



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Faculdade de Medicina**  
**Pós-Graduação em Ciências Médicas**  
**Laboratório Interdisciplinar de Biociências**

**Influência da via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na carga parasitária e produção de anticorpos específicos**

**Aluna: Camilla Alves Santana**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana M. Hecht**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Hagström**

Brasília – DF

2015

**Camilla Alves Santana**

**Influência da via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na carga parasitária e produção de anticorpos específicos**

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

Brasília, 2015.

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

**Financiamento: CAPES/CNPq**

## **BANCA EXAMINADORA**

Dr<sup>a</sup>. Mariana Machado Hecht (presidente)  
Universidade de Brasília – UnB

Dr<sup>a</sup>. Tatiana Karla dos Santos Borges  
Universidade de Brasília – UnB

Dr. David Neves  
Universidade de Brasília – UnB

Dr. Vagner José Mendonça (suplente)  
Universidade de Brasília - UnB

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

*Leonardo da Vinci*

## DEDICATÓRIA

*Ao Pai Maior, nosso Deus, que permitiu e trilhou esse lindo trabalho.*

*Ao meu príncipe Pedro Henrique, razão do meu viver, por todas as alegrias que me proporciona. Você tornou o caminho mais belo.*

*Ao meu querido esposo Fred, por todo carinho e dedicação que me devota. Você deixou a caminhada mais leve.*

*Aos meus amados pais, Deli e Edson, pelo apoio de toda vida!  
Por vocês percorri.*

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi realizado pela influência e estímulo de muitas pessoas, as quais agradeço:

Às pessoas que passaram pela minha vida:

A minha professora de biologia ao longo do ensino médio (Geórgia), a qual foi responsável pelo meu “gostar” à ciência. A professora Tatiana Karla que durante a graduação foi impecável em seu ensino de parasitologia e imunologia, conhecimentos pelos quais me apaixonei (tê-la em minha banca é uma forma de agradecê-la). Também a professora Tânia Cristina, pelas oportunidades a mim dadas, as quais me fizeram chegar até aqui. E a tantos outros professores queridos, que estarão sempre em meu coração em especial ao professor Cirino, sempre muito interessado aos meus conhecimentos.

Às pessoas que tornaram esse trabalho possível:

A minha orientadora Mariana Hecht, por confiar em mim na realização desse trabalho, por todo o conhecimento transferido, pelo estímulo em me preparar para a vida científica. Mari admiro sua forma de orientar, sempre disponível, aberta as nossas opiniões e envolvendo os alunos uns nos trabalhos dos outros, isso é magnífico e nos torna unidos.

Minha co-orientadora Lou, sem a qual não estaria realizando este trabalho. Serei grata a você por toda minha vida pela oportunidade.

Agradeço também a professora Nadjar Nitz a qual foi minha co-orientadora indiretamente, obrigada pelo conhecimento compartilhado, não só científico, mas principalmente espiritual. Nad, você tem uma postura admirável.

Aos colegas do laboratório (Manatealoucas):

Meu estagiário querido André Wagner, você foi um grande colega e dedicado aluno, sou muito grata de tê-lo ao meu lado ao longo desse trabalho. Bruna, Búzios, Adriano e Luíza, estagiários do laboratório, vocês são de mais, sempre dispostos a ajudar e aprender. Sucesso na vida de todos vocês! Minhas amigas Aline e Tamires,

peessoas maravilhosas, as quais admiro muito o jeito, tão diferente do meu, de ser; vocês me ensinam a ser uma pessoa melhor. Celinha, amiga incrível, companheira de sala, de bancada, de congressos, de confidencias. Obrigada pela amizade que criamos! Thaisinha Minuzzi, amizade linda. Admiro seu conhecimento, quero ser igual você!!! Agradeço a tantos outros que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, Aninha, Ana de Cássia, Rafael Andrade, Bruno Dallago, Professora Yanna, Isabela, o meu muito obrigada!

Aos meus grandes incentivadores:

Lilian e Jheny sem palavras, as melhores amigas do mundo, amo vocês! Ronaldo e Patrick, amigos lindos que só veem as coisa boas em mim, fazem eu me sentir a melhor, mais linda e inteligente pessoa do mundo. Vocês não existem! Mateus Minuzzi, o amigo mais fofo... rrsrsr!!! Obrigada pela amizade que me devota. E a Zayra, minha “cuma” “mara”, a irmã que papai do céu me permitiu escolher, pessoa sem igual. Indescritível é você na minha vida.

A família, meus grandes admiradores:

Família, que em sua maioria é formada por laços não sanguíneos, mais de muito amor. Tias Haydêe, Lu, Cleusa, Marizete, Edna; Tio Edmilson, Primos Rafael, Cris, Lucas; minha irmã Dilma e madrastra Maria Lúcia, obrigada por acreditarem em mim! Agradecimento especial ao meu padrasto mais que querido, o meu maior admirador, obrigada por toda essa confiança, estímulo e admiração que deposita em mim. Marido e filho, obrigada pela linda família que formamos.

Por fim, porém mais importante:

Agradeço aos meus pais Deli e Edson, por todas as oportunidades que me prepuseram nessa vida, por todas as dificuldades que passaram para me darem o melhor, e por tudo que ainda fazem. Você são pais maravilhosos e sou muito agradecida por ser fruto de pessoas como vocês. Esse trabalho é uma forma de agradecê-los, por tudo que significam para mim.



## RESUMO

A doença de Chagas é uma das principais doenças parasitárias na América Latina, atingindo cerca de oito milhões de pessoas. As manifestações da doença afetam o coração, intestinos e sistema nervoso. Seu tratamento é considerado ineficiente, não existindo medicamentos ou vacinas capazes de prevenir o desenvolvimento da patologia. Dessa forma, a maneira mais efetiva de se combater a doença de Chagas é realizando seu diagnóstico precoce e atuando sobre suas diversas vias de transmissão. Este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre via de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, o estabelecimento da carga parasitária e produção de anticorpos específicos, parâmetros avaliados para se estabelecer o diagnóstico da infecção. Camundongos BALB/c foram infectados com  $10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* pelas vias intraperitoneal, oral e ocular. Infecções pelas vias sexual e congênita ocorreram de maneira natural. As avaliações foram realizadas durante a fase crônica da infecção. A qPCR revelou uma maior carga parasitária em camundongos infectados pela via intraperitoneal, o que também foi acompanhado por uma maior produção de anticorpos. As vias oral e ocular apresentaram mínima carga parasitária e não obtiveram títulos de anticorpos reagentes. O aumento da concentração de *T. cruzi* inoculada por essas duas vias promoveu um aumento da carga parasitária com consequente produção de anticorpos específicos. As vias sexual e congênita mostraram baixa, porém relevante, carga parasitária, o que as tornou reagentes nos testes sorológicos. Destaca-se que 54,6% dos camundongos infectados pela via congênita apresentaram diagnóstico molecular positivo com testes sorológicos negativos. O desafio desses animais com formas tripomastigotas de *T. cruzi* resultou em soroconversão em apenas 41,6% dos animais, sugerindo que os demais podem ter sido tolerizados aos antígenos parasitários. A demonstração de que a rota de aquisição do *T. cruzi* influencia na determinação da carga parasitária de camundongos na fase crônica da doença, bem como no perfil de produção de anticorpos, auxiliará na compreensão da epidemiologia da doença de Chagas em diferentes ecossistemas, onde predominam diferentes vias de transmissão.

Palavras Chaves: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Carga parasitária, Títulos de anticorpos.

## ABSTRACT

Chagas disease is a major parasitic disease in Latin America, affecting about eight million people. The clinical manifestations affect the heart, intestines and nervous system. The treatment is considered ineffective, with no drugs or vaccines able to prevent disease development. The most effective way to fight Chagas disease is thus conducting early diagnosis and acting on its various routes of transmission. This study aimed to evaluate the relationship between *T. cruzi* transmission route, the establishment of parasite load and specific antibodies production, parameters evaluated to establish the diagnosis of the infection. BALB /c mice were infected with  $10^3$  *T. cruzi* trypomastigotes by intraperitoneal, oral and ocular routes. Sexual and congenital transmissions occurred naturally. Analyses were conducted during Chagas disease chronic phase. qPCR revealed a higher parasite load in mice infected by intraperitoneal route, which was also accompanied by an increased production of antibodies. Oral and ocular pathways had minimal parasite burden and did not obtain positive antibodies titers. A higher concentration of *T. cruzi* inoculums in these two pathways promoted an increase in parasite load and antibodies production. Sexual and congenital routes showed low but significant parasite load, which made them positive in serological tests. It is noteworthy that 54.6% of congenital infected mice tested positive in qPCR and negative in serological tests. The challenge of these animals with *T. cruzi* trypomastigotes resulted in serum conversion in only 41.6% animals, suggesting tolerization to parasite antigens. The demonstration *T. cruzi* acquisition route influences in parasite load of mice in the chronic phase of the disease and antibody production profile will assist in the understanding of Chagas disease epidemiology in different ecosystems.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Parasitic load, Antibody titles.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Distribuição global da doença de Chagas.	21
<b>Figura 2:</b>	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	22
<b>Figura 3:</b>	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.	25
<b>Figura 4:</b>	Fluxograma da divisão dos grupos experimentais	44
<b>Figura 5:</b>	Fluxograma da metodologia empregada no estudo.	47
<b>Figura 6:</b>	Curva padrão gerada a partir de amplificação de diluições seriadas de DNA nuclear de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	55
<b>Figura 7:</b>	Quantificação da carga parasitária do coração de camundongos infectados por diferentes vias.	59
<b>Figura 8:</b>	Avaliação da produção de anticorpos IgG específicos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> pelo método ELISA indireto.	60
<b>Figura 9:</b>	Avaliação da produção de anticorpos IgG específicos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> detectados pela Imunofluorescência indireta.	61
<b>Figura 10:</b>	Título de Anticorpos IgG e Carga Parasitária de camundongos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> por diferentes vias.	62
<b>Figura 11:</b>	Papel da concentração do inóculo inicial para determinação da carga parasitária e título de anticorpos de camundongos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> por diferentes vias.	64
<b>Figura 12:</b>	Avaliação da tolerização a antígenos do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	65
<b>Figura 13:</b>	Carga parasitária dos filhotes desafiados	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Positividade do teste a fresco de camundongos infectados por diferentes vias de transmissão e no desafio.	58
<b>Tabela 2:</b>	Positividade no diagnóstico sorológico e molecular de camundongos dos grupos via congênita e desafio.	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>DCA</b>	Doença de Chagas aguda
<b>DCC</b>	Doença de Chagas crônica
<b>DME</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco)
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DTU</b>	<i>Discrete Typing Unit</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzimas)
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de Fluoresceína)
<b>GIPLs</b>	Glicoinositolfosfolipídios
<b>gp</b>	Glicoproteína
<b>GPI</b>	Glicosil Fosfatidil Inositol
<b>HE</b>	Hemaglutinação
<b>IFI</b>	Imunofluorescência indireta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>kDNA</b>	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)
<b>LIT</b>	<i>Liver Infusion Triptose</i>
<b>LPPG</b>	Lipopeptidofosfoglicana

<b>MALT</b>	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i> (Tecido Linfóide Associado à Mucosa)
<b>MG</b>	Minas Gerais (Estado Brasileiro)
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>NID</b>	Nomenclatura Internacional de Doenças
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i> (Assassina Natural)
<b>N-qPCR</b>	<i>Nested</i> PCR quantitativa
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em cadeia)
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PTK</b>	<i>Protein Tyrosine Kinase</i> (Proteínas Tirosina Quinase)
<b>QBC</b>	<i>Quantitative Buff Coat</i>
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>RN</b>	Recém-nascido
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SMF</b>	Sistema Mononuclear Fagocitário
<b>TC</b>	Transmissão congênita
<b>Th</b>	Células T auxiliares
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor beta</i> (Fator de Transformação do Crescimento beta)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
<b>V</b>	Volume
$\bar{x}$	Média
$\sigma$	Desvio Padrão

## SUMÁRIO

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.</b>	<b>Doença de Chagas</b> .....	18
1.1	Breve histórico.....	18
1.2	Epidemiologia.....	19
1.3	Agente Etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
1.3.1	Ciclo de Vida.....	23
1.4	Resposta imune do hospedeiro.....	26
1.5	Manifestações Clínicas.....	28
1.6	Tratamento .....	29
1.7	Diagnóstico .....	31
1.8	Vias de Transmissão.....	33
1.8.1	Transmissão vetorial .....	33
1.8.2	Transmissão oral.....	34
1.8.3	Transmissão congênita.....	36
1.8.4	Transmissão sexual.....	37
1.8.5	Transmissão transfusional.....	38
1.8.6	Outras formas de transmissão.....	39
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
1.	Objetivo geral.....	42
2.	Objetivos específicos.....	42
<b>IV.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
1.	Amostragem .....	43

2.	<b>Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	45
3.	<b>Infecção dos animais</b> .....	45
4.	<b>Avaliação da Infecção</b> .....	46
5.	<b>Coleta de amostras</b> .....	46
6.	<b>Imunodiagnóstico</b> .....	47
6.1	<b>Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima (ELISA) Indireto</b> .....	48
6.2	<b>Imunofluorescência Indireta (IFI) quantitativa</b> .....	49
7.	<b>Extração de DNA</b> .....	50
7.1	<b>Extração de DNA total de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	50
7.2	<b>Extração de DNA do sangue de camundongo</b> .....	51
7.3	<b>Extração de DNA de tecido cardíaco de camundongo</b> .....	51
8.	<b>Quantificação, análise eletroforética do DNA e armazenamento</b> .....	52
9.	<b>Diagnóstico Molecular</b> .....	52
9.1	<b>Reação de Polimerização em cadeia quantitativa (qPCR)</b> .....	52
9.1.1	<b>Etapa de pré-amplificação</b> .....	52
9.1.2	<b>Nested qPCR</b> .....	53
9.1.3	<b>Padronização da PCR em tempo real quantitativa (qPCR)</b> .....	54
10.	<b>Análise estatística</b> .....	56
V.	<b>RESULTADOS</b> .....	57
1.	<b>Diagnóstico parasitológico</b> .....	57
2.	<b>Diagnóstico Molecular</b> .....	58
2.1	<b>Quantificação da Carga Parasitária</b> .....	58
3.	<b>Determinação da taxa de anticorpos anti-<i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	59
4.	<b>Comparação do Título de Anticorpos com a Carga Parasitária presentes em camundongos infectados por diferentes vias</b> .....	61
5.	<b>Papel da carga parasitária inicial para a produção de anticorpos específicos</b> .....	63



6.	Teste de Tolerização.....	64
VI.	DISCUSSÃO .....	67
1.	Influência da via de transmissão e concentração do inóculo inicial na carga parasitária da DC crônica.....	67
2.	Influência da via de transmissão e concentração do inóculo na produção de anticorpos específicos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	69
3.	Importância da via de transmissão para a evolução clínica da Doença de Chagas.....	70
4.	Transmissão congênita do <i>Trypanosoma cruzi</i> e possível tolerização aos antígenos parasitários.....	72
5.	E como fica o diagnóstico para a doença de Chagas? .....	74
VII.	CONCLUSÕES .....	76
VIII.	PERSPECTIVAS .....	77
IX.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

# I. INTRODUÇÃO

## 1. Doença de Chagas

### 1.1 Breve histórico

A doença de Chagas (DC), cuja terminologia adotada pela Nomenclatura Internacional de Doenças (NID) é Tripanossomíase americana é uma doença tropical transmissível entre as mais prevalente na América Latina (OPAS/OMS, 2014a). Dados da paleoparasitologia sugerem que a DC tenha alcançado a população humana, na Região Andina, há mais de 9.000 anos. A mais antiga detecção do *Trypanosoma cruzi* em humanos se deu em múmias do povo Chinchorro, fundadores dos primeiros assentamentos na região litorânea do deserto de Atacama. Infecções de *T. cruzi* foram também relatadas em múmias de povos subsequentes aos Chinchorros que viviam na mesma área até a época da conquista espanhola no século XVI. Igualmente, detectou-se o DNA do *T. cruzi* em múmias do Vale do Peruaçu (MG, Brasil) e no Deserto de Chihuahua (Texas, EUA) (Steverding, 2014).

