-endêmicos, não qual há relatos a cerca desta enfermidade (FIOCRUZ, 2011).

A doença de Chagas por se tratar de um patologia que há uma subnotificação dos casos devido a falta de sintomas de um indivíduo infectado. Em regiões endêmicas para o vetor transmissor medidas secundárias podem ser utilizadas para o melhor controle desta enfermidade, como o tratamento quimioterápico. As fontes que mais contribuem para a notificação são os bancos de sangue e os inquéritos soro-epidemiológicos que, dependendo da população estudada, em especial do grupo etário, pode levar a identificação de casos agudos e/ou crônicos, contribuindo assim para o tratamento desta patologia (MS, 2009).

1.11 O modelo murino no estudo da doença de Chagas

Roedores de pequeno porte são corriqueiramente utilizados como animais de laboratório em estudos para analisar o perfil imunológico e a patologia associada à doença de Chagas. Em especial, camundongos (*Mus musculus*) têm sido os animais escolhidos em estudos sobre a interação parasito-hospedeiro no curso da infecção experimental de diferentes linhagens de *T. cruzi*. (Araujo-Jorge & Castro, 2000). A infecção por *T. cruzi* em camundongos oscila de acordo com as características genéticas tanto do parasito quanto do hospedeiro. O progresso da infecção neste modelo experimental é bem característico, onde, na fase aguda da infecção, pode ocorrer a morte do animal logo nas primeiras semanas. Quando o animal não vem a óbito, os sintomas são imperceptíveis, porém ocorre a formação de ninhos de amastigotas na musculatura esquelética e em outros tecidos, como testículos (Brenner, 1973). A infecção do *T. cruzi* em camundongos produz pico de parasitemia entre 9 e 45 dias. As discrepâncias observadas nos resultados podem ser explicadas pela falta de padronização nos experimentos histopatológicos (Olivieri e cols, 2005; Sá, 2008; Medeiros e cols, 2009). Quando o camundongo atinge a fase crônica, pode ser observada a presença de cardiopatia, focos inflamatórios, dano tecidual e preenchimento de áreas danificadas por tecido fibroso (Dos Santos e cols, 2011).

A importância de se utilizar o camundongo como modelo na doença Chagas experimental se dá devido a características similares ao homem, como mecanismos

fisiológicos, bioquímicos, imunológicos e patológicos. Além disso, há a possibilidade de se analisar o curso da doença e suas formas de transmissão em um período curto, diferentemente do que ocorre no homem, onde os sinais e sintomas normalmente surgem após anos (Brener, 1973; Burleigh & Andrews, 1995).

2. Justificativa

Pesquisas feitas em camundongos, cavalos e coelhos demonstraram que algumas espécies de tripanossomatídeos são capazes de serem transmitidas por via sexual. Em relação ao *T. cruzi*, não existem relatos que demonstrem essa via de transmissão. Assim, a possibilidade de o *T. cruzi* ser transmitido por via sexual merece ser melhor analisada. Estudos preliminares desenvolvidos no LMPDC/UnB demonstraram a presença de ninhos de amastigotas nos ovários e testículos de camundongos infectados pelo parasito. Em dois casos humanos de doença de Chagas aguda foram identificadas amastigotas do *T. cruzi* em divisão no lúmen de tubos seminíferos de testículos e em células da teca do ovário.

Em vista dessas observações, foi sugerida a possibilidade de o sêmen apresentar as formas do parasito, podendo ocorrer transmissão do protozoário pela via sexual. Esse campo de pesquisa ainda não foi explorado de forma sistemática visando elucidar a pergunta: O *T. cruzi* pode ser transmitido por via sexual?

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Verificar a possível transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a presença do parasito no sangue e nos tecidos dos animais infectados e seus parceiros sexuais por testes parasitológicos (PCR e hemocultura);
- Detectar a presença de anticorpos específicos contra o *T. cruzi* em animais infectados e seus parceiros sexuais mediante testes sorológicos;
- Demonstrar a presença do *T. cruzi* em tecidos de animais infectados e de seus parceiros sexuais mediante análises histopatológicas;
- Confirmar a transmissão sexual seguida de transmissão congênita do *Trypanosoma cruzi* a partir das fêmeas sadias cruzadas com machos infectados.
- Avaliar a transmissão do *T. cruzi* a partir da infecção de camundongos fêmeas com sêmen de paciente infectado

4. Material e métodos

4.1 Grupo experimental

Para a formação dos casais que participaram dos experimentos de transmissão sexual, foram utilizados 20 camundongos do tipo BALB/c com idade entre 21 e 30 dias. Os animais foram agrupados da seguinte maneira: **grupo A)** machos infectados e fêmeas saudáveis (casais A a E) numerados de 1 a 10; **grupo B)** fêmeas infectadas e machos saudáveis (casais F a J) numerados de 11 a 20; **grupo C)** controle negativo; **grupo D)** controle positivo; **grupo R)** repetição do grupo B.

Visando a confirmação da ocorrência de transmissão sexual entre os parentais, também foram avaliados 35 filhotes nascidos após três gerações dos casais do grupo A. Ademais, foram incluídos mais 2 fêmeas, as quais receberam sêmen de paciente chagásico para avaliar a possibilidade da transmissão a partir desta amostra.

Todos os procedimentos realizados foram avaliados e autorizados pelo Comitê de Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília com número de protocolo 10411/2011.

4.2 Cultura do *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas foram mantidas em cultura de células cardíacas murinas da linhagem L6, cultivadas com Meio Mínimo Essencial (DMEM), pH 7.2 acrescido de Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina sob atmosfera de CO₂ a 5% e à temperatura de 37°C.

4.3 Infecção dos camundongos

Camundongos machos e fêmeas BALB/C, do alojamento de animais da Faculdade de Medicina da UnB, pesando em média 23 g, foram infectados com 5x10³ formas tripomastigotas de *T. cruzi* por via intraperitoneal. As parasitemias dos animais

foram analisadas a cada 7 (sete) dias a partir do 1º dia após a infecção. Foram contados os parasitos em 5 μ L de sangue diluído em salina.

4.4 Infecção com sêmen humano

Camundongos fêmeas foram infectadas com uma alíquota de sêmen, coletado de um jovem com 16 anos de idade, com sorologia negativa e PCR de nDNA positiva. A amostra foi inoculada na vagina das fêmeas no volume de aproximadamente 500 μ L, e após dois meses foi coletado secções de diferentes órgãos para análise histopatológica, segundo descrito por Alencar (1991).

Todos os procedimentos realizados foram avaliados e autorizados pelo Comitê Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília com protocolo: FM/UnB 11163 CONEP/MS 2525006.167567/2004-28.

4.5 Pesquisa a fresco do *Trypanosoma cruzi*

A pesquisa a fresco do parasito foi realizada a partir da contagem no sangue coletado da cauda dos camundongos. Padronizou-se o período da manhã para a contagem de tripomastigotas do sangue após 7 dias de infecção. Neste experimento a contagem de parasitos em 5 mm^3 de sangue foi feita em 50 campos microscópicos de objetiva 400 X de acordo com a técnica descrita por Brener (1962).

4.6 Hemocultura

A hemocultura foi realizada segundo a técnica descrita por Chiari e cols, (1989) com modificações devido ao pequeno volume de sangue coletado dos camundongos por punção intraocular. Foram semeados 50 μ L de sangue em meio LIT enriquecido com ágar sangue. O sangue dos camundongos foi colocado em tubos contendo ágar sangue à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se mais 3 mL de meio LIT a cada um dos tubos. Devido à pouca quantidade de sangue coletado dos camundongos, as análises das hemoculturas forma feitas a cada quinze (15) dias. Cerca de 50 μ L de sangue foi colocado em um lâmina e observado em microscópio no aumento de 400X.

4.7 Extração de DNA total de *T. cruzi*

Com o intuito de obter DNA total do *T. cruzi* para uso como controle positivo na reação de PCR, formas epimastigotas de *T. cruzi* foram sedimentadas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 min a 4°C, lavados duas vezes com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl) nas mesmas condições de centrifugação e o sedimento ressuspense em tampão de lise (Tris-HCl 1mM pH 8,0; EDTA 0,1M pH 8,0; SDS 0,5%). A esta solução foram acrescentados proteinase K (100 µg/mL), ficando incubado a 37°C por 12 h. Após a incubação, o DNA foi purificado com duas extrações com clorofane e uma extração de clorofil, todas em volumes iguais. Finalmente, o DNA foi precipitado com 2,5 v de etanol absoluto gelado e 1/10 v de acetato de sódio 3,0 M, pH 4.7. O DNA foi lavado duas vezes com etanol a 70% gelado, secado à temperatura ambiente e ressuspense em tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). O DNA foi guardado a -20 °C até o momento do uso (Sambrook e cols, 2001).

4.8 Extração de DNA dos camundongos

De cada camundongo foi coletado 200 uL de sangue por via intracardíaca seguindo todos a normas do Comitê de Ética Animal. A extração foi realizada com o Kit Mini Spin Plus da Biopur, de acordo com instruções do fabricante. Às amostras, foram adicionadas tampão de lise e proteinase K no volume de 200 uL e 20 uL, respectivamente. Em seguida, foi adicionado 400 uL de tampão B6 e posteriormente submetidos a dois processos de lavagem com Tampão de Lavagem (800 uL). Posteriormente foi adicionado 200 uL de Tampão de Eluição aquecido a 56 °C. Após o processo de extração as amostras foram armazenadas a 4 °C para futura utilização.

4.9 Quantificação e análise eletroforética do DNA

As amostras de DNA foram quantificadas no aparelho Nanovue (GE life science). A qualidade do DNA extraído foi testada a partir de PCR utilizando *primers* para o gene da β -actina e a visualização dos produtos amplificados foi feita pela

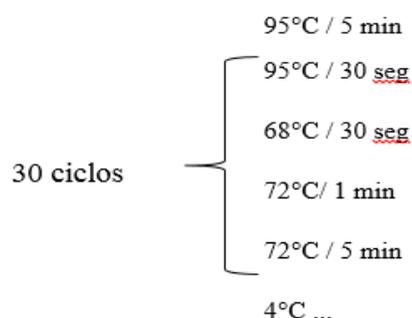
eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 0,8% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml, em tampão TAE (Tris acetato 90 mM pH 8,0; EDTA 25 mM).

4.10 Diagnóstico molecular

4.10.1 Amplificação de nDNA de *Trypanosoma cruzi*

O diagnóstico molecular da infecção pelo *T. cruzi* foi realizado nos casais de todos os grupos experimentais e nos filhotes da geração F1 do grupo A. Para isso, foi empregada a técnica de PCR utilizando *primers* específicos para amplificação de DNA nuclear (nDNA) do parasito. As sequências dos primers para amplificação de nDNA são: TCZ1 (5' -GAG CTC TTG CCC CAC ACG GGT GCT -3') e TCZ2 (5'CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC ACG-3'). Estes iniciadores geram uma banda aproximada de 188 pb correspondente à amplificação de uma sequência de 195 pb de DNA genômico de *T. cruzi* (Moser e cols, 1989).

A amplificação do nDNA de *T. cruzi* com *primers* de TCZ1/2 foi feita em triplicata de acordo com os protocolos de padronização descritos pelo LMPDC: 200ng de DNA genômico, tampão de reação da Invitrogen 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl); 3 mM MgCl₂; 0,1 µM de cada *primer*; 0,2 mM dNTPs (illustra™ GE) e 2 U *Taq* DNA polimerase, incluídos no volume final de 25 µL. As reações foram realizadas no termociclador BIO-RAD *MyCycler™*, como segue:



4.10.2 Southern Blot

Após submeter as amostras aos ciclos de PCR, estas foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,3% e, subsequentemente, foram submetidas ao

processo de transferência alcalina (Sambrook e Russel, 2001). O DNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond-XL - Amersham Pharmacia Biotech), a partir da desnaturação deste DNA em solução alcalina de Hidróxido de Sódio a 0,4 Molar (NaOH 0,4M) por cerca de 20 minutos. Este processo dura cerca de 10 horas, e posteriormente as membranas são secas a temperatura ambiente para fixação do DNA.

4.10.3 Marcação de sondas radioativas

O DNA nuclear de *T. cruzi* ou fragmentos originados de produtos da amplificação do DNA com *primers* específicos foram marcados com o kit *Random Primer Labelling System* (Invitrogen). Este procedimento consiste em adicionar um dATP radiomarcado com fósforo radioativo (α -³²P) na sequência da fita molde do DNA, o qual é sintetizado pela enzima polimerase *Klenow*. A reação foi procedida de acordo com as normas do fabricante: 30ng de DNA (volume de 25 μ L) forma desnaturados a alta temperatura (100 °C) por cerca de 10 minutos e logo colocado no gelo. Em seguida foi adicionado dCTP, dGTP e dTTP no volume de 2 μ L cada; 15 μ L de tampão, 3 μ L de α -³²P dATP (3000 μ Ci) e 1 μ L de *Klenow*. Após o período de 3 horas a temperatura ambiente a reação foi parada com 5 μ L de tampão de parada.

4.10.4 Purificação de sondas radiomarcadas

As sondas radiomarcadas foram purificadas em coluna de SEPHADEX G50 em lâ de vidro de acordo com Sambrook e cols,(1989). As sondas foram usadas dentro dos limites de concentração de 1 a 2 X10⁶ cpm/mL de solução de hibridização e as atividades específicas forma iguais ou maiores que 10⁸ cpm/ μ g de DNA.