O primeiro relato da DC foi feito em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano da Chagas, médico, cientista, pesquisador e sanitarista brasileiro que se dedicou ao estudo das doenças tropicais (Moncayo, 2010). Na cidade de Lassance (MG, Brasil), enquanto coordenava as atividades de combate à malária, Carlos Chagas coletou e examinou diversas espécies da fauna brasileira, Em um sagui, identificou uma nova espécie de *Trypanosoma*, que batizou de *T. minasense*. Moradores locais relataram que um inseto, popularmente conhecido como “barbeiro” (pelo fato de picar suas vítimas preferencialmente no rosto enquanto dormiam), era frequentemente encontrado nas precárias residências daquela região. Sabendo da importância de insetos hematófagos como transmissores de doenças, Chagas examinou alguns barbeiros, onde verificou, em seu intestino, tripanossomatídeos. Posteriormente, concluiu que o protozoário se tratava de uma nova espécie, a qual nomeou de

*Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu orientador e amigo, o sanitarista Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz.

Aprofundando a descoberta, Carlos Chagas encontrou o protozoário em um gato, evidenciando um reservatório doméstico. Para averiguar se este era um parasito patogênico para o homem, realizou exames de sangue nos moradores da região de Lassance, identificando o *T. cruzi* no sangue periférico de uma menina febril de 2 anos (Chagas, 1909). Berenice foi o primeiro caso da nova doença humana, da qual Carlos Chagas identificou o agente etiológico, seu ciclo evolutivo nos hospedeiros invertebrados (Hemiptera: Triatominae) e vertebrados (mamíferos de várias classes), a clínica e a sintomatologia inerente à fase aguda da doença e o primeiro teste de diagnóstico (gota espessa) (Neves e cols., 2005; Cimerman e Cimerman, 2008). Ainda estudou a patologia, a epidemiologia, mecanismos de transmissão e formas de tratamento da mesma. Além disso, conseguiu que as autoridades dessem notoriedade à doença, uma vez que Carlos Chagas acreditava que a nova moléstia tropical expressava a identidade nacional em vários sentidos além do geográfico (Gilber, 2007; Kropf, 2009).

A DC está associada a vários fatores sociais e ambientais que expõem milhões de pessoas à infecção. Até meados da década de 1970, o risco de transmissão do *T. cruzi* estava diretamente ligado à pobreza e às más condições de moradia da população em áreas endêmicas. Entretanto, o crescente êxodo rural nas décadas de 1970 e 1980 deu início a uma mudança dos padrões tradicionais de epidemiologia da doença para uma infecção também urbana (OMS, 2008; OPAS / OMS, 2010).

## **1.2 Epidemiologia**

A DC é considerada uma antropozoonose decorrente do deslocamento dos vetores de seus habitats silvestres, devido a ação do homem no meio ambiente (Westphalen e cols., 2012). Embora o vetor do *T. cruzi* esteja bem distribuído pelo continente americano, abrangendo uma área, desde o sul dos Estados Unidos até a província de Chubut na Argentina (Silveira, 2000), é especificamente a América Latina que se encontra endêmica. São 21 países com aproximadamente 12 milhões de portadores da doença crônica - cerca de 2 a 3 milhões no Brasil – e, a cada ano,

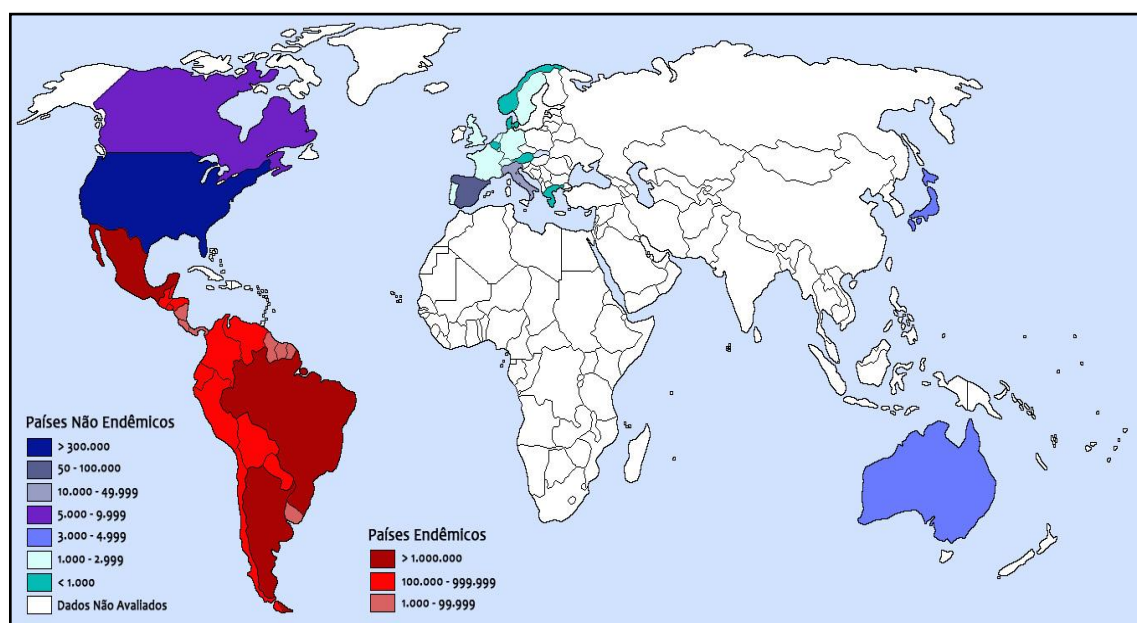
há 28.000 novos casos e mais de 10.000 mortes. Atualmente, cerca de 65 milhões de pessoas na América vivem em áreas de exposição e correm o risco de contrair a infecção (OPAS / OMS, 2014b).

Até a década de 1970, as áreas com risco de transmissão da doença, pela presença de vetores infectados, incluía 18 Estados brasileiros e mais de 2.200 municípios. Desses, 711 com presença do *Triatoma infestans*, principal espécie responsável pela transmissão da DC. Países do Cone Sul deram início a um programa para controlar e eliminar esta espécie vetora (Dias, 2000). Ações sistematizadas de controle químico foram instituídas, o que levou a uma expressiva redução da presença de *T. infestans* e, simultaneamente, da transmissão do *T. cruzi* às pessoas. Em reconhecimento, o Brasil recebeu, em 2006, a certificação internacional de interrupção da transmissão da DC pelo *T. infestans*, concedida pela Organização Pan Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde (OPAS / OMS) (Vinhaes e Dias, 2000).

O perfil epidemiológico da doença no Brasil apresenta um novo cenário devido à ocorrência de casos e surtos de doença de Chagas aguda (DCA) relacionados à ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros), os quais vêm ocorrendo especialmente na Amazônia Legal. No período de 2000 a 2011, foram registrados mais de 1.200 casos: 70% por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial e 22% sem identificação do modo de transmissão (Fiocruz, 2013).

O coeficiente de mortalidade específico para DC no Brasil caiu de 5,2/100.000 habitantes em 1980 para 3,5/100.000 em 1997 e 2,7 3,5/100.000 em 2008 (Melo, 2011). Essa diminuição também é verificada nas estimativas mundiais, onde o número de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo era de 16 a 18 milhões em 2007 e atualmente afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas (OMS, 2007; 2015). Medidas de enfrentamento da doença adotadas em países da América Latina, uso de testes de diagnóstico mais sensíveis para doadores de órgãos e sangue (Castro, 2009) e maior acesso da população à informação podem explicar esse decréscimo.

Nas últimas décadas, foram registrados casos em países não endêmicos por outros mecanismos de transmissão ou pela migração intensa de latino-americanos para outros continentes (Fiocruz, 2013). A doença tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos, Canadá, países europeus e em alguns países do Pacífico Ocidental (OMS, 2015). A Figura 1 mostra a distribuição global dos casos de DC em países endêmicos e não endêmicos.



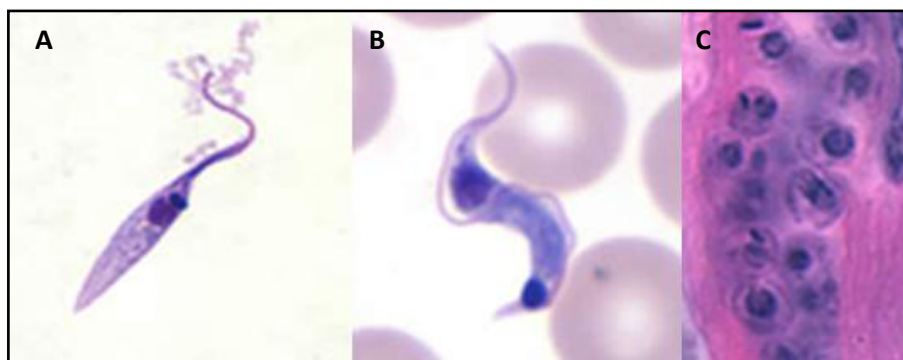
**Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas.** Tonalidades apresentadas de acordo com a quantidade de casos de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. Países endêmicos apresentados em tons de vermelho. Mapa baseado em estimativas oficiais, 2006 - 2010. (Fonte: Autor, dados retirados da OMS, 2013; Steverding, 2014).

### 1.3 Agente Etiológico: *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado digenético pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (Chagas, 1909). É um organismo altamente diversificado e especializado, apresentando diversas peculiaridades de grande interesse filogenético e evolutivo (Marcili, 2008; Carballero, 2014). Uma das principais características do *T. cruzi* é a existência do cinetoplasto, organela localizada na única mitocôndria. O DNA do cinetoplasto (kDNA para

*kinetoplast* DNA) representa cerca de 20 – 25% do total de DNA da célula, e é formado por uma rede fibrosa constituída por moléculas organizadas em minicírculos e maxicírculos (Fidalgo e Gille, 2011; Teixeira e cols., 2011).

O *T. cruzi* apresenta três principais formas em seu ciclo biológico (Figura 2), as quais são identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo. A forma tripomastigota é encontrada na porção final do intestino do inseto vetor (tripomastigota metacíclica), no sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado. É uma forma alongada e levemente achatada, com o cinetoplasto bem afastado e anterior ao núcleo, o qual é centralizado e ovalado. O flagelo emerge da bolsa flagelar, percorre toda a extensão lateral do parasito formando uma membrana ondulante, e tornando-se livre na porção anterior. As amastigotas são as formas multiplicativas (divisão binária), sendo encontradas no interior das diversas células nucleadas dos mamíferos. São ovóides, com núcleo centralizado e arredondado, e da bolsa flagelar emerge um reduzido flagelo; entre o núcleo e o flagelo encontra-se o cinetoplasto. Epimastigota é a forma multiplicativa do intestino do vetor. É alongada, tem forma fusiforme e, próximo à saída do flagelo, encontra-se o cinetoplasto em forma de bastão, localizado posterior e próximo ao núcleo. Também existe a peculiar forma esferomastigota, organismo arredondado com flagelo circundando o corpo (Teixeira e cols., 2012).



**Figura 2. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.** (A) Epimastigota extracelular, replicativa no intestino médio do inseto-vetor; (B) Tripomastigota; (C) Amastigota intracelular, replicativa no hospedeiro vertebrado (CDC, 2013).

A população de *T. cruzi* não é homogênea, sendo constituída por diferentes linhagens. Essas populações possuem comportamento diverso no que se refere a curvas de parasitemia, interação com células hospedeiras e resposta imune do hospedeiro (Macedo e cols., 2002). Estudos sobre o comportamento biológico de cepas do *T. cruzi* e seus perfis histopatológicos em animais experimentais agrupam os isolados em biodemas: I, II e III (Devera e cols., 2002), que por sua vez correspondem a zimodemas (grupos de cepas que apresentam perfis eletroforéticos isoenzimáticos semelhantes) específicos (Zingales, 2011).