4.10.5 Hibridização

As membranas com DNA foram bloqueadas por 3 horas a 65 °C com solução de pré-hibridização, onde contém PEG 800 10 %, SSPE 1,5%, SDS 7% e 100 μ g/mL de DNA de esperma de salmão. Após este período de incubação, as sondas

radiomarcadas sofreram o processo de desnaturação a 100 °C, por 5 minutos, e, logo em seguida, foram colocadas no gelo. Após este processo, a sonda foi adicionada à solução de hibridização, onde as membranas permanecem por mais 12 horas a 65 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com graus crescentes de estringência, visando à remoção do excesso de sonda que não se ligou adequadamente ao DNA preso a membrana. Foram feitas duas lavagens com SSC 2X/0,1% SDS, a 65 °C por 15 minutos, seguida de mais duas lavagens com SSC 0,1X/0,1% SDS também a 65 °C por mesmo período de tempo. Após as lavagens, as membranas eram revestidas em filme plástico de PVC, expostas em cassete metálico com filme sensível a raios X (KODAK), e incubadas a -80 °C. O tempo de exposição era variável.

4.11 Imunodiagnóstico

4.11.1 Amostra

O soro dos camundongos foi obtido a partir de 200 µL de sangue, colhidos sem anticoagulante e armazenados em glicerol (1/1) a -20 °C. Posteriormente as amostras foram analisadas quanto a presença de anticorpos contra o *T. cruzi* utilizando testes ELISA e imunofluorescência indireta.

4.11.2 Crescimento do *T. cruzi* para obtenção de antígenos

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (estoque Berenice cultivadas em meio LIT, foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas- BR) e 40 µg/mL de gentamicina. O cultivo dos parasitos foi feito a temperatura de 28 °C. A colheita dos flagelados foi feita na fase exponencial de crescimento.

4.11.3 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

4.11.3.1 Preparo de antígenos

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram colhidas por centrifugação a 3.000 RPM por 15 minutos a 4 °C, lavadas três vezes com PBS pH 7,2 por igual período e posteriormente ressuspensas em 2 mL de água Milli-Q. Em seguida os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento a -20 °C/ descongelamento a 37 °C.

4.11.3.2 Sensibilização de placas de ELISA com antígenos

Microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com 50 µL/poço com antígenos não purificados de *T. cruzi* diluídos em PBS pH 7,2 de forma a conter 0,2 µg /poço do parasito. Após estes processo, as placas foram incubadas no período de 18 horas a 4 °C em câmara úmida, o excesso do antígeno foi retirado e as placas forma lavadas três vezes com PBS pH 7,2 contendo 0,05% de *Tweem-20* (PBS-T). Para bloquear os sítios de adesão livres de proteínas, que ainda existiam na superfície dos poços, foram adicionados 100 µL/poço de PBS/Leite 5% (Molico). Em seguida as placas foram incubadas por 2 horas a 37 °C em câmara úmida, após este período as placas foram lavadas novamente com PBS-T. Ao termino da lavagem, as placas forma imediatamente envolvidas em papel alumínio e armazenadas a – 20 °C até o momento do uso (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

4.11.3.3 Incubação com anticorpo primário

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

4.11.3.4 Incubação com anticorpo secundário e revelação de imunocomplexos

O conjugado previamente testado e titulado, composto por anticorpos anti-IgG de camundongo marcada com fosfatase alcalina (Sigma) foi diluído 1: 200 em PBS/leite desnatado 2% e adicionado à placa (50 µL/poço). Após incubação por mais 2 h a 37 °C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e novamente as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

A revelação dos imunocomplexos foi feita pela adição (50 µL/poço) do substrato p-nitrofenol fosfato (Sigma) em tampão de dietanolamina. Após o desenvolvimento da reação cromógena por 10 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, foi feita

leitura em espectrofotômetro (*BioTeK- Synergy HT*) a 405 nm, sendo consideradas positivas as amostras que possuíam densidade óptica (DO) maior que o ponto de corte (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

4.12 Imunofluorescência indireta

4.12.1 Preparo de antígenos para imunofluorescência indireta

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram colhidas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 min a 4 °C, lavadas três vezes com PBS 1X, pH 7,2 por igual período e ressuspensas em 2 mL de paraformaldeído (3,7%). Após os períodos de lavagem, os parasitos foram ressuspensos em PBS pH 7,2, de maneira obter uma concentração de aproximadamente 30 parasitos por campo. Essa quantidade de parasitos em suspensão foi posta nas lâminas de microscopia demarcadas e desengorduradas. Depois de secas ao ar livre, as lâminas foram embrulhadas com papel alumínio e guardadas a -20 °C até o momento do uso (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

4.12.2 Ensaio de imunofluorescência indireta

O soro proveniente de camundongos foi diluído de modo seriado em PBS pH 7,2 de 1:20 até 1:360. 10 µL das diluições seriadas dos soros em PBS, pH 7,2 foram colocados sobre os parasitos fixados na lâmina. Após incubação por 40 min a 37°C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e as lâminas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,2. Após o período de incubação, as lâminas postas para secagem a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína (Sigma), diluído 1:200 (previamente titulado) em PBS, pH 7,2 e Azul de Evans 0,01% (Vexenat, 1993; Lauria-Pires, 2000).

Após incubação pelo período de 40 min a 37 °C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e as lâminas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,2. Depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com lamínulas, sobre glicerina tamponada, pH 9,0. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (*Olympus®*

DP76 U-TVO-63XC), cuja luz ultravioleta ativa o isotiocianato de fluoresceína presente apenas nos parasitos com anticorpos ligados na membrana. Uma amostra era considerada positiva pela fluorescência verde brilhante obtida em títulos $\geq 1:40$ nas infecções pelo *T. cruzi*.

4.13 Histopatologia

Foram realizados exames histológicos para verificar a presença de ninhos de amastigota e lesão tecidual. Foram coletadas amostras de tecido cardíaco, muscular e testículo ou ovários dos animais. Inicialmente, o tecido passa por um processo de desidratação com banhos sucessivos em soluções com teor crescente de álcool (etanol) 70%, 80%, 90% e três vezes em 100%, por 30 minutos. Em seguida, passa por um processo de diafanização em três banhos sucessivos em xilol, por 30 minutos, seguindo-se a parafinização.

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

4.14 Imunohistoquímica

Secções de tecidos coletados de camundongos infectados por *T. cruzi* e seus controles, não infectados, foram fixados em formalina e processados para histologia. Tecidos embebecidos em parafina foram cortados em micrótomo na espessura de 5

µm e as secções posicionadas em lâminas. Em seguida, estas lâminas foram tratadas em sucessivos banhos de xileno e hidratadas gradualmente em etanol em diferentes concentrações (100% a 70%), no tempo de 1 minuto cada. Após três lavagens, as secções foram bloqueadas com PBS leite 5% por 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS 0,1M pH 7,4 e as secções foram incubadas com soro de camundongo infectado ou com soro controle na diluição de 1:20. Após 2 horas de incubação, cada lâmina foi lavada em PBS por 5 minutos e posteriormente deixadas para secar em temperatura ambiente antes de serem incubadas com anticorpo monoclonal marcado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 3 minutos com PBS e contrastadas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, por conseguinte lavadas com água destilada e desidratada com etanol em diferentes concentrações (70%, 80%, 90% e 100%) durante 1 minuto e montadas com glicerina tamponada (Sambrook e cols, 2001). As lâminas foram examinadas em um microscópio de luz de campo claro e as imagens fotográficas foram capturadas pela micro câmera Olympus DP76 U-TVO-63XC e capturadas pelo programa *Cell Sens Dimension Software*.

4.15 Analise estatística

Os dados da avaliação sorológica dos casais de camundongos e de sua prole foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido do teste de Tukey para a comparação de cada um dos pares de médias. Os dados foram obtidos com uso do software GraphPad Prisma ® versão 6).

5. Resultados

5.1 Diagnóstico parasitológico

Para confirmar se os camundongos que receberam as formas tripomastigotas por via intraperitoneal realmente adquiriram a infecção, foi feito o exame direto do sangue desses animais. Com este teste, confirmamos a presença de formas tripomastigotas no sangue de todos os camundongos inoculados com o parasito.

Já para se determinar a transmissão sexual, o teste utilizado foi a hemocultura. Os resultados positivos foram obtidos 180 dias após a coleta, fato este que pode estar associado à baixa sensibilidade da técnica. Após este período, observou-se a presença de formas tripomastigotas na cultura de sangue de dois casais pertencentes ao grupo A (machos infectados cruzados com fêmeas sadias), destes resultados pode-se observar que duas fêmeas que inicialmente eram negativas se tornaram positivas a partir da visualização do parasito em suas culturas, confirmando assim a transmissão sexual deste parasito. Desta forma, a hemocultura foi capaz de identificar a transmissão sexual em 20% dos casais estudados.

5.2 Diagnóstico molecular

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi utilizada para detectar a presença de DNA nuclear (nDNA) de *T. cruzi* nas amostras estudadas. Foram realizados testes de PCR nos grupos experimentais, antes e após o acasalamento dos animais. As reações foram feitas em triplicatas e os produtos amplificados foram confirmados por hibridização contra uma sonda específica radiomarcada.

Os *primers* TcZ1/2 foram capazes de produzir os fragmentos de 188pb e seus catâmeros em todos os animais que foram inoculados com *T. cruzi* por via intraperitoneal. De grande importância, as amostras de DNA de animais não infectados não apresentavam bandas antes do cruzamento com parceiros infectados. A figura 4 superior mostra o resultado obtido após a hibridização dos produtos de PCR dos animais dos casais A a J, antes do cruzamento.

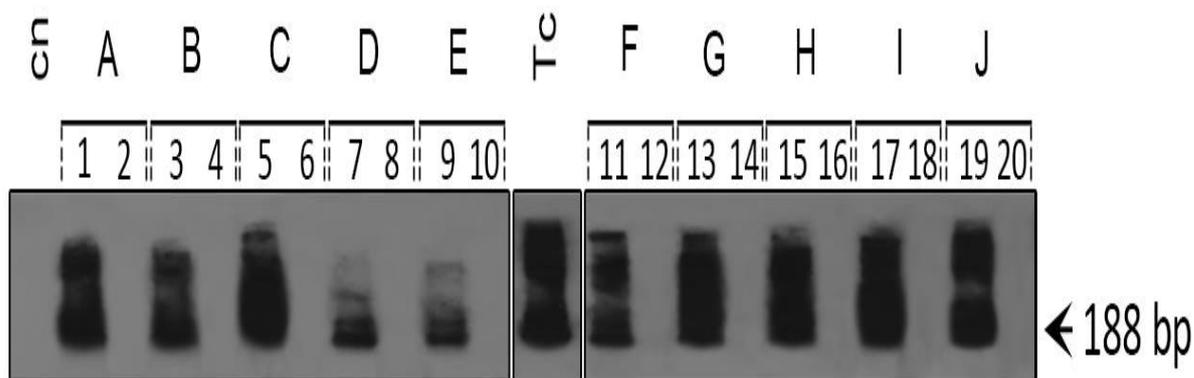


Figura 4. Validação do diagnóstico molecular pré-acasalamento. Southern *blot* de produtos de nDNA de *Trypanosoma cruzi* amplificados por PCR e hibridizados com sonda específica. As iniciais representam: nc, Controle Negativo. Tc, Controle Positivo (DNA de *Trypanosoma cruzi*).

Para a confirmação da infecção via sexual, procedeu-se o acasalamento e a observação dos filhotes nascidos de fêmeas sadias cruzadas com machos infectados. Após as gestações, foi realizada a coleta de sangue para a avaliação da transmissão sexual do *T. cruzi*. Foram realizadas novas amplificações utilizando os *primers* TCZ1/2 para identificar a presença do DNA nuclear do *T. cruzi* nos animais infectados e em seus parceiros (inicialmente não infectados). Os resultados de PCR mostram que após os cruzamentos, foram detectadas bandas específicas em todos os animais testados. Portanto, os camundongos que inicialmente não apresentavam nDNA do parasito, mostraram resultados positivos após o contato sexual, como pode ser verificado na figura 5.

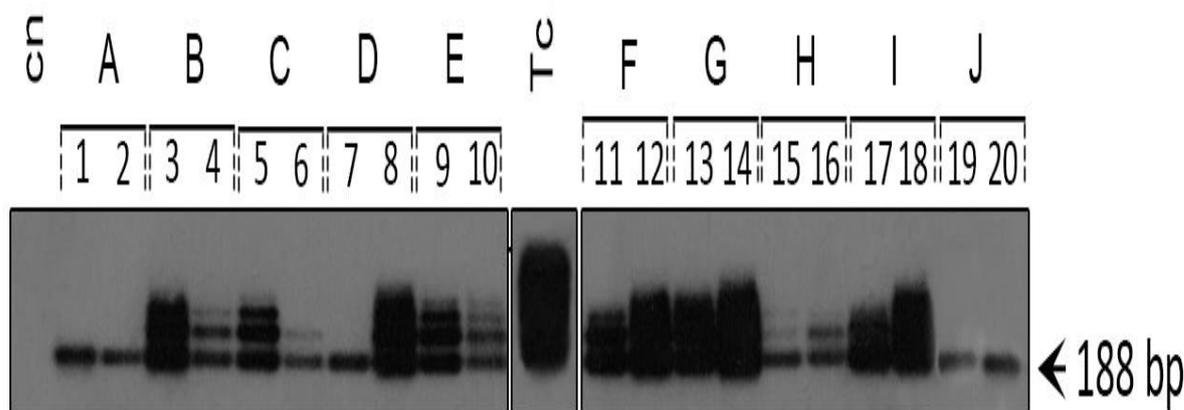


Figura 5. Confirmação da transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* por diagnóstico molecular. Southern *blot* de produtos de nDNA de *Trypanosoma cruzi* amplificados por PCR e hibridizados com sonda específica. As iniciais representam: nc, Controle Negativo. Tc, Controle Positivo (DNA de *Trypanosoma cruzi*).