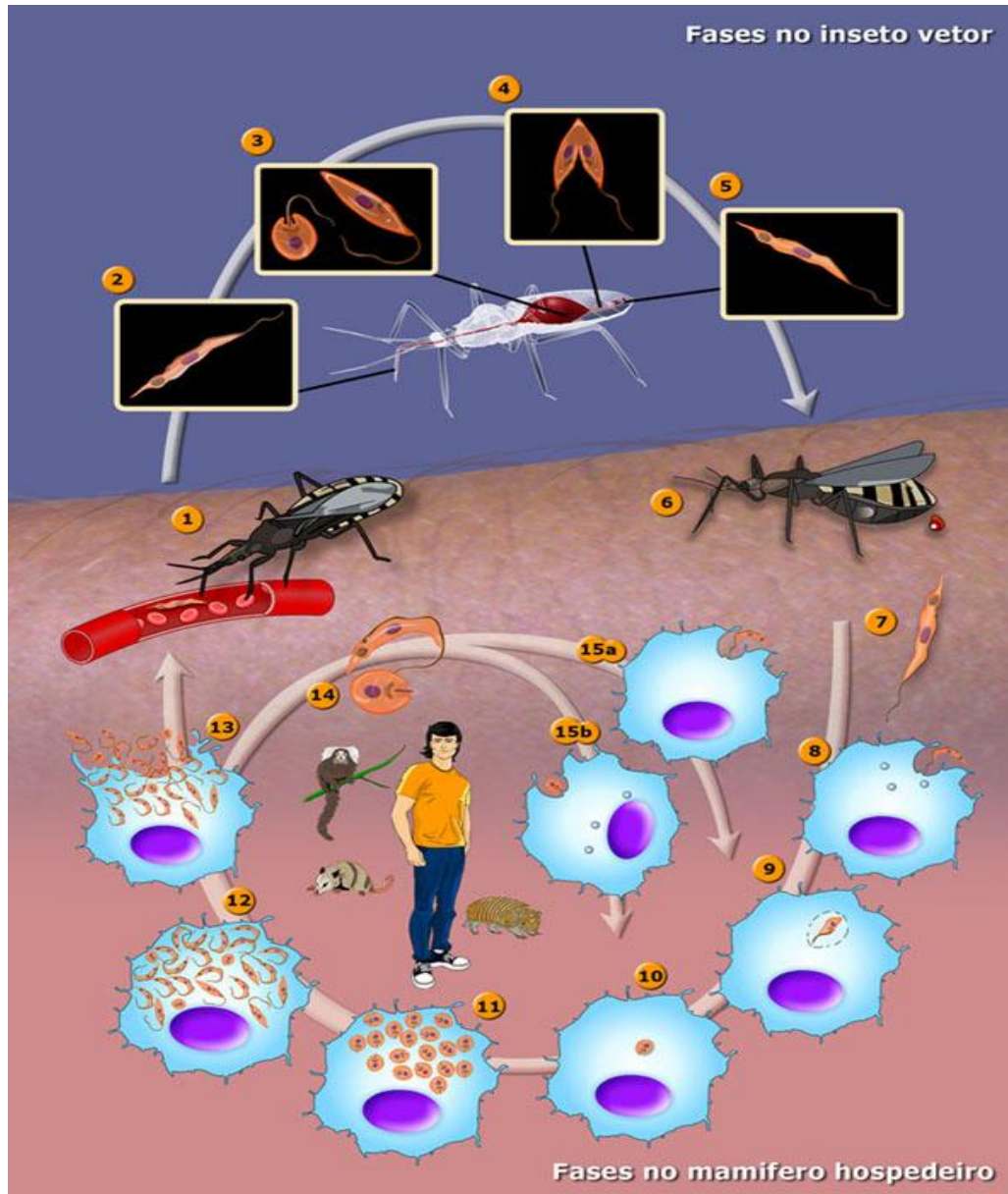
As populações de *T. cruzi* são também heterogênicas geneticamente, um consenso foi estabelecido, onde o *T. cruzi* foi dividido em seis grupos (DTU- do inglês *Discrete Typing Unit*), que levam a nomenclatura TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI. DTU é definido como um conjunto de isolados que são geneticamente semelhantes e que podem ser identificados por marcadores moleculares e imunológicos comuns. (Zingales e cols., 2012).

### **1.3.1 Ciclo de Vida**

Em condições naturais, o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Figura 3) tem início quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas de um hospedeiro vertebrado infectado. Essas formas são conduzidas à porção anterior do estômago do hospedeiro invertebrado, onde se transformam em epimastigotas e algumas formas esferomastigotas. As formas epimastigotas sobreviventes à digestão alcançam o intestino médio, onde se multiplicam e se aderem às membranas perimicrovilares pelo flagelo. Em seguida, se soltam e migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (formas infectantes para o hospedeiro vertebrado), ficando aderidas à cutícula que reveste o epitélio do reto e do saco retal do inseto. No momento do repasto sanguíneo, estas formas são eliminadas junto com as fezes e urina do triatomíneo, sobre a pele ou mucosas de um novo hospedeiro vertebrado. A penetração do parasito pode se dar diretamente pela mucosa, por feridas na pele ou ocasionada por coceiras no local da picada. As formas tripomastigotas metacíclicas são fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), seguindo-se à formação do vacúolo

parasitóforo, onde assumem uma forma amastigota, provocam a lise da membrana do vacúolo e, então, se multiplicam no citoplasma da célula. Após replicação, transformam-se em tripomastigotas que são liberadas no meio extracelular, onde podem migrar pela corrente sanguínea e procurar outras células para nova multiplicação. A lise da célula hospedeira pode ocorrer antes da total diferenciação de amastigota para tripomastigota, o que gera o aparecimento das duas formas no meio externo, e assim, ambas as formas podem invadir novas células. Durante o hematofagismo do vetor, ocorre a ingestão das formas tripomastigotas do parasito, presentes na circulação do hospedeiro mamífero, recomeçando o ciclo (Teixeira e cols., 2012).





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

#### 1.4 Resposta imune do hospedeiro

Como mecanismos de evasão da lise mediada pelo complemento o *T. cruzi* tem a capacidade de invadir diversas células do hospedeiro, sendo o grau de adesão, variável de acordo com a cepa do parasita, com a forma evolutiva e com o tipo de célula (Neira e cols., 2002; Cestari, 2006). Mucinas, transialidases, polissacarídeos, glicoproteínas e lipídios, âncorados ao glicosil fosfatidil inositol (GPI), estão envolvidas no processo de invasão e regulação do sistema imune do hospedeiro pelo parasito (Santiliano e Almeida, 2012). As formas tripomastigotas não sintetizam ácido siálico, mas utiliza glicoproteínas gp83, a qual interage com receptor p74 presente na membrana da célula hospedeira, para a infecção de células fagocíticas e não-fagocíticas (Villalta e cols., 2001). A gp160 liga-se a C3b e C4b, bloqueando a formação da cascata por inibição da C3 convertase. Já a forma tripomastigota metacíclica, utiliza gp82 que se liga à célula do hospedeiro levando a uma via de sinalização, mediada por PTK. As glicoproteínas de superfície de *T. cruzi* são importantes para mobilização de cálcio intracelular, o qual é essencial para internalização do parasito (Yoshida e cols., 2000). Outras proteínas, como cruzipaina e gp90, também estão envolvidas no processo de invasão de células utilizado por ambas as formas. As moléculas Tc85 presentes na superfície do *T. cruzi*, ao se ligarem a receptores específicos na membrana das células hospedeiras, promovem alterações do citoesqueleto e facilitam a entrada do parasito (Magdesian e cols., 2001). Diversos tipos de carboidratos também podem estar envolvidos no processo de adesão e invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi*, lipopeptidofosfoglicana (LPPG), sialoglicolipídios, lipídios sulfatados em epimastigotas e glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) em formas tripomastigotas, já foram descritos (Sarmiento, 2008).

A invasão do *T. cruzi* nas células ocorre com a formação do vacúolo parasitóforo (na célula hospedeira). A membrana do vacúolo é derivada de lisossomos e contém no seu interior, componentes ácidos líticos potencialmente destrutivos para o parasito. O parasito, então, sintetiza e secreta uma proteína formadora de poros transmembrânicos (Tc-Tox) (Santiliano e Almeida, 2012). Seguindo para a metaciclo genese, o *T. cruzi* então inicia o estabelecimento do

parasitismo. As formas tripomastigotas ao escaparem para a corrente sanguínea podem infectar outras células do hospedeiro.

No início da infecção são desencadeados eventos pela imunidade inata do hospedeiro. A ativação de macrófagos por diferentes citocinas é o principal mecanismo no controle da infecção por este parasito. A invasão do macrófago leva a secreção de interleucina 12 (IL-12) que ativa células NK (do inglês, *Natural Killer*) a produzirem interferon gama (IFN- $\gamma$ ) promovendo o macrófago a atividade tripanocida. O TNF $\alpha$  (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*) produzido pelo macrófago durante a infecção por *T. cruzi*, participa dessa interação de forma sinérgica tanto com IL-12 como com IFN- $\gamma$ . Em associação ao TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  induz a produção de óxido nítrico. IFN- $\gamma$  não é efetivo na fase aguda tardia da infecção, devido a produção aumentada de IL-10 e TGF- $\beta$ , as quais modulam a síntese de IL-12 (Marçaneiro, 2008).

As citocinas apresentam grande importância no curso da infecção da doença de Chagas. O padrão da infecção pelo *T. cruzi* é determinado pela larga extensão de citocinas produzidas em resposta ao parasito. O aumento dos níveis de citocinas inibe a replicação do parasito em macrófagos e parece influenciar no resultado da infecção (Sarmiento, 2008). Em cada fase da doença de Chagas, existe uma resposta imune específica. A infecção aguda causa uma intensa e diversificada ativação de linfócitos B, com hiperprodução de imunoglobulinas na presença de isotipo IgM e mais tarde como IgA e subclasses de IgG, ativam a via clássica do complemento, caracterizando uma resposta do tipo Th1 mais precoce e de maior amplitude, sendo que a evolução para a forma crônica caracteriza-se por uma perda na atividade Th1, com uma substituição para a atividade Th2 e ativação de células B (Kumar e Tarleton, 2001), a qual desenvolve uma resposta eficiente contra o agente infeccioso. A fim de estabelecer uma infecção crônica de sucesso, deve-se haver um equilíbrio entre a multiplicação do parasita nos tecidos do hospedeiro e o controle imunológico que irá manter o hospedeiro vivo. Nessa fase, há aumento de células T CD8<sup>+</sup> com uma proporção menor de células T CD4<sup>+</sup>, células B, células do plasma, macrófagos, eosinófilos e mastócitos. Predomínio de anticorpos com atividade protetora (IgG) perpetuam durante a fase crônica, em camundongos, essa atividade protetora está associada com anticorpos das subclasses IgG2a e IgG2b,

os quais são responsáveis pela manutenção de baixos níveis de parasitas circulantes (Virgilio e cols., 2014).

Diferentes tipos de patógenos encontram diversas barreiras à infecção do seu hospedeiro. Nos seres humanos, as superfícies de mucosas desenvolvem um microambiente diferente do interior do organismo e características imunológicas que os tornam únicos frente ao sistema imune sistêmico. Para o agente patogênico ter sucesso, deve desenvolver mecanismos que permitem a sobrevivência nesses microambientes. O patógeno ao fissurar o epitélio das mucosas deve superar detecção e eliminação por resposta imune inata e adaptativa epitelial. Esta resposta é mediada por tecido linfóide associado a mucosas (MALT), o qual é composto por populações de células imunes intra-epiteliais e sub-epiteliais e dos gânglios linfáticos locais. No adulto sadio o MALT contém 80% de todas as células imunes do corpo e constitui o maior sistema de órgão linfóide dos mamíferos. Respostas imunes inatas associada a MALT envolve o sistema do complemento, células fagocíticas e células NK. Os principais componentes do MALT são as células M, as quais capturam antígeno e os liberam para células apresentadoras; as células T auxiliares e citotóxicas que respondem as células infectadas por patógenos e os linfócitos B altamente diferenciados, existindo quase na totalidade como plasmócitos secretores de IgA. Outras formas de defesa são: barreiras mecânicas, como a integridade do epitélio, peristaltismo e movimentos ciliares; barreiras químicas (bile, lactoferrina, lisozimas, lactoperoxidase) e barreira biológica, como a flora bacteriana residente (Schust e cols., 2012; Fauci e Langford, 2014).

## **1.5 Manifestações Clínicas**

As manifestações clínicas associadas à DC são divididas em duas fases: aguda e crônica. Dois terços dos indivíduos que adquirirem a infecção jamais terão qualquer manifestação clínica. Somente 5% dos indivíduos com a infecção aguda apresentarão sintomas de doença febril, com dores generalizadas nas articulações e na musculatura, mal-estar, cefaléia e outros sintomas que podem ser confundidos com um resfriado. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia no sangue periférico, inicia-se com a entrada do *T. cruzi* no corpo humano e pode resultar em

lesões na pele (chagoma de inoculação) ou na conjuntiva ocular (sinal de Romaña). Após um período de incubação de 72h o parasito passa por ciclos de multiplicação na célula do hospedeiro há liberação de formas infectantes nos espaços intercelulares, de onde elas alcançam os vasos sanguíneos e circulam pelo corpo. Sintomas podem aparecer entre uma a duas semanas após a infecção inicial e podem durar de quatro a oito dias. Em cerca de 90% dos indivíduos infectados, as manifestações da doença aguda desaparecem espontaneamente. Mortes ocorrem ocasionalmente nessa fase (< 5 - 10% dos casos sintomáticos), principalmente em crianças, como um resultado de miocardite ou meningoencefalite grave, ou ambos (Teixeira, 2007; Rassi Jr. e cols., 2010).

Depois de três a seis meses, os indivíduos passam à forma indeterminada da infecção crônica, caracterizada pela ausência de sinais e sintomas, porém com evidências sorológicas e parasitológicas da infecção. Esses indivíduos permanecem como reservatório do parasito ao longo da vida; sendo usualmente identificados durante a admissão em emprego ou triagem de doadores de sangue (Andrade, 1999). Três ou mais décadas depois, um terço dos indivíduos infectados pode apresentar sintomas da doença de Chagas crônica (DCC). A grande maioria dos chagásicos crônicos (95,5%) terão manifestações da doença no coração (miocardite crônica) que, frequentemente, resulta em cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva e / ou arritmia, podendo levar a morte. Os 4,5% restantes, apresentarão uma forma digestiva, com sintomas decorrentes dos quadros de megacólon ou megaesôfago (Higuchi e cols., 2003; Teixeira, 2007). Eventualmente, poderá ocorrer a progressão direta da fase aguda para a crônica sintomática (5 - 10% dos casos) (Rassi Jr. e cols., 2010).

## **1.6 Tratamento**

Na época de sua descoberta, foram utilizados para tratamento da DC, o atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio, os quais se mostraram ineficazes (Croft, 1999; Coura e Castro, 2002; Sobrinho e cols., 2007). Entre as décadas de 1960 e 1970, foram introduzidos os nitroderivados na terapêutica: Benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazol

acetamida) (Rochagan® e Radanil®, Roche; LAFEPE Benznidazol®) e o Nifurtimox [4-(5-nitro-furilidenoamino-) tetrahydro-4-4-1, 4-tiazina-1-1- dióxido] (Lampit®, Bayer). Entretanto, o potencial benefício na eliminação do parasita com esses tratamentos é discutível e depende da fase da doença, da idade do paciente e de condições associadas. Desde a década de 1980, o Nifurtimox teve a sua comercialização interrompida, e o Benznidazol passou a ser o único medicamento preconizado (Rassi e cols., 2002; Dejour e cols., 2012). Na América Central o Nifurtimox é utilizado em casos de intolerância ao Benznidazol (Fiocruz, 2013).

O recomendado é que os casos agudos sejam tratados o mais rápido possível após confirmação do diagnóstico, pois nessa fase a droga (Benznidazol) tem se mostra eficaz na diminuição da parasitemia. Os casos de infecção congênita devem ser tratados como fase aguda, assim como as infecções acidentais. O tratamento também é indicado em caso de chagásico receptor ou doador de órgãos e em pacientes imunossuprimidos, sujeitos à reativação da infecção (MS, 2005; Oliveira e cols., 2008). Para a fase crônica, o tratamento não é indicado, pois a eficiência do Benznidazol não foi comprovada nessa fase (MS, 2005). Durante a fase crônica indeterminada, avalia-se o risco de infecções associadas e / ou imunossupressão, podendo considerar tratamento específico nesses casos (MS, 2005; Teixeira e cols., 2006). Ademais, há abundante informação sobre a toxicidade dos nitroderivados. Devido à sua comprovada mutagenicidade e oncogenicidade, são considerados poluidores do meio ambiente e ocasionam vários efeitos colaterais, como: cefaléia, anorexia, desconforto gástrico, dermatite e neuropatia periférica. Podem ocorrer ainda distúrbios visuais e mentais, convulsões e perda da libido (Silva, 2011; Sousa, 2012).

Na busca do tratamento ideal para a doença, diversos compostos e estratégias vem sendo testados. O Posaconazol foi registrado na União Européia, Austrália e Estados Unidos como um antifúngico sistêmico, sendo considerado, atualmente, o mais forte candidato para novos tratamentos específicos da DC (Molina e cols., 2000; Bezerra e cols., 2012). Além disso, destaca-se a realização do transplante cardíaco para tratamento da insuficiência cardíaca de etiologia chagásica (Rassi Jr. e cols., 2009; Dinardi e cols., 2012). Entretanto, este ainda não teve sua eficiência comprovada (Boas e cols., 2004).

Dessa forma, fica evidente a ausência de medicamentos efetivos para o tratamento da DC. Não existem drogas profiláticas nem vacinas para preveni-la. Por enquanto, a melhor estratégia para combater a DC é realizar o diagnóstico precoce dos pacientes e interromper as várias vias de transmissão do parasito.

## 1.7 Diagnóstico

Os exames laboratoriais indicados para o diagnóstico da doença de Chagas dependem da fase da doença em que o paciente se encontra e podem ser dividido em três categorias: parasitológicos, sorológicos e moleculares. A suspeita de DCA deve ser confirmada por diagnóstico laboratorial, o qual se baseia preferencialmente na detecção direta dos parasitos. Em contraste, o diagnóstico da DCC (formas sintomáticas ou indeterminadas) é geralmente baseado em testes sorológicos, uma vez que o baixo nível de parasitos circulantes se opõe à detecção microscópica (Dias e Macêdo, 2005; MS, 2013). As técnicas moleculares mostram-se bastante eficientes para ambas as fases da doença. A seguir, esses testes serão mais bem detalhados.

O exame parasitológico direto é considerado o “padrão ouro” para diagnóstico da DCA. Os testes mais utilizados são o exame a fresco, gota espessa e esfregaço. Quando houver presença de sintomas por mais de 30 dias, são recomendados métodos de concentração devido ao declínio da parasitemia (Strout, micro-hematócrito, QBC - do inglês *Quantitative Buff Coat*). Os métodos parasitológicos indiretos, como o xenodiagnóstico e a hemocultura, apresentam baixa sensibilidade e costumam ser empregados apenas na fase crônica da infecção, onde a pobreza de formas tripomastigotas no sangue periférico torna difícil a demonstração diretamente do líquido biológico (MS, 2013).

Para o diagnóstico sorológico são utilizados testes imunológicos que se apóiam em evidências indiretas da presença do parasito, deduzindo-se que o mesmo existe por detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*. A presença de anticorpos da classe IgM anti-*T. cruzi* no sangue indica doença aguda quando associada a fatores clínicos e epidemiológicos compatíveis; enquanto que na DCC, os indivíduos apresentam anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Tais testes não estão isentos de erros ou problemas de

interpretação (falsos positivos e falsos negativos) (Gadelha e cols., 2003). O exame positivo significa apenas evidência indireta da infecção, mediante identificação de um fator imune que reconhece antígenos do agente da DC. Em vista disso, procura-se considerar que o teste é positivo quando houver resultado concordante em dois exames sorológicos de princípios distintos que identificam anticorpos específicos anti-*T. cruzi*, sendo a Imunofluorescência Indireta (IFI), a Hemoaglutinação (HE) e o ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) os métodos recomendados (OMS, 2002; MS, 2010).

Testes sorológicos possuem alta sensibilidade, mas podem apresentar baixa especificidade, levando a um considerável número de diagnósticos inconclusivos. Quando testes sorológicos são persistentemente inconclusivos, algumas diretrizes recomendam o uso de testes moleculares (Brasil e cols., 2010). Emprega-se a reação de polimerização em cadeia (PCR) como diagnóstico laboratorial complementar. A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade quando respeitados os parâmetros de padronização e controle de qualidade dos reagentes utilizados. Os testes moleculares para diagnóstico da DC utilizam sequências aneladoras para amplificar o DNA mitocondrial (kDNA) ou o DNA nuclear (nDNA) do parasito em diferentes amostras biológicas (Russomando e cols., 1992; Valejo e cols., 1999). Amplamente utilizados em laboratórios de referência, os iniciadores 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. Os iniciadores mais utilizados para a amplificação de nDNA são TcZ1/TcZ2, descritos por Moser e cols. (1989). Estes iniciadores 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 (Hecht e cols., 2010). O uso da PCR para diagnóstico da infecção por *T. cruzi* é restrito e realizado por centros de pesquisa em caráter experimental, devido à ausência de protocolos definidos e procedimentos operacionais padronizados, assim como de kits comerciais para uso na rotina da vigilância. Dessa forma, atualmente, a PCR ainda não é considerada um método de diagnóstico isolado para confirmação ou descarte de casos de DC (MS, 2013).



As peculiaridades da PCR, particularmente sua alta especificidade, trouxeram novas implicações na interpretação dos resultados, uma vez que se passou a identificar muitos pacientes com sorologia não reagente ao *T. cruzi*, porém com diagnóstico molecular positivo (Duffy e cols., 2013; Hecht e cols., 2010) requerendo uma dose maior de cautela e mais investigações sobre o significado dos diagnósticos. A esse respeito, alguns grupos relataram resultados de PCR e de microscopia positivos para pacientes soronegativos (Wincker e cols., 1994; Salomone e cols., 2003). Andersson (2004) comprovou a precisão da PCR em seus experimentos: de 39 soros analisados, o ELISA conseguiu identificar 21 pacientes infectados, enquanto que a PCR detectou 33 casos positivos. Em uma revisão de procedimentos sorológicos em 16 bancos de sangue da América Latina, de 1997 a 2000, verificaram-se taxas de 0,7% a 3,7% de falso-negativos e 0,3% a 3,2% de falso-positivos (Berrizbeitia e cols., 2006). De fato, 100% de concordância entre múltiplos ensaios sorológicos é raramente alcançado. Os resultados discordantes podem surgir devido a problemas técnicos, ou como resultado da complexa interação parasito-hospedeiro na DC (Miyamoto e cols., 2007).

## **1.8 Vias de Transmissão**

### **1.8.1 Transmissão vetorial**

A rota primária de transmissão do *T. cruzi* está relacionada ao repasto sanguíneo de triatomíneos, hemípteros hematófagos popularmente conhecidos como barbeiros, os quais são os hospedeiros intermediários e os vetores do *T. cruzi* para os mamíferos. Tanto ninfas como adultos de ambos os sexos são hematófagos, pertencem à família *Ruduviidae* subfamília *Triatominae*. Embora mais de 130 espécies de triatomíneos tenham sido identificadas, apenas algumas são vetores competentes para *T. cruzi* (Galvão e cols., 2003; Gonçalves, 2012). A transmissão vetorial é considerada o mecanismo de transmissão de maior relevância epidemiológica. Os vetores e o agente etiológico estão largamente distribuídos desde o sul dos Estados Unidos da América até a Patagônia, porém a maioria dos

casos de infecção humana é registrada nos países da América Latina (OMS, 2008; Fiocruz, 2013).

Apesar das ações de controle do *Triatoma infestans*, espécie responsável pela maior parte da transmissão vetorial no passado, a transmissão por outros vetores não domiciliares tem sido palco de desequilíbrio ecológico resultante de grandes mudanças antropogênicas. Quatro outras espécies de triatomíneos têm especial importância na transmissão da infecção ao homem: *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* (Dias e Schofield, 1999). Gonçalves e cols. (2012) analisaram a distribuição geográfica de triatomíneos brasileiros, onde os *Panstrongylus geniculatus* e *Panstrongylus megistus* mostraram ampla gama ecológica; mas a maioria das espécies varia de acordo com os tipos de biomas: *Rhodnius pictipes* e *Rhodnius robustus* na Amazônia; *Rhodnius neglectus*, *Triatoma sordida* e *Triatoma costalimai* no Cerrado; *Rhodnius nasutus*, *Panstrongylus lutzi*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma melanocephala*, e *Triatoma petrocchiae* na Caatinga; *Triatomarubrovaria* nos pampas do sul; *Triatoma tibiamaculata* e *Triatoma vitticeps* na Mata Atlântica. Embora a maioria das ocorrências tenha sido registrada em áreas abertas (Cerrado e Caatinga), todas as condições ambientais no país são favoráveis para uma ou mais das espécies analisadas.

O controle de triatomíneos é a principal estratégia utilizada para prevenir a transmissão vetorial. A identificação de áreas com maior vulnerabilidade de ocorrência de DC transmitidas por vetores é essencial para prevenção, controle e vigilância (Vinhaes e cols., 2014).

### **1.8.2 Transmissão oral**

Esta via vem adquirindo importante papel na epidemiologia da tripanossomíase americana. Apesar de ser uma rota habitual de aquisição do *T. cruzi* pelos mamíferos silvestres insetívoros, os relatos em humanos costumavam ser pouco frequentes. No Brasil, a via oral como forma de transmissão é conhecida desde os anos de 1920, através de modelos experimentais. Em humanos, os primeiros casos foram relatados na década de 1960, no Rio Grande do Sul. Posteriormente, surtos

também foram detectados no Pará, na Paraíba, em Santa Catarina, na Bahia e no Ceará (Dias e Neto, 2011, Noya e cols., 2015).

Nos últimos anos, o número de surtos de DCA em decorrência da transmissão oral do *T. cruzi* vem aumentando. Dias (2006) relata dez episódios de contaminação humana pela ingestão do parasito, inclusive o surto ocorrido em Santa Catarina, em 2005, devido ao caldo de cana-de-açúcar contaminado. A aquisição da infecção pela via oral também tem sido observado persistentemente na região amazônica (Yasuda e Carvalho, 2012). Atualmente, esta região é responsável pela maior quantidade de casos de DCA em consequência do consumo de produtos naturais, principalmente de palmeiras como o Açáizeiro, Juçara e a Bacaba. Este modo de transmissão incentivou a pasteurização e o controle da exportação de suco não tratado e outros produtos para as diversas regiões do Brasil e para fora do país (Dias e cols., 2011, Ferreira, 2014).

A maioria dos casos de transmissão oral tem sido relatada no Brasil, porém também ocorrem em outros países. Surtos da transmissão oral do *T. cruzi* relacionados ao consumo de sucos de goiaba e frutas silvestres, contaminados com fezes de triatomíneos, já foram registrados na Guiana Francesa, Venezuela e Bolívia (Noya e cols., 2010a, b; Santalla e cols., 2011; Yasuda e Carvalho, 2012). Um caso de transmissão oral foi comprovado na Argentina devido a ingestão de carne de caça (Storino e Jörg, 1994). Também foram descritos casos suspeitos de transmissão alimentar da doença de Chagas a partir da ingestão de carnes de animais silvestres no Equador e na Colômbia (Amunárriz e cols., 1991; Rodriguez e cols., 1992). Na Colômbia há vários relatos por transmissão oral. Recentemente foram registrados 11 casos agudos da doença de Chagas em uma única família na área urbana de Aguachica em domicilio sem triatomíneos (Soto e cols., 2014). Na grande maioria dos casos estudados, tratam-se de episódios súbitos e inesperados (Chieffi e Neto, 2000; Carlier e cols., 2002; Dias e Macêdo, 2005).

A transmissão oral do *T. cruzi* ao homem foi registrada com linhagens TcI e TcII do parasito (Valente, 2005; Andrade e cols., 2006). Dias e cols. (2013) mostraram, em modelo experimental, que os animais infectados com TcII apresentaram níveis de parasitemia mais elevado que os animais infectados com TcI. Na transmissão oral do *T. cruzi*, usando como veículo alimentos e / ou bebidas,

o inóculo deve ser relativamente elevado e o alimento deve fornecer as condições necessárias para assegurar a viabilidade do parasito no trato gastrointestinal (Noya e cols., 2010c). A resistência do parasita à digestão ácido-proteásica, no nível gástrico, tem sido associada à presença de moléculas protetoras (mucin-like gp 35/50) em sua superfície (Schenkman e cols., 1993). Além disso, a infectividade da mucosa gástrica e intestinal, por diferentes cepas de *T. cruzi*, tem sido relacionada ao nível de expressão da molécula gp90, que regula inversamente a penetração do parasita nas células do hospedeiro (Cortez e cols., 2006).

### **1.8.3 Transmissão congênita**

A transmissão congênita (TC) foi descrita por Carlos Chagas em 1911, mas, somente em 1949, foi relatado o primeiro caso humano na Venezuela (Dao, 1949). Conforme o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas define-se como caso congênito as crianças nascidas de mães infectadas, com a confirmação do parasita no sangue do recém-nascido e/ou a detecção de anticorpos não maternos na criança após os seis ou sete meses de idade, desde que excluídos outros mecanismos de transmissão (Carlier e cols., 2002; MS, 2005). A TC pode ocorrer por via transplacentária (mais comum), pela geléia de Wharton, pelo líquido amniótico e através do contato do sangue materno com as mucosas do recém-nascido (intra-útero, durante ou após o parto) (Margotto, 2004).

A transmissão vertical através da placenta é uma importante rota para a propagação da doença de Chagas, mesmo em países não endêmicos (Sánchez e Ramírez, 2013). Mais de 14 mil casos de infecção por essa via são notificados anualmente na América Central e do Sul (Sánchez e Ramírez, 2013). No Uruguai, Argentina, Chile, Paraguai e Bolívia se observam taxas relativamente elevadas de transmissão congênita (Howard, 2014). Nessas regiões, as linhagens TcV e TcVI são as predominantes (Ostermayer, 2011). Em contrapartida, o TcII é habitualmente isolado no Brasil Central, onde a prevalência da transmissão congênita é, reconhecidamente, mais baixa que nos outros países do Cone Sul (Luquetti, 1986). Há relatos da infecção por transmissão congênita da DC na Europa, Ásia e Estados Unidos (Schmunis e Yadon, 2010).

Quanto mais cedo se dá a infecção aguda durante a gestação, maior é o risco de transmissão para o feto. Nos recém-nascidos (RNs) de mães com DCC, a incidência é de 0,5% a 3%, e de 71% nos RNs de mães com DCA (Bittencourt e cols., 1992). Ainda que a infecção ocorra após o terceiro mês de gestação, a placenta também se encontrará alterada na maioria dos casos (volumosa, edemaciada e com placas esbraquiçadas) (Carlier, 2005; Sánchez e Ramírez, 2013). As consequências para o feto variam desde prematuridade até abortamento. São normalmente descritos baixo peso, hepatomegalia, esplenomegalia, sinais neurológicos, icterícia, anemia, anasarca e síndrome do desconforto respiratório (Negrette e cols., 2005; Torrico e cols., 2005). Há raras descrições de baixo desenvolvimento neurológico com calcificação intracraniana (Pinto e cols., 2011). Por outro lado, uma série de casos observados na Argentina demonstrou que 64,8% das crianças não apresentavam sintomas clínicos (Freilij, 1995).