A análise dos resultados de PCR obtidos a partir dos filhotes provenientes do Grupo A, no qual os machos infectados foram postos para acasalar com fêmeas sem a infecção, evidenciou a transmissão da infecção sexual, já que a infecção via transplacentária desses filhotes só poderia ocorrer mediante a infecção prévia da mãe por via sexual, como mostra Figura 6. Dos 35 filhotes oriundos deste grupo, 19 foram positivos por PCR, o que significa que 54% dos filhotes adquiriram a infecção por via congênita. Finalmente, a PCR também foi utilizada para verificar a taxa de transmissão vertical do *T. cruzi* em filhotes provenientes do Grupo B, onde fêmeas infectadas cruzaram com machos sadios. Dos 35 filhotes provenientes deste grupo, 22 destes animais estavam positivos neste ensaio, o que corresponde a uma taxa de transmissão 63%, resultado similar ao obtido para os filhotes provenientes do Grupo A.

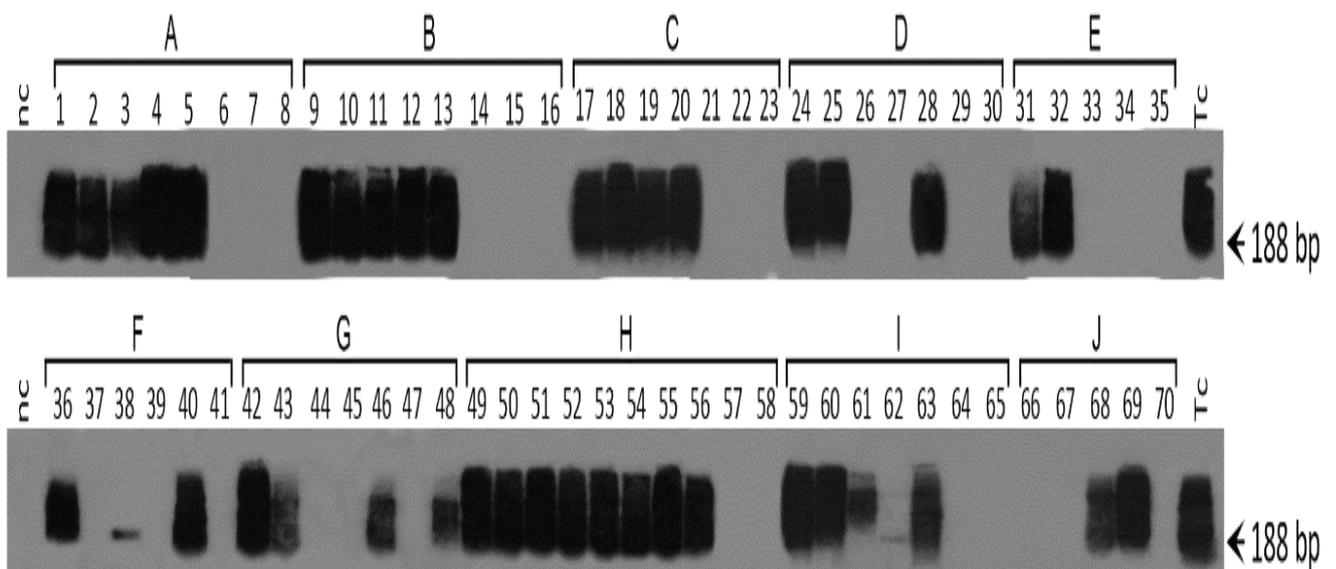


Figura 6. Confirmação da transmissão vertical do *Trypanosoma cruzi* por diagnóstico molecular na Geração F1. Southern blot de produtos de nDNA de *Trypanosoma cruzi* amplificados por PCR e hibridizados com sonda específica. Os números representam o a identificação de cada camundongo. As iniciais representam: nc, Controle Negativo. Tc, Controle Positivo (DNA de *Trypanosoma cruzi*).

5.3 Imunodiagnóstico

Para a confirmação da transmissão sexual e convalidação dos dados de PCR, realizamos a análise do perfil sorológico destes camundongos, uma vez que os camundongos infectados produzem anticorpos específicos contra *T. cruzi*. Para isso, dois testes sorológicos (ELISA e IFI) foram empregados.

Pelo teste ELISA, observou-se que, no Grupo A, todos os cinco machos infectados, bem como todas suas parceiras sexuais inicialmente sadias, apresentavam altas taxas de anticorpos da classe IgG, confirmando os resultados obtidos por PCR que indicavam a ocorrência de transmissão sexual neste grupo. Ao se analisar os resultados do Grupo B, no qual as fêmeas infectadas foram cruzadas com machos sadios, notou-se que todas as fêmeas estavam positivas, no entanto, apenas um único camundongo macho se tornou positivo para este diagnóstico (Figura 7). Desta forma, o ELISA foi capaz de confirmar a aquisição do *T. cruzi* por via sexual em 60% dos casos. De interesse, não houve uma grande diferença entre a titulação de anticorpos dos camundongos infectados por via intraperitoneal ($2,898 \pm 1,415$) e por via sexual ($2,347 \pm 1,048$) ($p=0.001$).

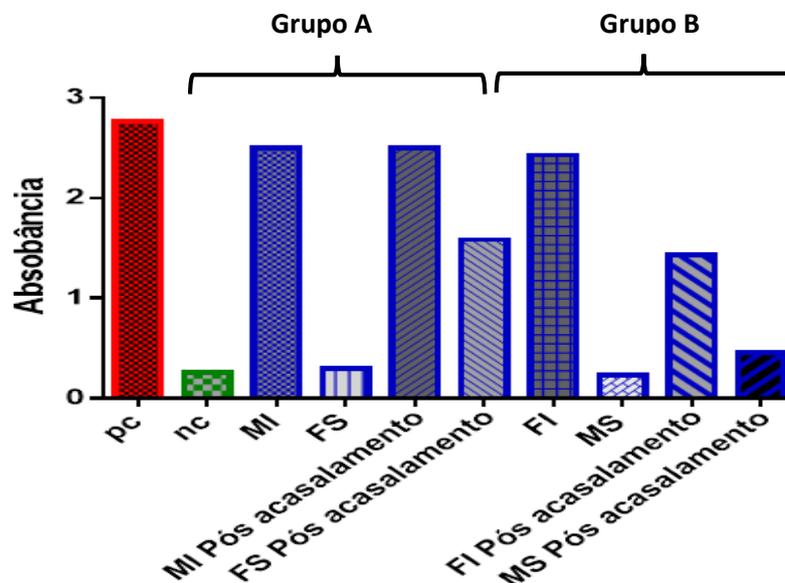


Figura 7. Produção de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* por camundongos dos grupos A e B. Representação Gráfica dos resultados de ELISA dos grupos experimentais antes a após o acasalamento. As iniciais representam: cp, Controle Positivo; cn Controle Negativo; MI, macho infectado; FS; fêmea sadia; FI, fêmea infectada; MS, macho sadio.

Outro ensaio utilizado para confirmação da transmissão sexual do *T. cruzi* foi o teste de imunofluorescência indireta, o qual reproduziu exatamente o mesmo resultado obtido pelo ELISA, isto é, houve transmissão sexual do *T. cruzi* em 100% dos casais do grupo A, enquanto que, no grupo B, em apenas um caso (20%) se constatou a infecção do parceiro sexual (Figura 8).

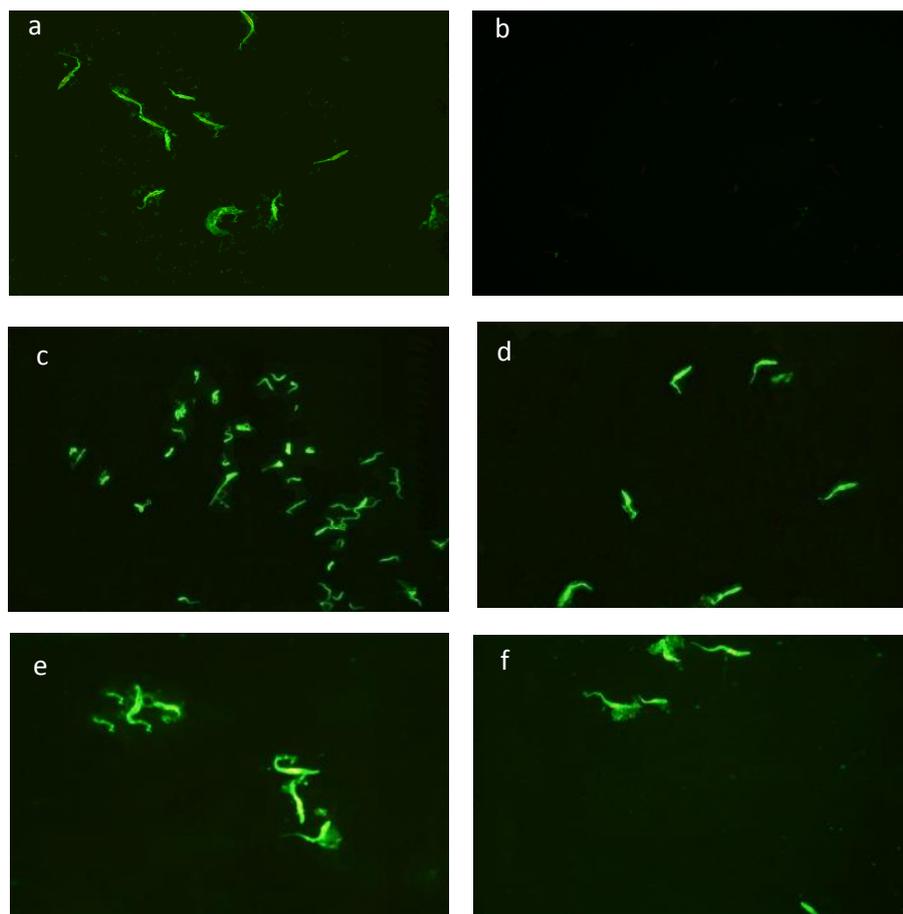


Figura 8. Detecção de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi* por imunofluorescência indireta. Em cada quadrante temos: a, controle positivo; b, controle negativo; c, camundongo macho infectado por via intraperitoneal; d, camundongo fêmea após cruzamento com macho infectado; e, camundongo fêmea infectada por via intraperitoneal; f, camundongo macho após o cruzamento com fêmea infectada. Aumento 400X.

Devido à discrepância entre os resultados sorológicos observados entre os grupos A e B, fez-se necessária a confirmação da transmissão sexual da infecção da fêmea infectada para o macho sadio. Para tanto, foi criado um novo grupo experimental denominado de Grupo R, no qual foram realizados os mesmos procedimentos utilizados anteriormente. Diferentemente do Grupo B, 60% dos

machos tornaram-se sorologicamente positivos após o acasalamento com as fêmeas infectadas (Figura 9). Ainda assim, essa porcentagem é inferior à verificada no grupo A.

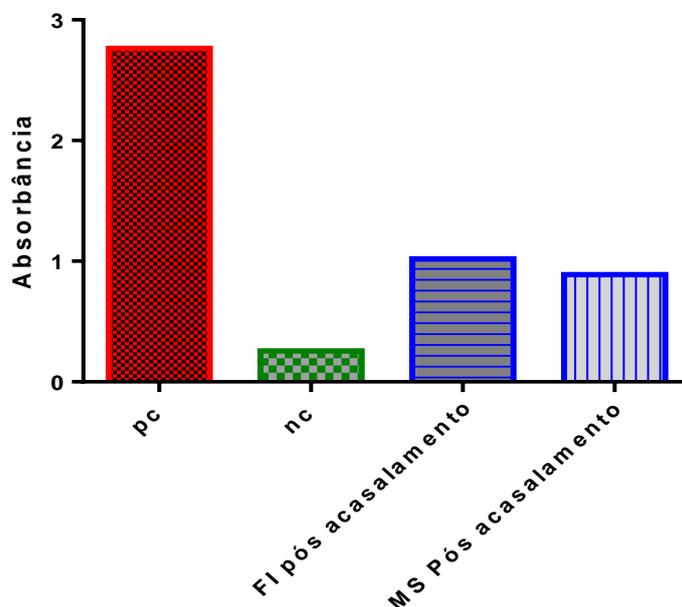


Figura 9. Títulos de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi* do grupo R após acasalamento. As iniciais representam: pc, Controle Positivo; nc Controle Negativo; FI, fêmea infectada; MS, macho sadio.

Os testes sorológicos também foram utilizados para avaliar a taxa de transmissão congênita. Inicialmente foi utilizada a técnica de ELISA, a qual demonstrou que apenas quatro filhotes provenientes do Grupo A apresentavam sorologia positiva, o que correspondia a aproximadamente 12% de positividade. Desta forma, enquanto cerca de 50% destes animais apresentaram resultados positivos em PCR, apenas uma minoria produziu anticorpos específicos. Os resultados se confirmaram quando foi feito o teste de imunofluorescência, no qual os mesmos quatro animais se encontravam positivos. Em relação aos resultados de sorologia dos filhotes provenientes do grupo B, verificou-se que dos 35 camundongos, apenas seis tinham sorologia positiva tanto para ELISA quanto para Imunofluorescência, o que representa cerca de 17 % de positividade. Isso está de acordo com os dados já conhecidos acerca desta via de transmissão.