#### **1.8.4 Transmissão sexual**

O primeiro trabalho que levantou a possibilidade da transmissão do *T. cruzi* pela via sexual foi feito por Vianna (1911), quando observou que os testículos são afetados pelo parasito, descrevendo diversas alterações do tecido. Estudos histopatológicos de um menino de 18 meses de idade e de uma menina de quatro meses de idade, que sucumbiram à DCA, revelaram ninhos de 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 propiciar a transmissão do parasito. 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 e na uretra de animais infectados. De interesse, 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 (Carvalho e cols., 2009).

Alencar e cols. (1987) investigaram a possibilidade da transmissão da doença de Chagas pelo sêmen. Inicialmente foram inoculados camundongos com sêmen

proveniente de animais infectados. 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 infectividade. 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*.

Recentemente, Martin e cols. (2015) realizaram o acasalamento de camundongos fêmeas imunossuprimidas com machos infectados com o *T. cruzi*. A análise histológica dos tecidos dessas fêmeas detectou a presença do parasito em um animal, indicando a possibilidade de transmissão sexual da infecção. Dados produzidos em nosso laboratório comprovaram a transmissão sexual do *T. cruzi* em modelo murino. Camundongos BALB/c, machos e fêmeas, nas fases aguda ou crônica da infecção por *T. cruzi*, foram colocados para acasalar com camundongos saudáveis. Testes parasitológicos, sorológicos e moleculares demonstraram a infecção dos parceiros sexuais (Silva, 2013; Ribeiro, 2015), confirmando essa via de transmissão em modelo experimental.

### **1.8.5 Transmissão transfusional**

A possibilidade da DC ser transmitida por transfusão de sangue foi originalmente sugerida por Dias em 1945; porém só foi demonstrada em 1952 por Freitas e cols. com a publicação dos primeiros casos humanos da infecção pós-transfusional por *T. cruzi*. Esse tipo de transmissão foi evidenciado a partir do processo de industrialização do Brasil, na década de 1950, o que promoveu o êxodo rural. Na década de 1970, a alta prevalência de indivíduos chagásicos nos centros urbanos e a falta de programas de controle, fizeram que a transmissão transfusional do *T. cruzi* fosse responsável, por aproximadamente 20 mil novos casos da doença no Brasil (Schmunis, 1991).

A transfusão sanguínea é considerada a principal via de transmissão na zona urbana, onde residem 70% da população das Américas, e é a segunda via mais importante de transmissão do *T. cruzi*. É uma frequente rota de disseminação da DC

em países não endêmicos, tendo significativa ocorrência em países com substancial população de imigrantes da América Latina, como Estados Unidos, Espanha, França, Suíça e Canadá (Bonney e Engman, 2008; Castro, 2009; Isusi e cols., 2012). De interesse, a avaliação de doadores contaminados em bancos de sangue se faz no Brasil desde a década de 1980, devido às metas estabelecidas pelos Países do Cone Sul (Silva e Luna, 2013). Porém muitos países ainda não contam com este controle, o que contribui para a ampla propagação da doença além das áreas endêmicas (Castro, 2009).

Merece destaque o fato de que o diagnóstico da tripanossomíase americana em bancos de sangue baseia-se exclusivamente em testes sorológicos para o reconhecimento de anticorpos anti- *T. cruzi*, como sugerido pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002). Dessa forma, muitos doadores podem estar sendo erroneamente diagnosticados como negativos para essa infecção.

#### **1.8.6 Outras formas de transmissão**

Os primeiros relatos de ocorrência de transmissão da doença de Chagas por transplante de órgãos datam do início da década de 1980, especialmente através de transplante de rins (Chocair e cols., 1981). A presença do parasito já foi documentada em diversos órgãos transplantados (Chieffi e Neto, 2000; Dias e Macêdo, 2005). O diagnóstico da DC antes do transplante é extremamente importante, pois o coração é um reservatório para o *T. cruzi* em pessoas com a infecção crônica. No Brasil, Argentina, Colômbia, Chile, México, Uruguai, Peru e Equador, uma vigilância especial é realizada antes do transplante de órgãos sólidos. Em países não endêmicos, a inexperiência e a incapacidade de identificação da DC antes do transplante cardíaco, vêm contribuindo para surgimento de novos casos (Huprikar e cols., 2013; Kransdorf e cols., 2014).

A transmissão através do aleitamento materno (pelo leite, colostro e fissura mamária) foi demonstrada primariamente por Mazza em 1936. Outros relatos foram feitos por Lopes em 1983 e em 1988. A presença de *T. cruzi* em secreções lácteas humanas foi mostrada tanto na fase aguda quanto crônica da doença. Pela sua raridade, não se contra indica o aleitamento materno, desaconselha-se, por algum

tempo, a amamentação em mulheres na fase aguda ou em estado de reativação da doença. Na fase crônica, as mulheres que apresentem rachaduras ou sangramento nos mamilos e aréolas são desaconselhadas a amamentar (Dias e cols., 2011).

As transmissões acidentais têm ocorrido nas mais diversas situações, sejam em laboratórios de triatomíneos, sejam na captura do vetor em áreas endêmicas, em trabalhos com modelos experimentais e culturas, ou em aerossóis de materiais infectados (Dias e Neto, 2011). Também há relatos de infecção durante cirurgia a partir de pacientes agudos, deficiências de segurança no transporte de materiais contaminados, entre outros. Esses casos são decorrentes de desatenção, falta ou mal uso de equipamentos de proteção individual, instalações e equipamentos inadequados, iluminação deficiente ou falta de capacitação (Chieffi e Neto, 2000; Dias e Macêdo, 2005).



## II. JUSTIFICATIVA

Ainda não existem estudos que expliquem a discrepância entre o imunodiagnóstico e o diagnóstico molecular da doença de Chagas. Talvez, uma baixa carga parasitária seja insuficiente para estimular o sistema imune a produzir anticorpos específicos. Tal hipótese ganha força ao se verificar que pacientes tratados com drogas tripanocidas passam a apresentar testes imunológicos negativos, enquanto os resultados de PCR permanecem positivos (Duffy e cols., 2013; Muñoz e cols., 2013), com quantidades muito pequenas de parasitos. Um aspecto que pode ser determinante na carga parasitária é a via de infecção do hospedeiro. Por exemplo, acredita-se que a quantidade de parasitos transmitidos por via oral seja maior que a de outras, pois há um número significativo de indivíduos que apresentam os sintomas da fase aguda da doença de Chagas (Ramírez e cols., 2013). Em casos de transmissão congênita, pode-se imaginar que esteja ocorrendo uma tolerização aos antígenos parasitários e conseqüente ausência de produção de anticorpos, fenômeno que já foi demonstrado para outras infecções parasitárias (Rajasekariah e cols., 1989). Investigações complementares são necessárias para se determinar o papel de cada via de transmissão no estabelecimento da parasitemia e resposta imune do hospedeiro.

### **III. OBJETIVOS**

#### **1. Objetivo geral**

Considerando o conhecimento descrito, nosso estudo tem como objetivo principal avaliar se a via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* pode influenciar na determinação da carga parasitária e produção de anticorpos específicos em camundongos na fase crônica da doença.

#### **2. Objetivos específicos**

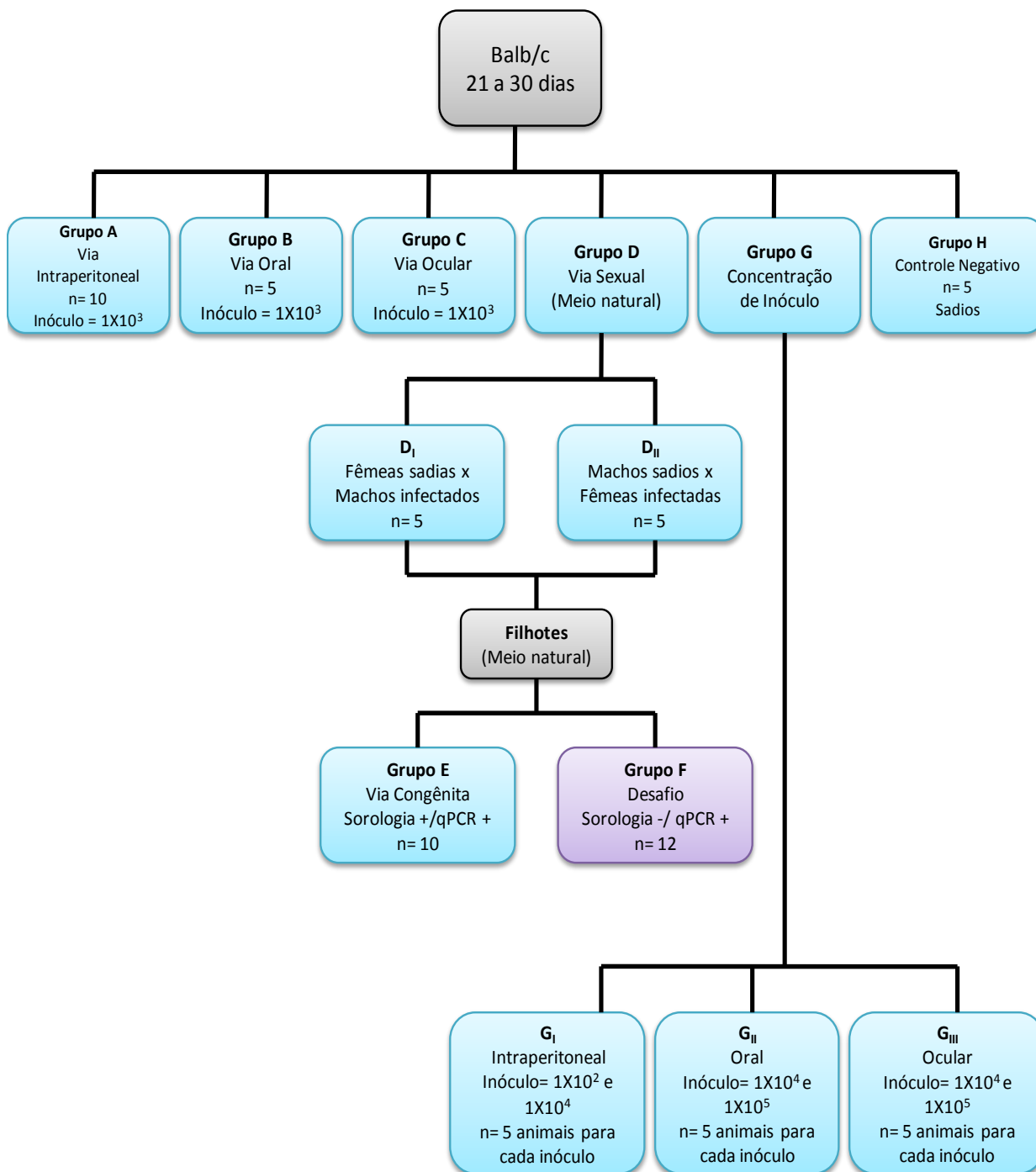
- Realizar PCR quantitativa (qPCR) para determinar a carga parasitária de animais infectados pelo *T. cruzi* através das vias intraperitoneal, oral, ocular, sexual e congênita;
- Verificar a produção de anticorpos específicos por ELISA e imunofluorescência indireta;
- Comparar a carga parasitária de cada grupo com o título de anticorpos anti- *T. cruzi* produzido;
- Determinar a carga parasitária necessária para estimular a produção de anticorpos específicos.
- Avaliar se a transmissão congênita do *T. cruzi* pode resultar em tolerização aos antígenos do parasito.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Amostragem

Neste estudo foram utilizados 87 camundongos da linhagem BALB/c, uniformes quanto ao peso, com idade entre 21 e 30 dias, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM – UnB). Os animais foram mantidos com iluminação (ciclo de 12h dia / 12h noite) e temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controladas e com livre acesso à ração e água. Inicialmente, todos os camundongos tiveram amostras de sangue colhidas para se confirmar a ausência de infecção, por teste a fresco e Elisa. A utilização dos animais desta pesquisa foi devidamente autorizada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – FM – UnB), com os números de protocolo 10411/2011 e 162765/2013.

Visando investigar o papel de cada via de transmissão do *T. cruzi* na carga parasitária e na produção de anticorpos específicos de cada animal, os camundongos foram divididos em grupos experimentais, conforme estabelecido na Figura 4.



**Figura 4. Fluxograma da divisão dos grupos experimentais.** n. Quantidade de animais utilizados. Inóculo. Quantidade de parasito inoculado em cada grupo.

Em cada grupo, os camundongos permaneciam juntos em gaiolas de polipropileno tipo kaefiq de medidas 49 x 34 x 16 cm, com exceção dos camundongos do grupo D (via sexual), onde os animais ficaram armazenados individualmente, em gaiolas de polipropileno, de medidas 30 x 20 x 13 cm. Para o acasalamento, foram colocados em dupla com seu respectivo parceiro até a confirmação da gestação, quando voltaram a ser individualizados.

## **2. Cultivo de *Trypanosoma cruzi***

Foram cultivadas formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Berenice em células musculares murinas da Linhagem L6, em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DME) Sigma-Aldrich®, pH 7,4 suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 5%, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de Estreptomicina, adicionado 3,7g de Bicarbonato de Sódio [7,5% p/v], sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C. O DME consiste numa modificação do Meio mínimo essencial de Eagle (MEM) que contém uma concentração mais elevada de vitaminas e aminoácidos, assim como, componentes suplementares adicionais. O número de parasitos no sobrenadante foi determinado por contagem em hemocitômetro (câmara de Neubauer); diluído em solução salina 0,9% e ajustado para inoculação.

## **3. Infecção dos animais**

Os animais foram inoculados com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas pelas vias intraperitoneal, oral, ocular e também no desafio. As infecções pelas vias sexual e congênita ocorreram de maneira natural e, portanto, não foi possível determinar a quantidade de parasitos recebida por cada animal (Figura 4).

Para a transmissão oral (grupo B), o inóculo foi depositado na entrada do esôfago de cinco camundongos. Outros cinco animais tiveram as formas tripomastigotas de *T. cruzi* depositadas em seus olhos, para avaliar a transmissão do parasito pela via ocular (grupo C). Para a transmissão sexual (grupo D), camundongos sadios foram cruzados com camundongos infectados intraperitonealmente com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas. Os casais do grupo D

geraram 22 filhotes. Após testes sorológicos e moleculares, 10 camundongos da progênie, os quais tiveram sorologia e PCR quantitativa (qPCR) positivas, foram incluídos no grupo via congênita (grupo E). Os camundongos da progênie (12/22) que tiveram sorologia negativa e qPCR positiva, foram desafiados (grupo F), sendo inoculados intraperitonealmente com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Ademais, um grupo extra foi incluído visando avaliar a quantidade de parasitos necessária para produção de anticorpos específicos. Dessa forma, criou-se o grupo “concentração de inóculo” (grupo G), onde os animais, divididos em grupos de cinco, foram inoculados pelas vias intraperitoneal, oral e ocular, com diferentes concentrações de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Figura 4).

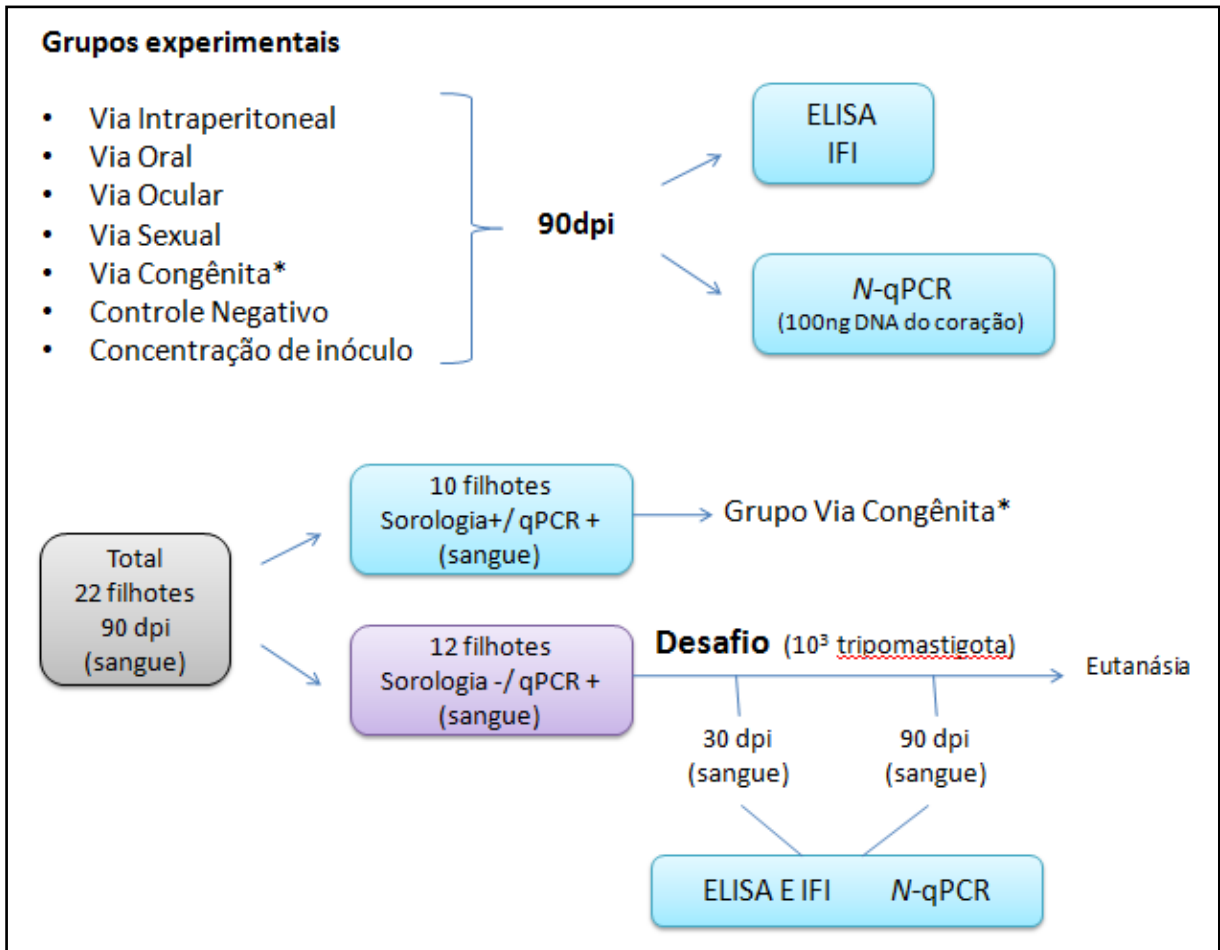
#### **4. Avaliação da Infecção**

Após as infecções, a taxa de parasitos no sangue dos animais foi analisada a cada sete dias, até o período de 30 dias pós-infecção (dpi). Foram realizadas pesquisas a fresco do *T. cruzi* para avaliar a positividade das infecções. Uma gota de sangue foi obtida pela secção da calda do camundongo e colocada em uma lâmina contendo 15 $\mu$ L de anticoagulante (citrato), homogeneizada com a ponta de uma lamínula e coberta pela mesma. Foi observada ao microscópio, em objetiva de 400X, à procura do parasito por toda extensão da lâmina (Brenner, 1962).

#### **5. Coleta de amostras**

Após 90 dias de infecção, amostras de sangue e do coração foram coletadas dos seguintes grupos: via intraperitoneal, oral, ocular, sexual, concentração de inóculo e controles. Os filhotes tiveram apenas amostras de sangue colhidas nesse mesmo período. Depois do diagnóstico, os filhotes com sorologia e qPCR positivos tiveram o coração coletado e formaram o grupo via congênita. Os filhotes com sorologia negativa e qPCR positiva foram então desafiados, e suas amostras de sangue foram obtidas após 30 e 90 dias. O sangue foi coletado por via intracardíaca para obtenção do soro e extração de DNA; e tecido cardíaco, apenas para obtenção de DNA (Figura 5). Para a coleta, os animais foram sedados com anestésico inalatório

Isoflurano (Forane®), seguido de eutanásia por deslocamento cervical e incisão ventral, para retirada do coração.



**Figura 5. Fluxograma da metodologia empregada no estudo.** Dpi: dias após infecção. +. Positivo. -. Negativo.

## 6. Imunodiagnóstico

Para verificar a existência de anticorpos anti-proteínas de *T. cruzi*, o soro dos camundongos foi obtido a partir da centrifugação de ~ 200  $\mu$ L de sangue total, colhidos sem anticoagulante e armazenados em glicerol (1:1) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dois testes imunológicos foram empregados: ELISA e Imunofluorescência indiretos.

## 6.1 Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (ELISA) Indireto

Formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Berenice foram sedimentados por centrifugação (4.000 x g por 15 min a 4°C), lavados três vezes com PBS pH 7,4 (*Phosphate Buffered Saline*, 137mM NaCl; 2,7mMKCl; 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) por igual período e, posteriormente, ressuspensos em 2 mL de água Milli-Q. Em seguida, os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento (-80°C) e descongelamento (37°C) e submetidos a centrifugação a 14.000 x g por 15 min. Ao fim desse processo, determinou-se a concentração protéica do antígeno por espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE *Healthcare Life Science*, UK).

Placas com 96 poços foram sensibilizadas com 50 µL/poço com antígenos não purificados de *T. cruzi* diluídos em Tampão PBS pH 7,4, de forma a conter 0,1 µg proteína/poço. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C em câmara úmida. Após esse processo, o excesso do antígeno foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS-*Tween* (PBS contendo 0,05% de Polissorbato 20). Para bloquear os sítios de adesão livres de proteínas, foram adicionados 100 µL/poço de PBS-Leite (PBS pH 7,4 contendo 5% leite desnatado). Em seguida, as placas foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente, e então, foram lavadas novamente com PBS-*Tween*. Ao término da lavagem, as placas foram imediatamente envolvidas em papel alumínio e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Com o intuito de detectar anticorpos específicos, os soros dos camundongos foram diluídos na proporção 1:50 em PBS 1X pH 7,4 com leite desnatado 2%, e adicionados à placa (50 µL/poço, em triplicata). Após incubação por 1h 30min a 37°C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS-*Tween*. Em cada placa, os soros controles, positivos e negativos, foram incluídos nas mesmas condições. Para controle dos reagentes, colocou-se apenas PBS/leite desnatado 2%. Após o processo de lavagem, os poços foram incubados com anticorpo secundário (previamente testado e titulado), o qual foi diluído em PBS/leite desnatado 2% e adicionado à placa (50 µL/poço). Após incubação por mais 1h 30min a 37°C, em câmara úmida, o excesso foi retirado e novamente as placas foram lavadas três vezes com PBS-*Tween*. A revelação dos imunocomplexos foi feita pela adição (50 µL/poço) de solução reveladora. Após o desenvolvimento da reação cromógena por 10 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, foi feita



leitura em espectrofotômetro (*BioTek®*, - *Synergy HT*) (Vexenat, 1996; Lauria-Pires, 2000). Para detectar a produção de imunoglobulina IgG, foi utilizado anticorpo Anti-Mouse IgG conjugado a enzima peroxidase diluído 1:5000 em PBS/leite desnatado 2%. A revelação ocorreu utilizando o cromógeno OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) (Sigma-Aldrich®) diluído em Tampão Citrato-fosfato, pH 5,0 (Ácido Cítrico, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), adicionado o substrato Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi lida a 490nm. Para imunoglobulina IgM, foi utilizado Anti-Mouse IgM marcado com fosfatase alcalina. Este foi diluído em 1:2000 em PBS/leite desnatado 2% e revelado com pnPP (p-nitrofenol fosfato) (Sigma-Aldrich®) em Tampão de Dietanolamina pH 9,8 (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>). A leitura feita a 405 nm.

Para determinação do ponto de corte das amostras, foi utilizado a fórmula  $[\bar{X} \text{ CN} + (3 \times \sigma)]$  (Nybo, 2010), onde  $\bar{X} \text{ CN}$  é a média dos controles negativos e  $\sigma$  o desvio padrão dos controles. Foram consideradas positivas as amostras com densidade óptica (DO) 10% maior que o ponto de corte e negativas aquelas com DOs 10% menor. Para obtenção da taxa de anticorpos, foi determinada uma curva padrão por regressão linear, utilizando as DOs dos controles. Assim, as DOs das amostras foram mensuradas através dessa curva, aonde foi considerado  $\leq 0,9$  não reagente;  $\geq 1,1$  reagente e entre 0,9–1,1 indeterminado. Todas as placas foram normalizadas para que pudéssemos comparar as densidades ópticas das diferentes placas. O fator de correção utilizado baseou-se nas DOs das amostras controles presentes em todas as placas.

## 6.2 Imunofluorescência Indireta (IFI) quantitativa

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 min a 4°C. O sedimento foi lavado (homogeneizado por inversão) três vezes com PBS 1X pH 7,4 por igual período e fixado em 2 mL de Solução de Paraformaldeído 3,7% (paraformaldeído; PBS 1X; NaOH 0,1M) durante 10min, seguido de centrifugação para retirada do paraformaldeído. Após novo período de lavagem, os parasitos formalizados foram ressuspensos em PBS pH 7,4, de maneira a obter uma concentração de aproximadamente 30 parasitos por campo. Essa quantidade de parasitos em

suspensão foi posta nas lâminas de microscopia demarcadas e desengorduradas. Depois de secas ao ar livre, as lâminas foram envolvidas em papel alumínio e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso (Vexenat, 1996; Pires, 2000).

Os soros dos camundongos foram diluídos e titulados de modo seriado (1:20 a 1:360) em PBS 1X pH 7,4. Em cada divisão da lâmina contendo os parasitos fixados foram colocados 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição. Após incubação por 40min a  $37^{\circ}\text{C}$  em câmara úmida, o excesso foi retirado e as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X pH 7,4. Em seguida às lavagens, as lâminas foram postas para secagem a temperatura ambiente. Então, adicionou-se o conjugado anti-imunoglobulina de camundongo (anti-*Mouse* IgG ou anti-*Mouse* IgM, ambos da Sigma-Aldrich®) ligado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído 1:200 (previamente titulado) em PBS 1X pH 7,4. Novamente, foi realizada uma incubação por 40min a  $37^{\circ}\text{C}$ , em câmara úmida. O excesso foi retirado e as lâminas lavadas três vezes com PBS 1X pH 7,4. Depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com lamínulas, sobre glicerina tamponada pH 9,0 (PBS 1X, Glicerina). 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 intensa no nível do flagelo, membrana, cinetoplasto e núcleo do parasito obtida em diluições do soro  $\geq 1:40$ .

## **7. Extração de DNA**

### **7.1. Extração de DNA total de *Trypanosoma cruzi***

Com o intuito de obter DNA total de *T. cruzi* para formação da curva padrão na qPCR, formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT, sedimentadas por centrifugação a 15.000 x g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , lavadas duas vezes com PBS 1X. O sedimento foi ressuspenso em tampão de lise (2M Tris-HCL pH 8,0; 0,5M EDTA pH 8,0; 20% SDS) na concentração de  $1 \times 10^8$  células/ml de solução, com adição de proteinase K (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas *overnight*. A partir daí, procedeu-se duas extrações de clorofane (fenol : clorofórmio : álcool isoamílico; proporção

25:24:1), seguida de uma extração de clorofil (clorofórmio : álcool isoamílico; proporção 24:1). A cada extração, a separação das fases orgânicas e aquosas foi feita por centrifugação a 5.000 x g por 15min, onde era retirado o sobrenadante e feita nova extração. O DNA foi precipitado com 3V de etanol 100% gelado e centrifugação a 16.000 x g, a 4°C, por 15 min. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado, secado ao ar livre (*overnight*) e, depois ressuspenso em tampão TE (1M Tris-HCl pH 8,0; 0,5M EDTA pH 8,0) adicionado RNase (200µg/mL) e incubado a 37°C, *overnight* (Sambrook e cols., 1989).

## 7.2 Extração de DNA do sangue de camundongo

Foram coletados 300 µL de sangue de cada animal por via intracardíaca. A extração foi realizada com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Às amostras, foram adicionadas 900 µL de *Cell Lyses Solution* (homogeneizado por inversão), incubado por 10 minutos à temperatura ambiente (invertendo o tubo algumas vezes) e centrifugado a 2.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com vórtex, adicionado 300 µL de *Nuclei Lyses Solution* e RNase (20 µg/mL), misturando o lisado por inversão e incubado à 37°C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 100 µl de *Protein Precipitation Solution*, homogeneizado em vórtex por 20 segundos e centrifugado a 2000 x g por 10 min. A precipitação do DNA se deu através da transferência do sobrenadante para tubo de microcentrífuga (*ependorf*) contendo 300 µl de isopropanol (misturando por inversão) e centrifugando a 2000 x g por 1 min. A lavagem do precipitado de DNA foi realizada com 300 µl de etanol 70 %, centrifugação a 2.000 x g por 1 minuto. O precipitado foi seco a temperatura ambiente, *overnight*, seguido de reidratação com 100 µl de TE, *overnight*, a 4°C.