Ao se analisar os resultados de todos os camundongos nascidos em ambos os grupos, observou-se que, enquanto os dados provenientes do diagnóstico por PCR mostram que 58% (41/70) dos camundongos foram positivos neste teste, os testes

sorológicos demonstraram que a taxa de transmissão por esta via chega a apenas 14% (10/70), como mostra a Figura 10.

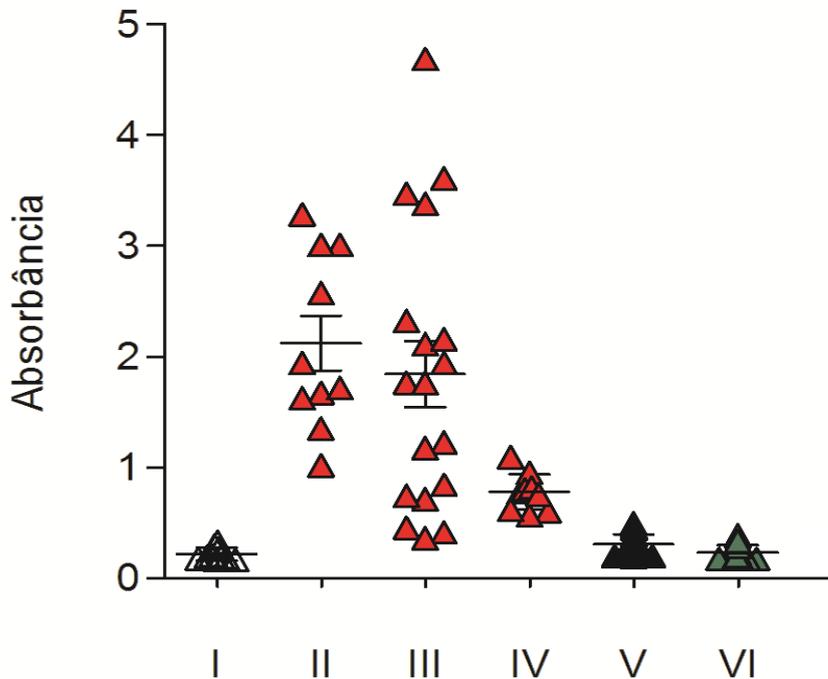


Figura 10. Comparação dos níveis de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* produzidos em camundongos que adquiriram a infecção por via intraperitoneal/sexual e congênita. As iniciais representam: I, controle negativo; II, controle positivo; III, Casais da geração F0; IV, geração F1 com sorologia positiva; V, geração F1 com PCR positiva e sorologia negativa; VI, F1 com PCR e sorologia negativos.

5.4 Análises histopatológicas

Com o intuito de se verificar a presença de ninhos de amastigota nos tecidos de camundongos que foram infectados por via intraperitoneal e por via sexual, foi feita a análise histopatológica do tecido cardíaco e do tecido proveniente dos órgãos reprodutores desses animais. Apesar de não se detectar a presença de ninhos de amastigota em seus corações, notou-se a presença de intenso infiltrado inflamatório e destruição das fibras cardíacas de camundongos que foram infectados tanto por via intraperitoneal quanto por via sexual. Na Figura 11, verifica-se a presença do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de animais infectados quando comparado com o controle negativo. As figuras 11B e C mostram o corte histológico do coração de camundongos provenientes do Grupo A, sendo o primeiro um macho que foi infectado e, o segundo, uma fêmea que adquiriu a infecção por via sexual. Nestas figuras, pode-

se observar a presença de células mononucleares do sistema imune e a consequente destruição das fibras cardíacas. A figura 11D corresponde a uma fêmea pertencente ao Grupo B, e as figuras 11E e F correspondem a um casal pertencente ao Grupo R.

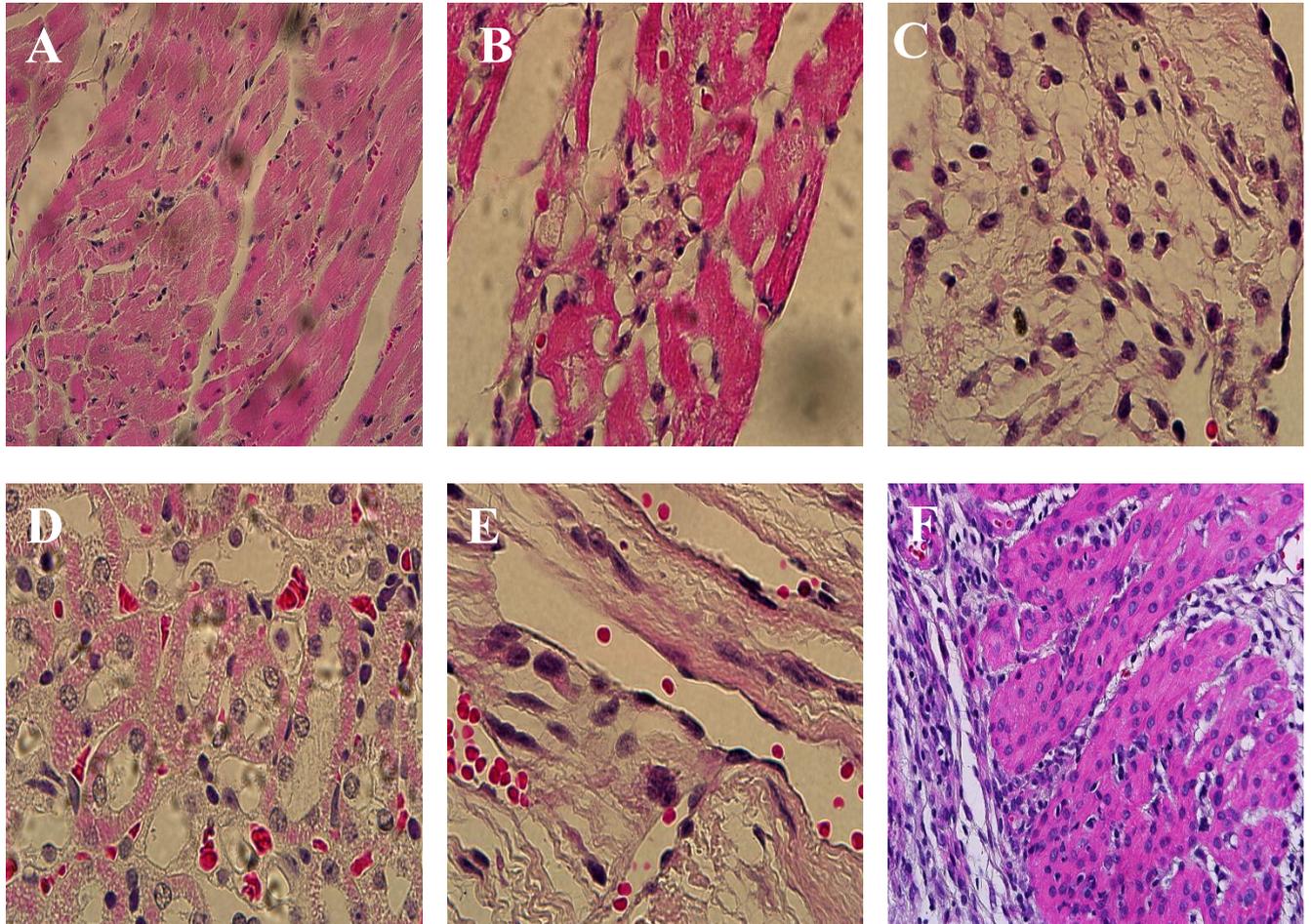


Figura 11: Aspectos histopatológicos da miocardiopatia inflamatória na doença de Chagas murina.

A: Histopatologia do coração de camundongo controle, normal. B: Miocardite com destruição de fibras cardíacas por células mononucleares do sistema imune. C: Resto de fibras cardíacas destruídas por células imunes. D: Presença de células mononucleares do sistema imune. E: Miocardite com destruição de fibras cardíacas por células mononucleares do sistema imune. F: Presença de grande infiltrado inflamatório e destruição das fibras cardíacas. 400X

Esta técnica também foi utilizada para se analisar os órgãos sexuais dos camundongos machos e fêmeas, podendo-se observar uma possível presença de ninhos de amastigota nos testículo de camundongos. Entretanto, a confirmação de tais estruturas só pode ser feita com o auxílio da técnica de imunohistoquímica.

5.5 Imunoperoxidase

Diversos trabalhos da literatura já mostraram que o *T. cruzi* possui certo tropismo pelo testículo (Vianna, 1911; Lenzi, 1998; Carvalho, 2009), um dado de grande interesse quando se quer estudar a transmissão sexual desse protozoário. Desta forma, experimentos de imunohistoquímica foram conduzidos para se confirmar a presença de formas amastigotas de *T. cruzi* nos testículos e ovários de camundongos. Como visto na figura 12, nota-se a presença do parasito (em marrom) nos túbulos seminíferos e no epidídimo destes animais. A figura 12 representa três camundongos que foram infectados com *T. cruzi* por via intraperitoneal. Já a figura 12 representa os três camundongos do grupo R que adquiririam a infecção através da transmissão sexual. Não foram identificados ninhos de amastigotas nos ovários das fêmeas infectadas (dados não mostrados).

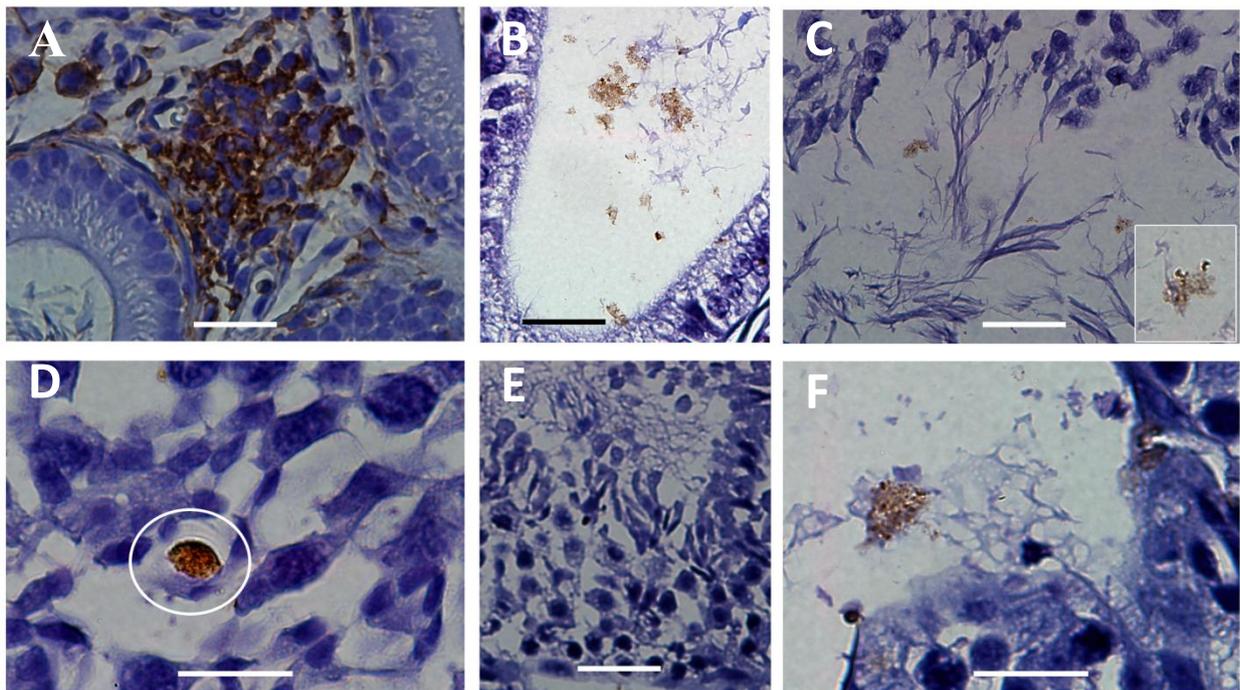


Figura 12: Presença de ninhos de amastigotas de *Trypanosoma cruzi* nos testículos de camundongos. Coloração com Imunoperoxidase. **Figura superior:** camundongos infectados com *T. cruzi*. **Figura inferior:** camundongos cruzados com fêmeas infectadas. **a:** 1000x **b:** 400X **c:** 400x **d:** 1000X **e:** 400X **f:** 1000

5.6. Avaliação da capacidade do sêmen humano infectado transmitir o *Trypanosoma cruzi*

Para se verificar se o sêmen humano também pode ser um veículo de transmissão do *T. cruzi*, foi inoculada uma pequena quantidade de sêmen de indivíduo infectado na vagina de camundongos fêmeas. Após dois meses, estes animais foram eutanasiados e tiveram diversos tecidos coletados, sendo possível se observar a presença de ninhos no tecido cardíaco (Figura 13). Nota-se também na figura 13(a) a presença do infiltrado inflamatório e uma pequena área onde há a destruição das fibras cardíacas (seta branca).