## 7.3 Extração de DNA de tecido cardíaco de camundongo

As amostras de tecido cardíaco foram maceradas e incubadas *overnight* a 37°C com tampão de lise adicionado de proteinase K (100 µg/mL). Para cada 0,5g de tecido macerado, usou 5mL de tampão e 5µL de proteinase K/mL. O material foi então submetido ao processo de Sambrook e cols. (1989), descrito no item 7.1.

## **8. Quantificação, análise eletroforética do DNA e armazenamento**

Após o processo de extração, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue Plus®, (GE Healthcare Life Science, UK). A integridade do DNA foi testada pela reação de PCR específica para o gene constitutivo  $\beta$ -actina. Os amplicons foram separados através da corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% (Invitrogen®, USA) corado com brometo de etídeo 0,5 mg/mL, utilizando tampão TAE 1X (Tris acetato 90mM pH 8,0; EDTA 25mM). Por fim, para evitar repetidos descongelamentos, as amostras foram aliquotadas e armazenadas a -20°C. As alíquotas de uso rotineiro eram mantidas a 4°C.

## **9. Diagnóstico Molecular**

### **9.1. Reação de Polimerização em cadeia quantitativa (qPCR)**

Para quantificação absoluta da carga parasitária das amostras de sangue periférico e tecido cardíaco dos camundongos do estudo, foi adaptada a metodologia de *nested* qPCR descrita por (Freitas e cols., 2005), como será detalhada a seguir.

#### **9.1.1. Etapa de pré-amplificação**

Visando a quantificação do DNA nuclear (nDNA) do parasito no sangue e no coração dos animais, foi utilizada uma combinação da técnica de PCR convencional (cPCR) com a qPCR. Primeiramente, foi empregada a cPCR, utilizando os iniciadores TcZ1 (5'-CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT -3') e TcZ2 (5'CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC ACG-3'), os quais geram um produto de aproximadamente 188 pb (Moser e cols., 1989).

Para cada amostra, a reação de PCR continha 100ng de DNA genômico, tampão de reação da Invitrogen 1X (20 mM Tris-HClpH 8,4; 50mM KCl); 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1  $\mu$ M de cada iniciador; 0,2 mM dNTPs (Illustra®, GE, UK) e 2,5 unidades Taq DNA polimerase (Invitrogen), com um volume final de 25 $\mu$ L. Foram incluídos dois controles negativos, que consistiam no branco da reação (ausência de DNA) e em DNA de camundongo não infectado, além de dois controles positivos: 100 pg de

DNA de *T. cruzi* e 100 ng de DNA de camundongo infectado (testes sorológicos e molecular positivos). As reações foram realizadas no termociclador *MyCycler® Thermocycler* (BioRad Laboratoires, CA, USA), seguindo o seguinte programa:

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

Os produtos da pré-amplificação foram diluídos em 1:60 em água ultrapura (Milli-Q), e então, utilizados na qPCR.

### 9.1.2. *Nested* qPCR

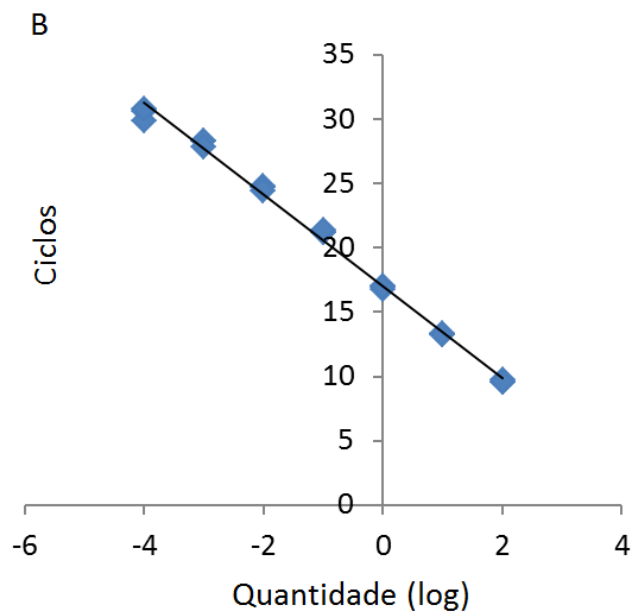
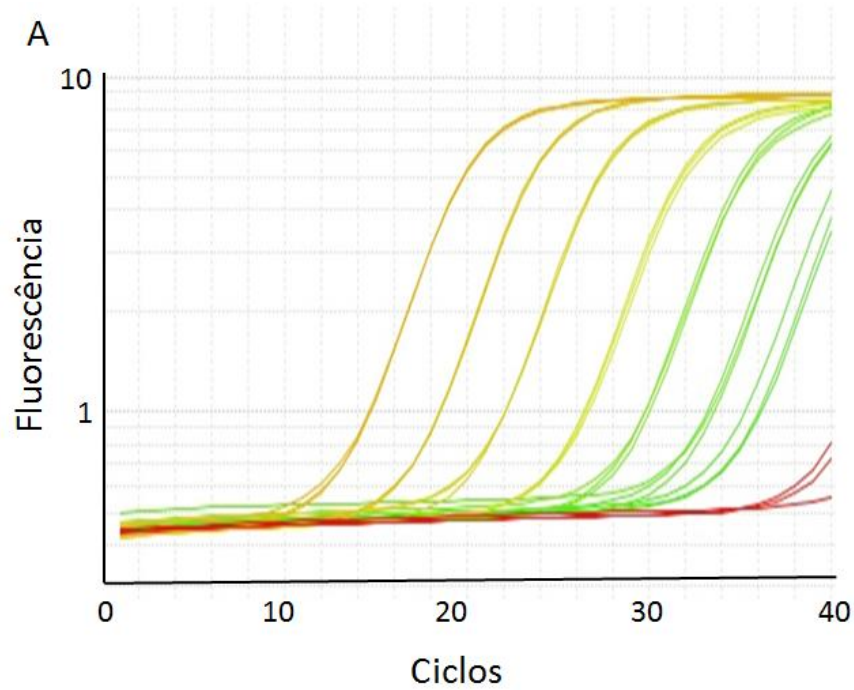
Após a etapa de pré-amplificação, foi feita uma *nested* qPCR (N-qPCR) com os iniciadores TcZ3 (5' TGC ACT CGG CTG ATC GTT T 3') e TcZ 4 (5' ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA 3'), gerando um produto de aproximadamente 168 pb (Ndao e cols., 2000). Como molde para a qPCR foi usado 2 µL do produto da cPCR diluído em 1:60 adicionando-se 0,2 µM de cada iniciador, 10 µL de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20µL. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (*Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®*), em triplicata, no termociclador *7500 Real-time PCR System* (Applied Biosystems, CA, USA), com as seguintes condições de amplificação:

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

Os resultados foram calculados pelo programa *StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems)* levando em conta o número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectada. Foi utilizado uma curva padrão para a quantificação absoluta das amostras.

### 9.1.3 Padronização da PCR em tempo real quantitativa (qPCR)

Depois de otimizadas as condições básicas da reação, gerou-se uma curva padrão a partir de diferentes concentrações de DNA de *T. cruzi*. Desta forma, diluições seriadas de DNA do parasito foram realizadas para obtenção das amostras contendo  $10^2$  a  $10^{-4}$  parasitos/mL. A Figura 6 demonstra a amplificação de DNA do *T. cruzi* para os sete pontos de diluição a partir da região linear de cada curva de amplificação (A). A curva padrão apresenta uma eficiência > 90%,  $R^2 > 0,99$  e *Slope* de -3,6 (B).



**Figura 6. Curva padrão gerada a partir de amplificação de diluições seriadas de DNA nuclear de *Trypanosoma cruzi*.** A) Curvas de amplificação do *T. cruzi* demonstrando amplificação nas sete diluições seriadas do DNA proveniente de  $10^2$  a  $10^{-4}$  parasitos/mL B) Curva padrão gerada a partir da região linear de cada curva de amplificação, sendo os losangos azuis os pontos da gama.

A concentração inicial de uma amostra é determinada a partir da curva padrão gerada pela relação dos valores de Cq (*quantification cycle*) e do logaritmo (log) do número de cópia inicial (os quais são inversamente proporcionais). A curva padrão foi salva e usada para a quantificação de todas as reações de qPCR através da utilização da equação reduzida da reta ( $y = ax+b$ , onde y é o Cq da amostra; x é a quantidade do produto amplificado a ser calculada; a é o coeficiente angular da reta e b é o coeficiente linear).

## **10. Análise estatística**

Os dados apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre os grupos experimentais nos testes de Elisa e qPCR, foi adotada a *Análise de Variância – ANOVA One-Way*, seguido de teste complementar de *Tukey*, para comparação múltipla entre os pares de médias. Os dados foram considerados significativos quando o intervalo de confiança foi de 95% ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado o *software GraphPad Prism*® versão 6, para obtenção de todos os dados.



## V. RESULTADOS

### 1. Diagnóstico parasitológico

A confirmação da aquisição do *T. cruzi* pelos camundongos dos diversos grupos experimentais foi inicialmente realizada por exame a fresco do sangue periférico dos animais. Essa análise confirmou a presença de formas tripomastigotas na circulação de todos os camundongos inoculados pela via intraperitoneal (grupo A) com cargas de ao menos  $10^3$  parasitos. Já para a via oral (grupo B), a identificação do parasito em todos os animais só foi possível quando se inoculou cargas parasitárias mais altas. Ainda assim, um período maior ( $\geq 21$  dias) foi requerido para que os exames se tornassem positivos, nos camundongos deste grupo. Resultados similares foram observados para os animais infectados pela via ocular (grupo C).

Os camundongos do grupo D (via sexual), tanto machos quanto fêmeas, só foram avaliados após confirmada a gestação em todas as fêmeas (intrapertoneais e sexuais), sendo positivo apenas dois dos dez animais (20%; um macho e uma fêmea) que adquiriram o parasito por essa via. Os grupos E e F (via congênita e desafio) não tiveram parasitemia realizada. Os resultados do exame a fresco estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Positividade do teste a fresco de camundongos infectados por diferentes vias de transmissão e no desafio.

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>7 dpi</b>	<b>14 dpi</b>	<b>21 dpi</b>	<b>28 dpi</b>
<b>Via Intraperitoneal 10<sup>2</sup></b>	0%	0%	0%	0%
<b>Via Intraperitoneal 10<sup>3</sup></b>	100%	NR	NR	NR
<b>Via Intraperitoneal 10<sup>4</sup></b>	100%	NR	NR	NR
<b>Via Oral 10<sup>3</sup></b>	0%	20%	20%	20%
<b>Via Oral 10<sup>4</sup></b>	0%	60%	60%	100%
<b>Via Oral 10<sup>5</sup></b>	0%	60%	100%	100%
<b>Via Ocular 10<sup>3</sup></b>	0%	0%	0%	0%
<b>Via Ocular 10<sup>4</sup></b>	0%	40%	40%	100%
<b>Via Ocular 10<sup>5</sup></b>	0%	20%	80%	100%
<b>Via Sexual</b>	20% depois de confirmada gestação			
<b>Via Congênita</b>	NR	NR	NR	NR
<b>Desafio</b>	NR	NR	NR	NR

Dpi: dias após infecção

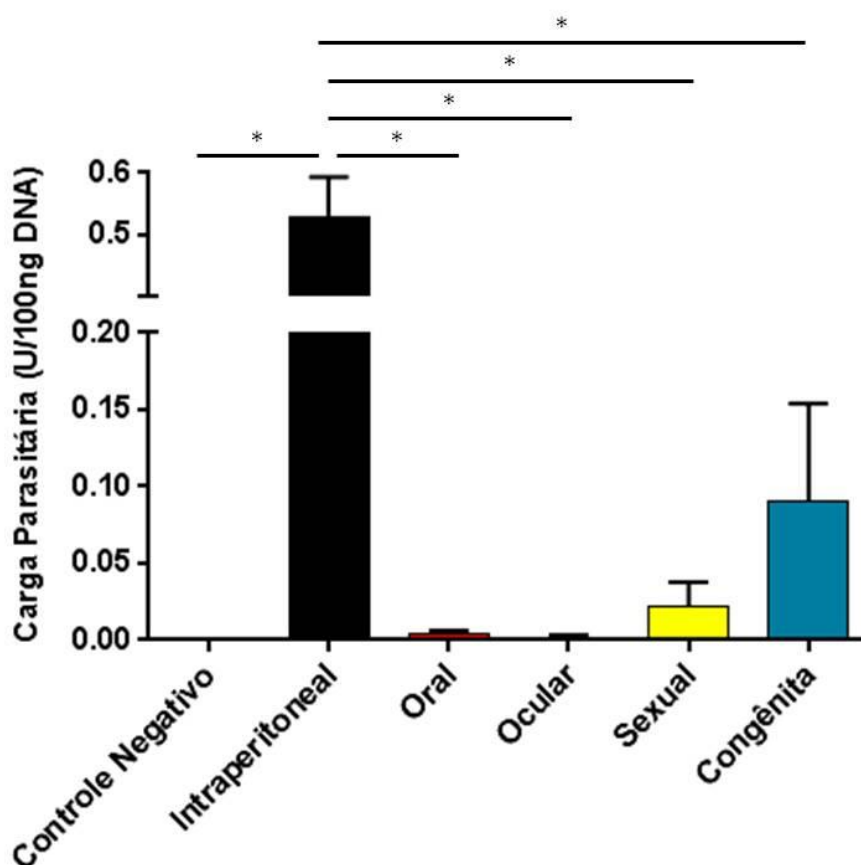
NR: Não realizado.

## 2. Diagnóstico Molecular

### 2.1. Quantificação da Carga Parasitária

Visando avaliar se a rota de transmissão do *T. cruzi* é fator determinante para o estabelecimento da carga parasitária em animais na fase crônica da infecção, realizamos a *nested* qPCR para amplificar o DNA extraído do coração dos camundongos 90 dpi. Os resultados revelaram a presença de *T. cruzi* em todos os camundongos infectados pela via intraperitoneal, oral, ocular, sexual e congênita. Os camundongos infectados intraperitonealmente tiveram carga parasitária ( $0,529 \pm 0,063$  U parasito/100ng DNA) significativamente maior que a dos demais grupos. Já a comparação entre os outros grupos não foi estatisticamente significativas, porém foi detectada a presença de parasitos, ao contrário do que ocorre com o controle negativo. Dessa forma, temos: na via ocular,  $0,002 \pm 0,001$  U parasito/100ng DNA;

via oral,  $0,005 \pm 0,002$  U parasito/100ng DNA; via sexual,  $0,021 \pm 0,016$  U parasito/100ng DNA; e via congênita com  $0,091 \pm 0,063$  U/100ng DNA, conforme apresentado na Figura 7.