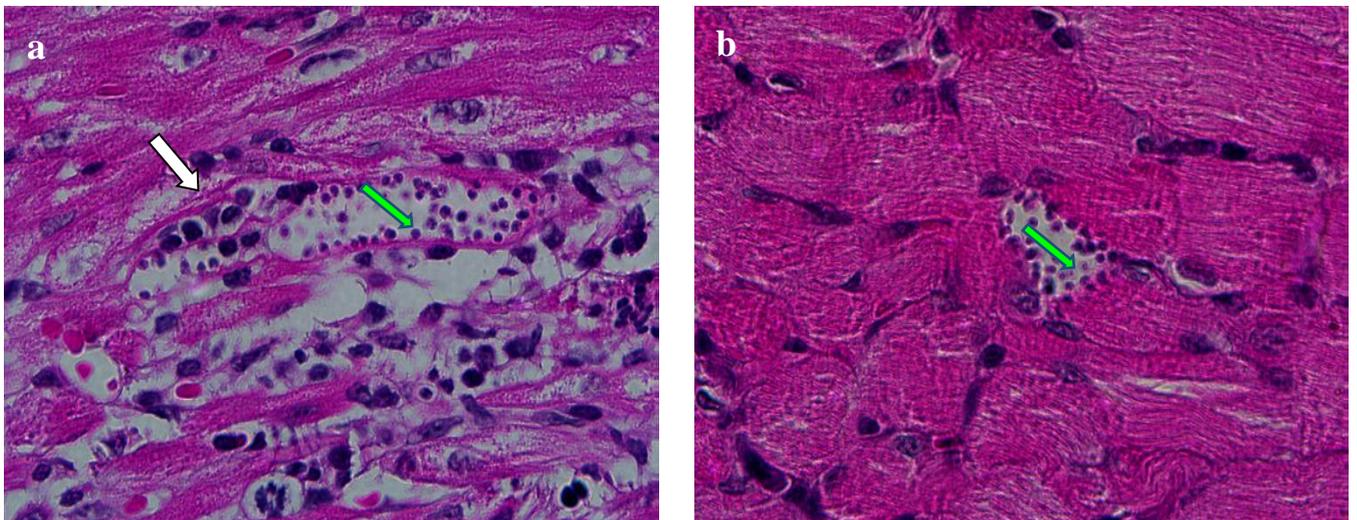


Figura 13: Aspecto histopatológicos do tecido cardíaco de camundongos inoculados com sêmen humano infectado com *T. cruzi*. As setas verdes indicam a presença de ninhos de amastigota. Seta branca indica presença de infiltrado inflamatório.

6. Discussão

6.1 A doença de Chagas como uma DST

No século XX, as Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST's) ganharam grande importância devido a descoberta da transmissão sexual do vírus HIV, agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Piot & Quinn, 2013). Diversos outros agentes também são classificados como agentes causadores de DST's. De acordo com WHO (2013), 499 milhões de novas infecções por via sexual ocorrem no mundo anualmente, infecções estas causadas por vírus, bactérias, fungos e, inclusive, protozoários. Existem mais de 30 agentes causadores deste tipo de infecção, gerando grande impacto negativo na saúde pública (WHO, 2002: 2008).

De acordo com WHO (2008), a única espécie de protozoário capaz de ser transmitida por via sexual em humanos é o *Trichomonas vaginalis*. A tricomoníase é a DST não viral mais frequente no mundo, com 173 milhões de novos casos a cada ano (Martínez, 2009).

Ainda que a Organização Mundial de Saúde (WHO) não considere a transmissão sexual de outros protozoários, vários artigos demonstram essa possibilidade, especialmente entre os tripanossomatídeos. Por exemplo, estudos em equinos demonstram que a via de transmissão do *Trypanosoma equiperdum* ocorre diretamente de equino para equino durante o coito (Bru e cols, 1998; Seshu, 2006; Luciani e cols, 2013).

Ademais, um estudo realizado em cães demonstrou a transmissão sexual de *Leishmania sp.* Neste trabalho, nove cães machos, provenientes do centro de zoonose de Ribeirão das Neves, MG, e com testes sorológicos e moleculares positivos para leishmaniose, foram cruzados com cadelas não infectadas. Três de doze cadelas que foram colocadas para copular com os cães infectados passaram a apresentar altos títulos de anticorpos específicos (Silva e cols, 2009). Logo, este estudo demonstrou a possibilidade da transmissão venérea de um protozoário flagelado sem a presença do inseto vetor. Este fato representa um grande passo para que outras espécies de protozoários sejam estudadas em relação a esta via de transmissão.

Em 2012, foi confirmado o primeiro caso de transmissão venérea e vertical de leishmaniose em cães na Alemanha (Naucke & Lorentz, 2012). Outros estudos demonstraram lesões e presença de ninhos de amastigotas nos órgãos sexuais e a

presença deste parasito no sêmen de cães (Diniz e cols, 2005; Silva e cols, 2008; Manna e cols, 2012). Estes achados corroboram com a possibilidade da transmissão sexual deste protozoário, o que pode trazer um impacto importante na saúde pública mundial, tendo em vista que, assim como *Trichomonas vaginalis*, a *Leishmania sp.* também causa sérios danos à saúde humana.

Igualmente, nós identificamos ninhos de amastigotas nos testículos de camundongos machos infectados com *T. cruzi*. O tropismo de parasitos por esse órgão pode ser explicado por um mecanismo conhecido como privilégio imunológico. Tal privilégio é direcionado aos espermatozóides para que, ao serem produzidos nos testículos, eles fiquem isolados do sistema imunológico e não sejam destruídos. Entretanto, esse favorecimento também acaba por se estender aos patógenos locais (Fijak e cols, 2011, Mital e cols, 2011). De interesse, propriedades imunoprotetoras não são observadas nos ovários, uma vez que todos os ovócitos são produzidos durante o desenvolvimento embrionário. Esse fato pode estar associado à dificuldade de se encontrar ninhos de amastigotas nesse órgão.

A identificação do *T. cruzi* nos testículos ajuda a explicar a presença desse protozoário no sêmen. Este fator é determinante para que 100% das fêmeas do estudo tenham sido infectadas, uma vez que o ejaculado liberado pode carregar as formas infectantes do parasito. Além disso, essa alta suscetibilidade das fêmeas pode ser associada às suas características anatomofisiológicas. Também merece destaque o fato de que, ao se inocular o sêmen de paciente chagásico na vagina de camundongos fêmeas, verificou-se a infecção das mesmas (Figura 13). Este fato sugere que a transmissão sexual do *T. cruzi* também pode estar ocorrendo em seres humanos.

A transmissão do *T. cruzi* de fêmeas infectadas para machos sadios ocorreu em uma proporção inferior (20 a 60%) quando analisados os resultados sorológicos. No entanto quando analisados os dados provenientes do diagnóstico molecular, foi possível observar que todos os machos apresentavam-se positivos para o teste de PCR. Possivelmente, a infecção do macho se dá pelo contato com fluidos vaginais contaminados e depende da presença de microfissuras em seu pênis.

6.2 O uso de técnicas moleculares e sorológicas para a determinação da transmissão sexual do *T. cruzi*

Os tradicionais diagnósticos parasitológicos como xenodiagnósticos e hemocultura têm sido pouco utilizados nos últimos anos devido sua baixa sensibilidade e demora nos resultados (Gomes e cols, 2009). Desde a década passada a aplicação da PCR para detectar a infecção por diversos agentes têm sido uma nova possibilidade de diagnóstico e sendo um fator determinante para o acompanhamento do tratamento e estudo epidemiológico como, por exemplo, infecções pelo *T. cruzi* (Moser e cols, 1989; Duffy e cols, 2009). Esta técnica têm se mostrado como uma das mais eficientes devido a sua alta especificidade e sensibilidade, no entanto se mostra uma técnica ainda cara, se restringindo em muitos casos aos grandes centros de pesquisa (Schijman e cols, 2011). Os testes sorológicos convencionais como ELISA ainda são considerados testes padrões para determinação da infecção pelo *T. cruzi*, no entanto estudos para verificar a transmissão congênita do *T. cruzi* em camundongos mostram que os testes moleculares são mais sensíveis quando comparados os testes sorológicos (Alkimim-Oliveira e cols, 2012). No entanto alguns testes sorológicos ainda apresentam um sensibilidade de 97,7% a 100% dependendo da fase do doença (Gomes e cols, 2001).

No presente estudo, determinamos a ocorrência de transmissão sexual e transmissão congênita por meio do imunodiagnóstico e diagnóstico molecular. O que corrobora com outros trabalhos da literatura (Pavia e cols, 2009; Alkmim e cols, 2012). No grupo experimental B, no qual todos os camundongos adquiriram a infecção após serem colocados para acasalar com fêmeas infectadas, a PCR confirmou a transmissão sexual em 100% dos casais, enquanto que, ao se analisar os perfis sorológicos destes animais, vimos que apenas um camundongo adquiriu a infecção. De interesse, quando foi analisado o Grupo R, três camundongos apresentavam títulos positivos para sorologia e dois permaneceram com títulos de anticorpos negativos. Uma das possibilidades para explicar esse achado seria a presença de uma baixa carga parasitária com conseqüente baixa produção de anticorpos IgG. Cenário similar já foi caracterizado, por exemplo, em pacientes infectados com o *T. cruzi* e tratados com o benzonidazol: a redução da parasitemia resultou na negativação dos testes sorológicos, ainda que a qPCR se mantivesse positiva (Duffy

e cols, 2013). Desta forma, nossos resultados estabelecem que o uso da PCR seja vantajoso em relação às técnicas imunológicas para se diagnosticar as infecções pelo *T. cruzi*.

Os resultados dos grupos B e R diferem dos do Grupo A, onde os testes imunológicos apresentaram os mesmos resultados da PCR, demonstrando que 100% dos animais adquiriram a infecção por via sexual. Desta forma, o sêmen representa um excelente veículo para a transmissão do *T. cruzi*, transportando grandes quantidades do parasito, e ocasionando uma maior estimulação do sistema imune. De acordo, Alencar e cols, (1991) também investigaram a possibilidade da transmissão do *T. cruzi* pelo sêmen em camundongos, observando uma alta taxa de infectividade.

6.3 Transmissão congênita do *T. cruzi* e possível tolerização aos antígenos parasitários

A transmissão congênita do *T. cruzi* é uma das formas de transmissão com uma das menores taxas de incidência na população humana quando comparada às outras vias de transmissão. Dependendo da região, o número de casos de transmissão congênita pode variar, podendo variar de 0,7% a 18% na América Latina (Carlier e cols , 2013; Carrilero e cols, 2013). Uma das características desta via é a possibilidade da criança nascer com lesões em diversos órgãos e até causar aborto em muitos casos. Em nosso estudo, entretanto, nenhum dos resultados acima se confirmou, isto é, observamos altas taxas de transmissão congênita, porém os filhotes nasciam saudáveis.

No Grupo A, a PCR detectou uma taxa de transmissão de mais de 50% (19/35), o que se confirmou com os dados obtidos dos filhotes provenientes do Grupo B, onde um número similar de camundongos se encontrava positivo para este diagnóstico. Alkimin-Oliveira e cols, (2012) também estudaram o processo de transmissão congênita experimental em camundongos. Em seus resultados, a técnica de PCR se mostrou bem mais sensível que as outras metodologias utilizadas, onde os resultados obtidos por este método alcançaram 50,9% de positividade, validando os resultados obtidos pelo presente trabalho.

Interessantemente, quando analisado o perfil sorológico dos camundongos provenientes dos Grupos A e B, pode-se observar que as taxas transmissão decaem

significativamente: de mais de 50% para 12% (4/35) e 17% (6/35), respectivamente. Estes achados corroboram com os dados obtidos em outros estudos, onde as taxas de infecção não costumam passar dos 20% (Ortiz e cols, 2013). Novamente, as diferenças entre os resultados de PCR e sorologia podem estar relacionadas com as sensibilidades das técnicas. Entretanto, um outro aspecto deve ser levado em consideração quando se fala em transmissão congênita: a tolerância imunológica.

Tolerância imunológica pode ser descrita como um estado de indiferença ou não-reatividade de um substância (antígeno) que, em condições normais seria esperada excitar a resposta imune. Este termo foi denominado para ser usado no contexto da imunidade em transplantes de tecidos, isto é, a maneira da imunidade que impede o enxerto de tecido entre indivíduos de constituição genética distintas e também era usado para se referir a não reatividade do sistema imune antes da maturação das células as respostas a antígenos e a produção de resposta imunológica. No entanto este termo deve ser melhor entendido.

O ensaio que mostra a tolerância imunológica é uma reprodução artificial de um fenômeno natural surpreendente, o quimerismo de hemácias em certos gêmeos dizigóticos. No bovino dizigótico, o sistema hematopoiético antes do nascimento não é diferente, com também acontece em gêmeos de outras espécies que tem anastomoses entre os indivíduos, ocasionando uma troca continua entre suas células até antes do nascimento. Logo gêmeos bovinos nascem com uma mistura de células hematopoiéticas e hemácias devido a transfusão mutua antes do nascimento (Billingham & Madawar, 1953). Neste estudo a hemácias que deveriam ser estranhas se “adaptam” como se fossem próprias, este fato demonstra o processo de tolerância imunológica. Pesquisadores, demonstraram que gêmeos bovinos dizigóticos aceitam enxertos de pele e que este processo mútuo é um processo específico, pois enxertos de pele de diferentes procedências eram destruídos prontamente. Isto ocorre devido ao sistema imune do feto reconhece como “próprio” os antígenos de agentes estranhos apresentados durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário.

O mesmo racional deve ser usado quando se trata de infecções durante o período gestacional, pois agentes infecciosos que contaminam o embrião ou o feto, antes da maturação do sistema imune, são reconhecidos como “próprios” e não se formam os anticorpos específicos. Uma vez que foi estabelecida, a tolerância torna-se sistêmica. Tal fenômeno já foi demonstrado em camundongos nascidos de mães infectadas com

Wuchereria bancrofti, onde os filhotes mostraram-se hiporresponsivos aos antígenos das microfilárias quando desafiados após o nascimento (Rajasekariah e cols, 1989). Portanto, é bastante plausível a possibilidade dos camundongos F1 do estudo terem adquirido a infecção antes da maturação de seus sistemas imunes e, como consequência, as proteínas parasitárias passaram a ser reconhecidas como próprias, não ocorrendo a produção de anticorpos contra as mesmas.

Uma questão que deve ser levantada acerca deste assunto é a possibilidade da não identificação de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* entre os doadores de sangue e de órgãos, uma vez que os testes padrões são baseadas em testes sorológicos. Isso sugere uma deficiência dos bancos de sangue e dos bancos de transplantes, que deveriam empregar a PCR como técnica confirmatória do diagnóstico de tripanossomíase americana nos candidatos a doadores. No entanto, este aspecto acerca da tolerância imunológica deve ser tratado com cautela, pois novos testes devem ser feitos para se confirmar esta possibilidade.

7. Limitações do Estudo

A utilização do modelo murino para verificar a transmissão sexual *T. cruzi* foi uma das limitações acerca do estudo, devido ao período de espera para o acasalamento dos animais e a morte de muitos desses animais em decorrência da alta parasitemia.

8. Considerações Finais

No presente estudo, foi demonstrada a transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em modelo experimental murino. De acordo com nosso levantamento bibliográfico, este é o primeiro relato que confirma experimentalmente a ocorrência dessa via de transmissão do *T. cruzi*.

9. Perspectivas

- Verificar a transmissão sexual do *T. cruzi* em camundongos durante a fase crônica da doença após 2 meses de infecção;
- “Desafiar” camundongos provenientes de pais infectados para verificar o processo de tolerância imunológica;
- Verificar a transmissão sexual do *T. cruzi* a partir de inseminação artificial em cães.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A. **Molecular research and the control of Chagas disease vectors.** An Acad Bras Cienc, 77(3): 437-454. 2005.

ABRAHAMSOHN, I. A. **Cytokines in innate and acquired immunity to Trypanosoma cruzi infection.** Braz J Med Biol Res, 31(1): 117-121. 1998.

AGUILAR, M.; YÉPEZ, R. **Evolución epidemiológica de la enfermedad de Chagas em el Ecuador.** Proc. of the International Workshop on Populatio Genetics and Control of Triatominae, Santo Domingos de los Colorados, Ecuador, 24-28. 1995; 1: 30-38. 1996.

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. **The in vitro interaction of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages.** Acta Trop, 35(3): 209-219. 1978.

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

ALVES, M. J.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y.; COLLI, W. **Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi.** Mol Biochem Parasitol, 21(1): 75-82. 1986.

ALKMIM-OLIVEIRA, S. M.; COSTA-MARTINS, A. G.; KAPPEL, H. B.; CORREIA, D.; RAMIREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E. **Trypanosoma cruzi experimental congenital transmission associated with TcV and TcI subpatent maternal parasitemia.** Parasitol Res, 112(2): 671-678. 2013.

ALVES, M. J.; COLLI, W. **Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures.**" Subcell Biochem, 47: 58-69. 2008.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANK (AABB) **Association bulletin.** 2006.

AMUNÁRRIZ, M.; CHICO, M. E.; GUDERIAN, R. H. **Chagas disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region.** J Trop Med Hyg, 94(3): 145-149. 1991.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. **Comparative histopathological study of lesions produced by 2 strains of *Trypanosoma cruzi*.** Hospital (Rio J), 70(5): 1267-1278. 1966.

ANDRADE, S. G.; MESQUITA, I. M.; JAMBEIRO, J. F.; SANTOS, I. F.; PORTELLA, R. S. **Treatment with benznidazole in association with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: investigation into the possible development of neoplasias.** Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical, 36(4): 441-7. 2003.

ANDRADE, Z. A. **Immunopathology of Chagas disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 94 Suppl, 1: 71-80. 1999.

ANDERSON, J. **Molecular diagnosis of experimental Chagas disease.** Trends Parasitol, 20(2): 52-53. 2004.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. **Doença de Chagas: Manual para experimentação animal.** Rio de Janeiro. Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, p.366. 2000.

BARANCHUK, A.; MIRANDA, R.; FEMENÍA, F.; FECHA INVESTIGATORS **Chagas' cardiomyopathy and Fragmented QRS. Re: QRS fragmentation as a marker of arrhythmias in coronary artery disease, in cardiomyopathies and ion channel diseases.** Int J Cardiol, 160(2): 151-152. 2012.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. **The trypanosomiases**. Lancet, 362(9394): 1469-1480. 2003.

BILATE, A. M.; E. CUNHA-NETO. **Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease**. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 50(2): 67-74. 2008.

BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. **Actively acquired tolerance of foreign cells**. Nature, 172(4379): 603-606. 1953.

BERN, C. **Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease**. N Engl J Med, 364(26): 2527-2534. 2011.

BERRIZBEITIA, M.; FIGUEROA, M.; WARD, B. J.; RODRIGUÉZ, J.; JORQUERA, A.; FIGUERA, M. A.; ROMERO, L.; NDAO, M. **Development and Application of an ELISA Assay Using Excretion/Secretion Proteins from Epimastigote Forms of T. cruzi (ESEA Antigens) for the Diagnosis of Chagas Disease**. J Trop Med, 2012: 875909. 2012.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. **Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many** Curr Mol Med, 8(6): 510-518. 2008.

BRASIL. 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. 816 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRENER, Z. **Biology of Trypanosoma cruzi**. Annu Rev Microbiol. 27: 347-82. 1973.

BRENER, Z. **Terapêutica experimental da doença de Chagas**. CANÇADO, I. J. Belo Horizonte: Imprensa Oficial de Minas Gerais, 7P. 1968.

- BRENER Z. **Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentallyinfected with *Trypanosoma cruzi***. Rev Inst Med. Trop, 4: 389-396. 1962.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanossoma cruzi* e Doença de Chagas**. Guanabara Koogan, p.431. 2000.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. **Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease**. Int Arch Allergy Immunol, 114(2): 103-110. 1997.
- BROWN, D.; G. L. WANECK. **Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins**. J Am Soc Nephrol, 3(4): 895-906. 1992.
- BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z. R. ***Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review)**. Vet Parasitol, 79(2): 95-107. 1998.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. **The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells**. Annu Rev Microbiol, 49: 175-200. 1995.
- BUSTAMANTE, J. M., RIVAROLA, H. W.; FERNÁNDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; PALMA, J. A.; PAGLINI-OLIVA, P. A. **Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy**. Clin Sci (Lond), 104(4): 415-420. 2003.
- BUSTAMANTE, J. M., RIVAROLA, H. W.; FERNÁNDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; RICARDO, F.; D'ORO GLORIA, D. L.; PALMA, J. A.; PAGLINI-OLIVA, P. A. ***Trypanosoma cruzi* reinfections provoke synergistic effect and cardiac beta-adrenergic receptors' dysfunction in the acute phase of experimental Chagas' disease**. Exp Parasitol, 103(3-4): 136-142. 2003.

- CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; CALDAS, S.; CARNEIRO, C.M.; DE LANA, M.; DA MATTA GUEDES, P. M., BAHIA, M. T. **Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions.** Parasitol Res, 103(2): 413-421. 2008.
- CANCADO, J. R.; MARRA, U. D.; BRENER Z. **Clinical Therapeutic Trial of 5-Nitro-2-Furaldehyde-Semicarbazone (Nitrofurazone) in the Chronic Form of Chagas' Disease.** Rev Inst Med Trop, 6: 12-16. 1964.
- CARABARIN-LIMA, A.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, M. C.; RODRÍGUEZ-MORALEZ, O.; BAYLÓN-PACHECO, L.; ROSALES-ENCINA, J. L.; REYES-LÓPEZ, P. A.; ARCE-FONSECA, M. **Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update.** Acta Trop, 127(2): 126-135. 2013.
- CARCERES, C. D.; NICHOLIS, S.; CORREDOR, A.; GUALDRÓN, L.; SLAIT, E.; DIB, J.C.; ARIZA, K. **Investigación de un brote de síndrome febril con miocardites aguda en Guamal., Magdalena.** Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, 12: 180-186. 1999.
- CARLIER, Y. **Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with Trypanosoma cruzi.** Rev Soc Bras Med Trop, 38 Suppl 2: 105-107. 2005.
- CARLIER, Y.; TORRICO, F. **Congenital infection with Trypanosoma cruzi: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control.** Rev Soc Bras Med Trop, 6: 767–771. 2003.
- CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. **Congenital parasitic infections: a review.** Acta Trop, 121(2): 55-70. 2012.
- CARVALHO, L. O.; ABREU-SILVA, A. L.; HARDOIM, D. J.; TEDESCO, R. C.; MENDES, V. G.; DA COSTA, S. C.; CALABRESE, K. S. **Trypanosoma cruzi and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease.** Int J Exp Pathol, 90(1): 52-57. 2009.

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

CASTRO, E. **Chagas' disease: lessons from routine donation testing.** *Transfus Med*, 19(1): 16-23. 2009.

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. **Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*.** *Biol Chem*, 378(1): 1-10. 1997.

CHAGAS C. **Nova Tripanozomíaze humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1 (S1): 159-218. 1909.

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

COOK, P. R. **The organization of replication and transcription.** *Science*, 284(5421): 1790-1795. 1999.

COSTA, A. M. **Caracterização de regiões de integração de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma urbano..** Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília. 2008.

COSTA, J. **The synanthropic process of Chagas disease vectors in Brazil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, reduviidae, triatominae) population, genetical, ecological, and epidemiological aspects.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1: 239-241. 1999.

COSTA, J.; PETERSON, A. T.; BEARD, C. B. **Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* neiva, 1911, the most important Chagas' disease vector in northeastern Brazil (hemiptera, reduviidae, triatominae).** *Am J Trop Med Hyg*, 67(5): 516-520. 2002.

COURA JR. **Mecanismo de transmissão da infecção chagásica ao homem por via oral.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 30 (supl 1): 45-47, 1997.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97 (1): 3-24. 2002.

COURA, J. R.; FERREIRA, L. F.; DA SILVA, J. **Experiences with nitrofurazone in the chronic phases of Chagas' disease.** Hospital (Rio J), 62: 957-964. 1962.

COURA, J. R.; FERREIRA, L. F.; SAAD, E. A.; MORTEO, R. E, DA SILVA, J. **Tentative treatment with nitrofurazone (Furacin) of the chornic form of Chagas' disease.** Hospital (Rio J), 60: 425-429. 1961.

CUERVO, P.; DOMONT, G. B.; DE JESUS, J. B. **Proteomics of trypanosomatids of human medical importance.** J Proteomics, 73(5): 845-867. 2010.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M. E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. **Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen.** Proc Natl Acad Sci U S A, 92(8): 3541-3545. 1995.

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. **Autoimmunity in Chagas' heart disease.** Sao Paulo Med J 113(2): 757-766. 1995.

DA SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. **First report of vertical transmission of Leishmania (Leishmania) infantum in a naturally infected bitch from Brazil.** Vet Parasitol, 166(1-2): 159-162. 2009.

DE MELO, A. S.; DE LORENA, V. M.; DE MOURA BRAZ, S. C.; DOCENA, C.; DE MIRANDA GOMES, Y. **IL-10 and IFN-gamma gene expression in chronic Chagas**

disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine*, 58(2): 207-212. 2012.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. **Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs**. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009: 642502.

DIAS, J. C. P. **Control of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries**. *Transfusion*, 31:547-557. 1991.

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

DIAS J.C. P. **A doença de Chagas e seu controle na América Latina. Uma análise de possibilidades**. *Cad Saúde Pública*. 1993; 9(2):201-209.

DIAS J. C. P, SCHOFIELD C. J. **The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94(Suppl. I):103-121.

DIAS J. C. P. **Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007b; 102(Suppl. I):11-18.

DIAS JCP. **Elimination of Chagas disease transmission: perspectives**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(Suppl. I):41-45.

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

DOCAMPO, R. **Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs.** Chem Biol Interact, 73(1): 1-27. 1990.

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

DOS SANTOS, P. V.; ROFFE, E.; SANTIAGO, H. C.; TORRES, R. A.; MARINO, A. P.; PAIVA, C. N.; SILVA, A. A.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J. **Prevalence of cd8(+) α beta t cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(low)LFA-1(high)VLA-4(high) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules.** Microbes and Infection, 3(12): 971-84. 2001.

DOSSIN FDE, M.; SCHENKMAN, S. **Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*.** Eukaryot Cell, 4(5): 960-970. 2005.

DUFFY, T.; BISIO, M.; ALTICHEH, J.; BURGOS, J. M.; DIEZ, M.; LEVIN, J. M.; FAVALORO, R. R.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A.G. **Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients.** PLoS Negl Trop Dis, 3(4): e419. 2009.

DUFFY, T.; CURA, C. I.; RAMIREZ, J. C.; ABATE, T.; CAYO, N. M.; PARRADO, R.; BELLO, Z. D.; VELAZQUEZ, E.; MUÑOZ-CALDERON, A.; JUIZ, N. A.; BASILE, J.; GARCIA, L.; RIANTE, A.; NASSER, J. R.; OCAMPO, S. B.; YADON, Z. E.; TORRICO, F.; DE NOYA, B. A.; RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A. G. **Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples.** PLoS Negl Trop Dis, 7(1): e2000. 2013.

DVORAK, J. A. **The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications.** J Cell Biochem, 24(4): 357-371. 1984.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. **Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels.** Exp Parasitol, 34(2): 268-283. 1973.

ELIAS, M. C.; FARIA, M. **Are there epigenetic controls in Trypanosoma cruzi?** Ann N Y Acad Sci, 1178: 285-290. 2009.

ELIAS, M. C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. **Transcription rate modulation through the Trypanosoma cruzi life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation.** Mol Biochem Parasitol, 112(1): 79-90. 2001.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. **Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi.** Exp Parasitol, 126(3): 283-291. 2010.

FABBRO, D.; VELAZQUEZ, E.; BIZAI, M. L.; DENNER, S.; OLIVEIRA, V.; ARIAS, E.; PRAVIA, C.; RUIZ, A. M. **Evaluation of the ELISA-F29 test as an early marker of therapeutic efficacy in adults with chronic Chagas disease.** Rev Inst Med Trop, 55(3). 2013.

FERREIRA, C. S.; MARTINHO, P. C.; AMATO NETO, V.; CRUZ, R. R. **Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease.** Rev Inst Med Trop, 43(3): 161-162. 2001.

FERREIRA, R. C.; DE MELO, M. E.; MORAES JUNIOR, M. A.; FERREIRA, L. C. **Evaluation of genotoxic activity in the blood and urine of guinea pigs treated with nifurtimox and benznidazole.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 21(5): 1069-77. 1988.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. **Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: a unique strategy that promotes persistence.** FEMS Microbiol Rev, 36(3): 734-747. 2012.

FIJAK, M.; BHUSHAN, S.; MEINHARDT, A. **Immunoprivileged sites: the testis.** Methods Mol Biol, 677: 459-470. 2011.

FLORES-CHÁVEZ, M.; FÉRNANDEZ, B.; PUENTE, S.; TORRES, P.; RODRÍGUEZ, M.; MONEDERO, C.; CRUZ, I.; GÁRATE, T.; CAÑAVATE, C. **Transfusional Chagas disease: parasitological and serological monitoring of na infected recipient and blood donor.** CID, 46:e44-47. 2008

FLORES-GARCÍA, Y.; ROSALES-ENCINA, J. L.; ROSALES-ENCINA, V. H.; SATOSKAR, A. R.; TALAMÁS-ROHANA, P. **CD4+ CD25+ FOXP3+ Treg cells induced by rSSP4 derived from T. cruzi amastigotes increase parasitemia in an experimental Chagas disease model.** Biomed Res Int, 2013: 632436. 2013.

FORNACIARI, G.; CASTAGNA, M.; VIACAVA, P.; TOGNETTI, A.; BEVILACQUA, G.; SEGURA, E. L. **Chagas' disease in Peruvian Inca mummy.** Lancet, 339(8785): 128-129. 1992.

FRANCO DA SILVEIRA, J. EM BRENNER, Z; ANDRADE,Z. A.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

FREITAS, J. L. P.; AMATO NETO, V.; SONNTAG, R.; BIANCALAMA, A.; NUSSENZWEIG, V.; BARRETO, J. G. **Primeiras ratificações de transmissão accidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue.** Rev Paul Med, 40:36-40. 1952.

FUENTES, B. R.; MATURANA, A. M; DE LA CRUZ, M. R. **Efficacy of nifurtimox for the treatment of chronic Chagas disease.** Rev Chilena Infectol, 29(1): 82-86. 2012.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Doença de Chagas.** 2011

GADELHA, A. A. M.; VERÇOSA, A. F. A.; LORENA, V. M. B.; NAKAZAWA, M.; CARVALHO, A. B.; SOUZA, W. V.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E. D.; KRIEGER, M.

A.;GOLDENBERG, S.; GOMES, Y. M. **Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA and the haemagglutination test.** Vox Sanguinis, 85: 165-170. 2003.

GAO, G.; NARA, T.; NAKAJIMA-SHIMADA, J. & AOKI, T. **Novel Organization and Sequences of Five Genes Ecoding All Six Enzymes for *de novo* Pyrimidine Biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*.** J. Mol. Biol., 285: 149-161. 1998.

GIRONÈS, N.; CARRASCO-MARIN, E.; CUERVO, H.; GUERRERO, N. A.; SANOJA, C.; JOHN, S.; FLORES-HERRÁEZ, R.; FERNANDÉZ-PEITRO, L.; CHICO-CALERO, I.; SALGADO, H.; CARRIÓN, J.; FRESNO, M. **Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology.** Ann N Y Acad Sci, 1107: 434-444. 2007.

GOLDEN, J. M.; TARLETON, R. L. ***Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity.** Exp Parasitol, 72(4): 391-402. 1991.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. W.; LUQUETTI, A. O **Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?** Mem Inst Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1: 115-121. 2009.

GOMES, Y.M.; PEREIRA, V.R.A.; NAKAZAWA, M.; ROSA, D.S.; BARROS, M.N.D.S.; FERREIRA, A.G.P.; SILVA, E.D.; OGATTA, S.F.Y.; KRIENGER, M.A.; GOLDENBERG, S. **Serodiagnosis of Chronic Chagas Infection by Using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos Kit.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 96: 497-501. 2001.

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

- GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVÃO, C.; COSTA, J; PETERSON, A. T. **Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling.** J Trop Med, 2012: 705326. 2012.
- HASHIMOTO, K.; ALVAREZ, H.; NAKAGAWA, J.; JUAREZ, J.; MONROY, C.; CORDÓN-ROSALES, C.; GIL, E. **Vector control intervention towards interruption of transmission of Chagas disease by Rhodnius prolixus, main vector in Guatemala.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 107(7): 877-887. 2012.
- HECHT, M. M.; NITZ, N.; ARAUJO, P. F.; SOUSA, A. O.; ROSA, A. C.; GOMES, D. A.; LEONARDECZ, E.; TEIXEIRA, A. R. **Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts.** PLoS One, 5(2): e9181. 2010.
- HEISE, N.; RAPER, J.; BUXBAUM, L. U.; PERANOVICH, T. M.; DE ALMEIDA, M. L. **Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of Trypanosoma cruzi.** J Biol Chem, 271(28): 16877-16887. 1996.
- HERNANDÉZ, L.M.; CANO, A.N.R.; CUCUNUBÁ, Z.; ZAMBRANO, P. **Brote de Chagas agudo em Lebrija, Santander 2008.** Revista Del Observatorio de Salud Pública de Santander (OSPS), 4(1): 28-36. 2009.
- HIGUCHI MDE, L.; BENVENUTI, L. A.; MARTINS REIS, M.; MELTZGER, M. **Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments.** Cardiovasc Res, 60(1): 96-107. 2003.
- IANNI, B.M.; MADY, C. **Como era gostoso meu caldo de cana.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 85 (6): 379-381. 2005.
- IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; WILKINSON, S. R.; FLOHÉ, L.; RADI, R. **Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification.** Free Radic Biol Med, 45(6): 733-742. 2008.

IRUETA ISUSI, A.; JARQUE MOYANO, M.; REDONDO RUIZ, P.; PÉREZ MARTIN, V. **Imported Chagas disease: alarm in Europe... as it should be.** *Aten Primaria*, 44(2): 115-116. 2012.

KLINGBEIL, M. M.; DREW, M. E.; LIU, Y, MORRIS, J. C.; MOTYKA, S. A.; SAXOWSKY, T. T.; WANG, Z.; ENGLUND, P. T. **Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication.** *Protist*, 152(4): 255-262. 2001.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. **The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*.** *Parasite Immunol*, 20(5): 207-216. 1998.

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

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

LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D. N.; LIMA, M. T.; GATTASS, C. R. ***Trypanosoma cruzi*: Paninfectivity of CL strain during murine acute infection.** *Exp Parasitol* 84: 16-27. 1996.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. **Autoimmunity in Chagas heart disease.** *Int J Parasitol*, 31(5-6): 555-561. 2001.

LEON, W.; FRASCH, A. C.; HOEIJMAKERS, J. H, FASE-FOWLER, F.; BORST, P.; BRUNEL, F.; DAVISON, J. **Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from *trypanosoma cruzi*.** *Biochim Biophys Acta*, 607(2): 221-231. 1980.

LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; ENGLUND, P. T. **Effects of RNA interference of *Trypanosoma brucei* structure-specific endonuclease-I on kinetoplast DNA replication.** J Biol Chem, 280(42): 35513-35520. 2005.

LUCIANI, M.; DI PANCRAZIO, C.; DI FEBBO, T.; TITTARELLI, M.; PODALIRI VULPIANI, M.; PUGLIELLI, M. O.; NAESSENS, J.; SACCHINI, F. **IgG antibodies from dourine infected horses identify a distinctive *Trypanosoma equiperdum* antigenic pattern of low molecular weight molecules.** Vet Immunol Immunopathol, 151(1-2): 140-146. 2013.

LUKES, J.; GUIBRIDE, D. L.; VOTÝPKA, J.; ZÍKOVÁ, A.; BENNE, R; ENGLUND, P. T. **Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure.** Eukaryot Cell, 1(4): 495-502. 2002.

LUQUETTI, O.; RASSI, A. EM BRENER, Z; ANDRADE, ZA; BARRALNETTO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas.** 2ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2000.

MACHADO, F. S.; TYLER, K. M.; BRANT, F.; ESPER, L.; TEIXEIRA, M. M.; TANOWITZ, H. B. **Pathogenesis of Chagas disease: time to move on.** Front Biosci (Elite Ed), 4: 1743-1758. 2012.

MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J; HAJDUK. S. L. **Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing.** Cell, 108(4): 435-438. 2002.

MAEDA, M. H.; KNOX, M. B.; GURGEL-GONÇALVES, R. **Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District of Brazil.** Rev Soc Bras Med Trop, 45(1): 71-76. 2012.

MANNA, L.; PACIELLO, O.; MORTE, D. R.; GRAVINO, A. E. **Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report.** Parasit Vectors, 5: 216. 2012.

MARTINEZ, M. A. **Microbiological diagnosis of sexually transmitted infections (STI): Part 1. Non-viral STI.** Rev Chilena Infectol, 26(6): 529-539. 2009.

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

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N. JR; ALENCAR, C. H.; LANGE, W.; HEUKELBACH, J. **Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas.** Trop Med Int Health 17(9): 1066-1075. 2012.

MARTÍNEZ ORTIZ, A.; HERRANZ AGUIRRE, M.; GUIBERT VALENCIA, J.; EZPELETA BAQUEDANO, C. **Congenital transmission of chagas disease in non-endemic countries. The use of PCR for diagnosis: advantages over conventional techniques.** An Sist Sanit Navar, 36(1):115-8. 2013.

MAZZA, S; MONTANA, A; BENITEZ, C; JANZI, E. **Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de madre con enfermedad de Chagas.** Mepra, 28: 41-46. 1936.

MEDEIROS, G. A.; SILVERIO, J. C.; MARINO, A. P.; ROFFE, E.; VIEIRA, V.; KROLL-PALHARES, K.; CARVALHO, C. E.; SILVA, A. A.; TEIXEIRA, M. M.; LANNES-VIEIRA, J. **Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (met-rantes) results in amelioration of cardiac tissue damage.** Microbes and Infection, 11(2): 264-73. 2009.

MILES, M.A. **Orally Acquired Chagas Disease: Lessons from an Urban School Outbreak.** The Journal of Infectious Diseases, 201: 1282-1284. 2010.

MINOPRIO, P.; EL CHEIKH, M. C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O'GARRA, A. **Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent.** J Immunol, 151(8): 4200-4208. 1993.

MITAL, P.; HINTON, B. T.; DUFOUR, J. J. **The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions.** Biol Reprod, 84(5): 851-858. 2011.

MONCAYO, A. **Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 98(5): 577-591. 2003.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. **Control of transfusional transmission].** Rev Soc Bras Med Trop, 44 Suppl 2: 64-67. 2011.

MOYA, P.; BASSO, B.; MORRETTI, E. **Congenital Chagas disease in Cordoba, Argentina: epidemiological, clinical, diagnostic, and therapeutic aspects. Experience of 30 years of follow up.** Rev Soc Bras Med Trop, 38 Suppl 2: 33-40. 2005.

MURCIA, L.; CARRILERO, B.; MUNOZ-DAVILA, M. J.; THOMAS, M. C.; LÓPEZ, M. C.; SEGOVIA, M. **Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country.** Clin Infect Dis, 56(4): 496-502. 2013.

NAGAJYOTHI, F.; MACHADO, F. S.; BURLEIGH, B. A.; JELICKS, L. A.; SCHERER, P. E.; MUKHERJEE, S.; LISANTI, M. P.; WEISS, L. M.; GARG, N. J.; TANOWITZ, H. B. **Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease.** Cell Microbiol, 14(5): 634-643. 2012.

NARA, T.; GAO, G.; MAKAJIMA-SHIMADA, J.; AOKI, T. **Localization of carbamoyl-phosphate synthetase II (CPS II) and aspartate carbamoyltransferase (ACT) genes in Trypanosoma cruzi chromosomal DNA.** Adv Exp Med Biol, 431: 227-230. 1998.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. **First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany.** Parasit Vectors, 5: 67. 2012.

NAVARRO, M.; NORMAN, F. F.; PÉREZ-MOLINA, J. A.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.
Benznidazole shortage makes chagas disease a neglected tropical disease in developed countries: data from Spain. Am J Trop Med Hyg, 87(3): 489-490. 2012.

NITZ, N.; GOMES, C.; DE CÁSSIA ROSA, A.; D'SOUZA-AULT, M. R.; MORENO, F.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. **Heritable integration of kDNA minicircle sequences from Trypanosoma cruzi into the avian genome: insights into human Chagas disease.** Cell, 118(2): 175-186. 2004.

NOIREAU, F. **Wild Triatoma infestans, a potential threat that needs to be monitored.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1: 60-64. 2009.

NOYA, B.A.; DÍAZ-BELLO, Z.; COLMENARES, C.; RUIZ-GUEVARA, R.; MAURIELLO, L.; ZAVALA-JASPE, R.; SUARÉZ, J. A.; ABATE, T.; NARANJO, L.; PAIVA, M.; RIVAS, L.; CASTRO, J.; MÁRQUES, J.; MENDOZA, I.; ACQUATELLA, H.; TORRES, J.; NOYA, O. **Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas' disease at a school in Caracas, Venezuela.** The Journal of Infectious Diseases, 201: 1308-1315. 2010.

OGBADOYI, E. O.; ROBINSON, D. R.; GULL, K. **A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes.** Mol Biol Cell, 14(5): 1769-1779. 2003.

OLIVARES, M.; DEL CARMEN THOMAS, M.; LÓPEZ-BARAJAS, A.; REQUENA, J. M.; GARCÍA-PÉREZ, J. L.; ANGEL, S.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M. C. **Genomic clustering of the Trypanosoma cruzi nonlong terminal L1Tc retrotransposon with defined interspersed repeated DNA elements.** Electrophoresis, 21(14): 2973-2982. 2000.

OLIVIERI, B. P.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A.; ARAUJO-JORGE, T. C.; COTTA-DE-ALMEIDA, V. **Benznidazole therapy in Trypanosoma cruzi-infected mice blocks thymic involution and apoptosis of CD4+CD8+ double-positive thymocytes.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(5): 1981-1987. 2005.

OPPERDOES, F. R.; BORST, P. **Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in Trypanosoma brucei: the glycosome.** FEBS Lett, 80(2): 360-364. 1977.

OPS.Organización Panamericana de La Salud. **Informe de la consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA).** 46. 2006.

PALENCHAR, J. B.; BOLLOFATTO, V. **Gene transcription in trypanosomes.** Mol Biochem Parasitol, 146(2): 135-141. 2006.

RALSTON, K. S.; HILL, K. L. **The flagellum of Trypanosoma brucei: new tricks from an old dog.** Int J Parasitol, 38(8-9): 869-884. 2008.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ R. C.; ARAYA, J. E.; DA SILVEIRA, J. F.; YOUSHIDA, N. **Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes in host cell invasion.** Infect Immun, 61(9): 3636-3641. 1993.

PAVIA, P. X.; MONTILLA, M.; FLÓREZ, C.; HERRERA, G.; OSPINA, J. M.; MANRIQUE, F.; NICHOLLS, R. S.; PUERTA, C. **The first case of congenital Chagas' disease analyzed by AP-PCR in Colombia].** Biomedica, 29(4): 513-522. 2009.

PÉREZ, A. R.; MORROT, A.; BERBERT, L. R.; TERRA-GRANADO, E.; SAVINO, W. **Extrathymic CD4+CD8+ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance.** Ann N Y Acad Sci 1262: 27-36. 2012.

PÉREZ DE PEDRO, I.; MARTIN RICO, P.; SANTAMARIA, S.; FAEZ, Y.; BLANC, P.; PASCUAL, M. J.; CUESTA, M. A.; VILLALTA, M. C.; MUÑOZ PEREZ, M. I.; VIDALES, I.; HEINIGEER, A. I. **Caso clinico de Chagas transfusional.** Emf Emerg. 10 (supl 1):14-18. 2008.

PINAZO, M. J.; GUERRERO, L.; POSADA, E.; RODRÍGUEZ, E.; SOY, D.; GASCON, J. **Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease.**

Antimicrob Agents Chemother 57(1): 390-395. 2013.

PIOT, P.; QUINN, T. C. **Response to the AIDS pandemic--a global health model.**

N Engl J Med 368(23): 2210-2218. 2013.

PORTELA-LINDOSO, A. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. **Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction].** Rev Saude Publica, 37(1): 107-115. 2003.

RAJASEKARIAH, G. R.; MONTEIRO, Y. M.; NETTO, A.; DESHPANDE, L.; SUBRAHMANYAM, D. **Protective immune responses with trickle infections of third-stage filarial larvae of Wuchereria bancrofti in mice.** Clin Exp Immunol, 78(2): 292-298. 1989.

ROTHHAMMER, F.; ALLISON, M. J.; NÚÑEZ, L.; STANDER, V.; ARRIAZA, B. **Chagas' disease in pre-Columbian South America.** Am J Phys Anthropol 68(4): 495-498. 1985.

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

SANCHEZ, L. V.; RAMIREZ, J. D. **Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects.** Parasitology, 140(2): 147-159. 2013.

SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. **The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro.** J Exp Med, 140(1): 38-53. 1974.

SANTOS, F. M.; LIMA, W. G.; GRAVEL, A. S.; MARTINS, T. A.; TALVANI, A.; TORRES, R. M.; BAHIA, M. T. **Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease.** J Antimicrob Chemother, 67(8): 1987-1995. 2012.

SANTOS, S. J.; TAKAHASHI, C. S.; NATARAJAN, A. T. **Cytogenetic effects of the antichagasic benznidazole on human cells *in vitro*.** Mutation Research, 320 (4): 305-14. 1994.

SARDINHA, L. R.; ELIAS, R.M.; MOSCA, T.; BASTOS, K. R.; MARINHO, C. R.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; ALVAREZ, J. M. **Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against Trypanosoma cruzi.** Infect Immun, 74(4): 2031-2042. 2006.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D. M.; MENDEZ-DA-CRUZ, D. A.; SILVA-MONTEIRO, E.; PEREZ, A. R.; AOKI, M. P.; BOTTASSO, O.; GUIÑAZÚ, N.; SILVA-BARBOSA, S. D.; GEA, S. **Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to Trypanosoma cruzi.** Cytokine Growth Factor Rev, 18(1-2): 107-124. 2007.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M.; LIMA, A. P.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MÜLLER-ESTERL, W. **Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors.** J Exp Med, 192(9): 1289-1300. 2000.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; MEJIA JARAMILLO, A. M.; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R. H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; SANCHEZ LEON, Z.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; MONJE RUMI, M.; LEVI, J. E.; RAMIREZ, J. D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M. I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; DE CASTRO, A. M.; GONZALEZ, C. I.; ACOSTA VIANA, K.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; TRIANA CHAVEZ, O.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; SOSA ESTANI, S.; DA SILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J. **International**

study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis, 5(1): e931. 2011.

SCHOFIELDS C. J. **Triatominae: Biología y control.** West Sussex: Eurocommunica Publications. 1994.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. **The Southern Cone Initiative against Chagas disease.** Adv Parasitol, 42: 1-27. 1999.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. **The future of Chagas disease control.** Trends Parasitol, 22(12): 583-588. 2006.

SCHUMUNIS, G. A. ***Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries.** Transfusion, 31(6): 547-557. 1991.

SESHU, S. A.; IBRAHIM, N. D. G.; ESIEVO, K. A. N.; MOHAMMED, G. **Pathology of Experimental *Trypanosoma evansi* Infection in Savannah Brown Buck.** Pakist. Jour.of Biolog. Scienses, 9(3): 522-525. 2006.

SFRISO, P.; GHIRARDELLO, A.; BOTSIOS, C.; TONON, M.; ZEN, M.; BASSI, N.; BASSETO, F, DORIA, A. **Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship.** J Leukoc Biol, 87(3): 385-395. 2010.

SILVA, F. L., RODRIGUES, A. A.; REGO, I. O.; SANTOS, R. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*.** Vet Parasitol, 151(1): 86-90. 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. **Oral transmission of Chagas disease.** Clin Infect Dis, 54(6): 845-852. 2012.

SILVA, J. S.; MORRISEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S. G. **Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection.** J Exp Med, 175(1): 169-174. 1992.

SILVA, N.N.; CLAUSELL, D.T.; NÚBILOS, H.; MELLO, A.L.; OSSANAI, J.; RAPONE, T.; SNELL, T. **Surto epidêmico da doença de Chagas com provável contaminação oral.** Revista do Instituto de Medicina Tropical, 10 (5): 265-276. 1968.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S, G. **Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta).** J Exp Med, 174(3): 539-545. 1991.

SIMÕES-BARBOSA, A.; ARGANÁRAZ, E. R.; BARROS, A. M.; ROSA, A. C.; ALVES, N. P.; LOUVANDINI, P.; D'SOUZA-AULT, M. R.; NITZ, N.; STURM, N. R.; NACIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. **Hitchhiking Trypanosoma cruzi minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 101(8): 833-843. 2006.

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

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. **Sensitive detection and schizodeme classification of Trypanosoma cruzi cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease.** Mol Biochem Parasitol, 33(3): 205-214. 1989.

TAKEHARA, H. A.; PERINI, A.; DA SILVA, M. H.; MOTA, I. **Trypanosoma cruzi: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse.** Exp Parasitol, 52(1): 137-146. 1981.

TANOWITZ, H. B.; MACHADO, F. S.; JELICKS, L. A.; SHIRANI, J.; DE CARVALHO, A. C.; SPRAY, D. C.; FACTOR, S. M.; KIRCHHOFF, L. V.; WEISS, L.M.

Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease).

Prog Cardiovasc Dis, 51(6): 524-539. 2009.

TEIXEIRA, A.R.L. **Patologia da doença de Chagas humana. In: Doença de Chagas e evolução.** Editora UnB, 89-101. 2007.

TEIXEIRA, A. R.; ARGAÑARAZ, E. R.; FREITAS, L. H. JR; LACAVA, Z. G.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. **Possible integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircles into the host cell genome by infection.** Mutat Res, 305(2): 197-209. 1994.

TEIXEIRA, A. R.; CÓRDOBA, J. C.; SOUTO MAIOR, I.; SOLÓRZANO, E. **Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with Benznidazole.** Am J Trop Med Hyg 43(2): 146-158. 1990.

TEIXEIRA, A. R.; CUNHA NETO, E.; RIZZO, L.V. **Autoimmunity is not an impediment for vaccination against Chagas disease.** Rev Soc Bras Med Trop, 20(2): 123-127. 1987.

TEIXEIRA, A. R.; GOMES, C.; NITZ, N.; SOUSA, A. O.; ALVEZ, R. M; GUIMARO, M. C.; CORDEIRO, C.; BERNAL, F. M.; ROSA, A. C.; HEJNAR, J.; LEONARDECZ, E.; HECHT, M. M. **Trypanosoma cruzi in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism.** PLoS Negl Trop Dis, 5(3): e1000. 2011a.

TEIXEIRA, A. R.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. **Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity.** Clin Microbiol Rev, 24(3): 592-630. 2011b.

TEIXEIRA, A. R.; LACAVA, Z.; SANTANA, J. M.; LUNA, H. **Insertion of Trypanosoma cruzi DNA in the genome of mammal host cell through infection.** Rev Soc Bras Med Trop, 24(1): 55-58. 1991.

TEIXEIRA, A. R., NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. **Evolution and pathology in chagas disease--a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 101(5): 463-491. 2006.

TEIXEIRA, A. R.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. **Chagas disease**. Postgrad Med J, 82(974): 788-798. 2006.

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

TEIXEIRA, A. R.; SANTANA, J. M. **Chagas' disease. Immunotoxin inhibition of Trypanosoma cruzi release from infected host cells in vitro**. Lab Invest, 63(2): 248-252. 1990.

TEIXEIRA, S.M.R. **Control of gene expression in Trypanosomatidae**, Bras. J. Med. Biol. Res., 31:1503-1516. 1998.

VÁSQUEZ, M.; BEN-DOV, C.; LORENZI, H.; MOORE, T.; SCHIJMAN & LEVIN, M.J. **The short interspersed repetitive element of Trypanosoma cruzi, SIRE, is a part of VIPER, an unusual retroelement related to long terminal repeat retrotransposons**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97(5): 2128-2133. 2000.

VEXENAT, A.C. **Diagnóstico sorológico diferencial de infecções causadas por Trypanosoma cruzi, Leishmania (Viannia) braziliensis, Leishmania chagasi e outras doenças crônicas**. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília. 1993.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. **Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa Trypanosoma cruzi, Leishmania chagasi and Leishmania (viannia) braziliensis**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38: 177-185. 1996.

VIANNA, G. **Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”**. Mem Inst Oswaldo Cruz, 3: 276-294. 1911.

VILLALOBOS, R. **Reaparición de Enfermedades Tropicales**. Kasmera, 35(2): 89-90. 2007.

VOELKER, R. **Congenital Chagas disease reported in United States.** JAMA 308(5): 443. 2012.

WALTON, M. I.; WORKMAN, P. **Nitroimidazole bioreductive metabolism. Quantitation and characterisation of mouse tissue benznidazole nitroreductases *in vivo* and *in vitro*.** Biochemical Pharmacology, 36 (6): 887-96. 1987.

WESTENBERG, S. J.; STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. **Trypanosoma cruzi 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids.** Int J Parasitol, 36(3): 337-346. 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee.** WHO Technical Report Series, 38-42. 1991.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas Disease. Second report of a WHO expert committee.** WHO Technical Report Series, 905. 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas Disease. Second report of a WHO expert committee.** WHO Technical Report Series, 2013.

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

ZACKS, M. A.; GARG, N. **Recent developments in the molecular, biochemical and functional characterization of GPI8 and the GPI-anchoring mechanism [review].** Mol Membr Biol, 23(3): 209-225. 2006.