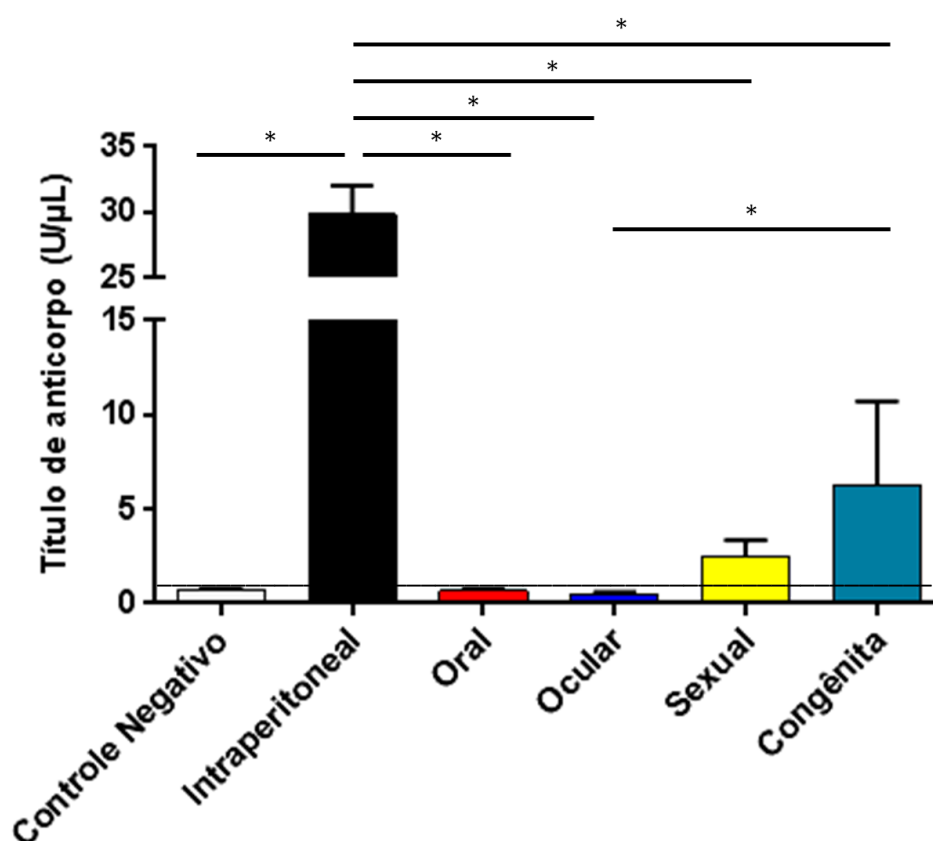


**Figura 7. Quantificação da carga parasitária do coração de camundongos infectados por diferentes vias.** Resultados da qPCR mostrando a quantidade de nDNA de *T. cruzi* no coração de camundongos infectados pelas vias intraperitoneal, oral, ocular, sexual e congênita (progêne com sorologia e qPCR positivas [n=10 filhotes]). A significância estatística entre os grupos está representada pelas barras ( $p < 0,05$ ).

### 3. Determinação da taxa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*

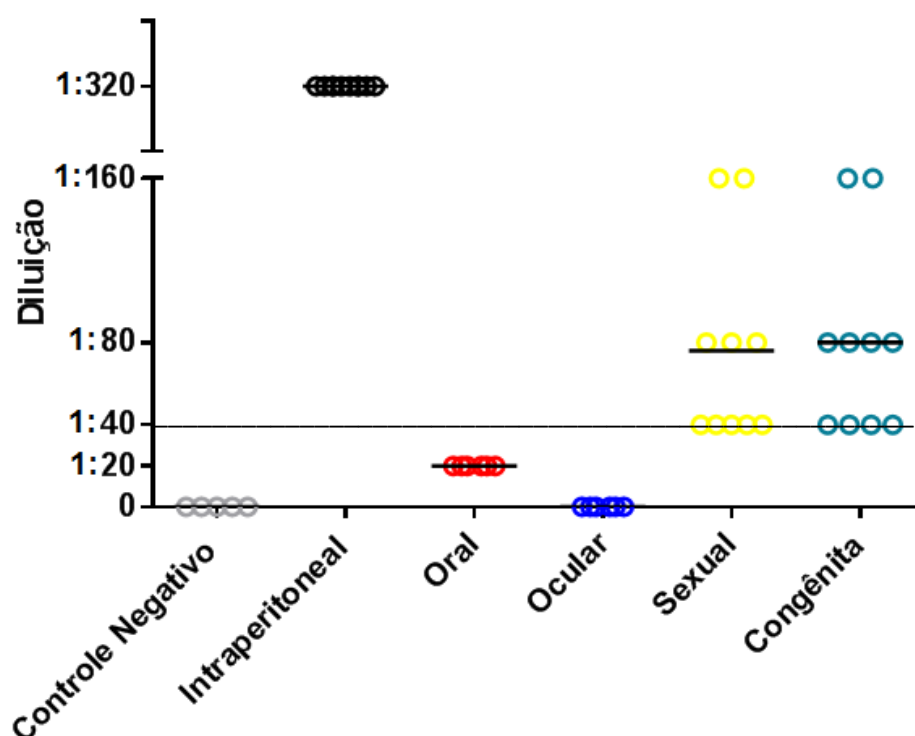
No intuito de determinar a produção de anticorpos específicos do isotipo IgG produzidos por camundongos infectados pelo *T. cruzi* por diferentes vias de infecção, utilizamos o teste ELISA nos camundongos dos grupos experimentais A, B,

C, D, E, H. Os resultados mostraram que os títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* estavam fortemente elevados nos camundongos que foram infectados pela via intraperitoneal, obtendo uma taxa de anticorpo de  $29,8 \pm 2,2$  U/ $\mu$ L; seguido dos animais que adquiriram a infecção pela via congênita [ $6,2 \pm 4,5$  U/ $\mu$ L ( $p < 0,05$ )], nos quais a produção foi significativamente menor. Nos animais infectados sexualmente, foi observado uma baixa produção de anticorpos específicos ( $2,4 \pm 0,9$  U/ $\mu$ L), não apresentando diferença significativa com os controles negativos ( $p > 0,05$ ), ainda que a produção de anticorpos estivesse pelo menos 10% acima do ponto de corte, condição que torna o teste reagente. As vias oral ( $0,7 \pm 0,1$  U/ $\mu$ L) e ocular ( $0,5 \pm 0,2$  U/ $\mu$ L) tiveram o teste de Elisa não reagente, como demonstrado na Figura 8.



**Figura 8. Avaliação da produção de anticorpos IgG específicos anti-*Trypanosoma cruzi* pelo método ELISA indireto.** Comparação dos títulos de anticorpos produzidos pelos animais dos diferentes grupos experimentais. Congênita: toda a prole do grupo sexual ( $n = 22$  filhotes). Foi considerado reagente a produção de anticorpos  $> 1,1$  (linha tracejada). A significância estatística entre os grupos está representada pelas barras ( $p < 0,05$ ).

Os dados do ELISA foram validados pelo teste de IFI. Os resultados obtidos na IFI demonstraram a presença de IgG anti-*T. cruzi* com o mesmo padrão do ELISA, sendo reagentes para todos os animais infectados pelas vias intraperitoneal, sexual e congênita e não reagente para todos os animais das vias oral e ocular. Os resultados do teste IFI estão demonstrados na Figura 9.

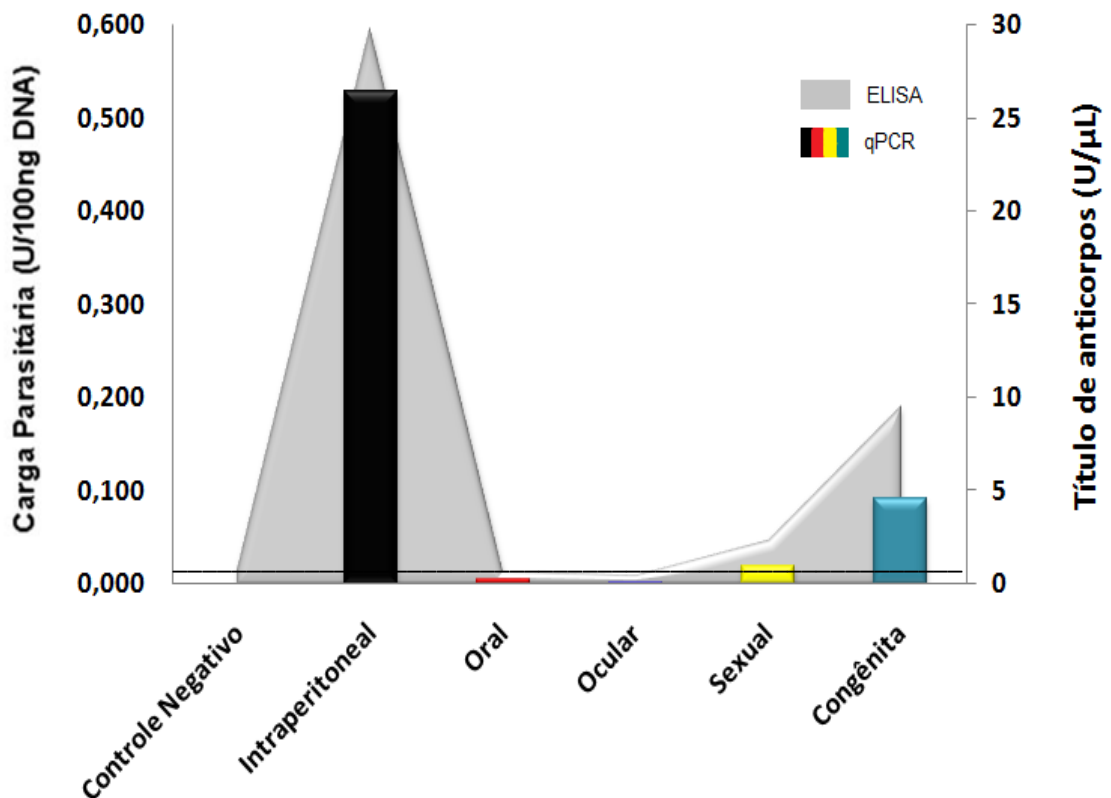


**Figura 9. Avaliação da produção de anticorpos IgG específicos anti-*Trypanosoma cruzi* detectados pela Imunofluorescência indireta.** Os círculos representam os camundongos de cada grupo experimental e, as barras horizontais, à média. Os animais foram considerados reagentes a partir da diluição de 1:40 (linha tracejada).

#### **4. Comparação do Título de Anticorpos com a Carga Parasitária presentes em camundongos infectados por diferentes vias**

A relação entre a via de transmissão do *T. cruzi*, a carga parasitária e a produção de anticorpos específicos está representada na Figura 10, onde se

compara a quantidade de parasitos presentes no tecido dos animais infectados pelas vias intraperitoneal, oral, ocular, sexual e congênita com a quantidade de anticorpos produzidos pelos mesmos animais. Na via intraperitoneal, nota-se que a alta carga parasitária está associada a uma significativa produção de anticorpos. As vias sexual e congênita mostraram baixa, porém relevante, carga parasitária, o que as tornou reagentes para a produção de anticorpos específicos. As vias oral e ocular apresentaram carga parasitária mínima e não obtiveram títulos de anticorpos reagentes. Conforme o esperado, o controle negativo não apresentou parasito no tecido, nem título de anticorpo IgG reigente.



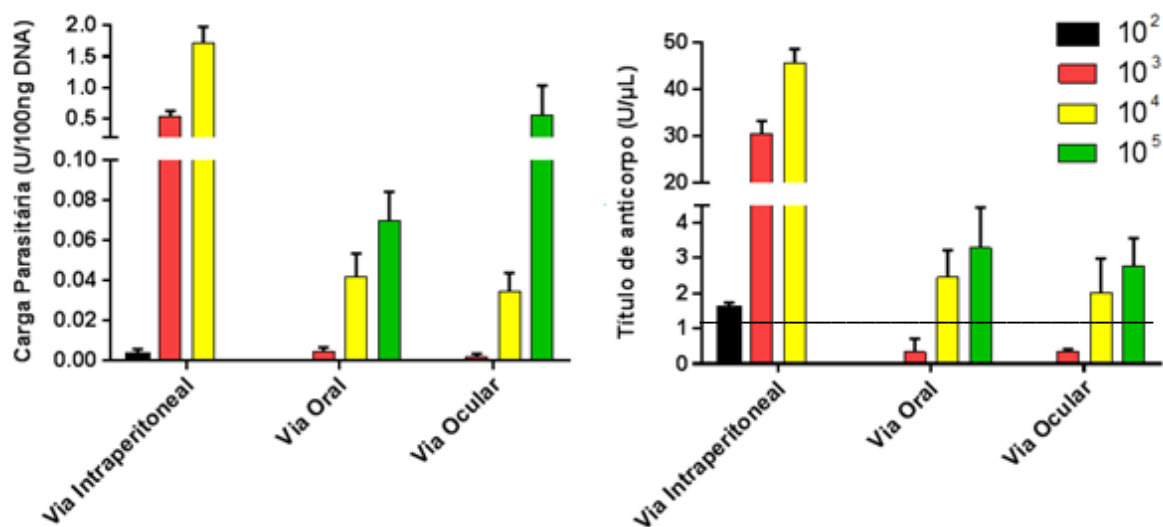
**Figura 10. Título de Anticorpos IgG e Carga Parasitária de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* por diferentes vias.** A produção de anticorpos foi considerada reigente quando > 1,1 (linha tracejada). Resultados da qPCR mostrando a presença de nDNA do *T. cruzi* no coração de camundongos infectados pelas vias intraperitoneal, oral, ocular, sexual e congênita (progênie com sorologia e qPCR positivos.)

## 5. Papel da carga parasitária inicial para a produção de anticorpos específicos

Diante da não identificação de IgG anti-*T. cruzi* nos camundongos dos grupos B e C (oral e ocular), foi decidido criar o grupo Concentração de inóculo (grupo G) para determinar a quantidade de parasitos necessária para estimular o sistema imune a produzir anticorpos específicos.

A figura 11 mostra a produção de anticorpos anti-proteínas de *T. cruzi* em comparação com a quantidade de parasitos em camundongos infectados intraperitonealmente com  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^4$  formas tripomastigotas, por via ocular e oral com  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$ . A infecção por via intraperitoneal resultou em camundongos positivos para os testes de ELISA e qPCR, mesmo com um inóculo pequeno ( $10^2$  parasitos). Nota-se uma relação diretamente proporcional entre as duas variáveis: quanto maior a carga parasitária produzida pelo inóculo, maior a produção de anticorpos específicos.

Para as vias de transmissão oral e ocular (grupos B e C, respectivamente) a inoculação de  $10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* não resultou em positividade no teste ELISA (produção de anticorpos  $< 0,9$ ). Em ambos os casos, obteve-se positividade nesse teste a partir do inóculo de  $10^4$  parasitos (produção de anticorpos  $> 1,1$ ). Da mesma forma que o intraperitoneal, a carga parasitária parece ser proporcional à produção de anticorpos anti-*T. cruzi* do isotipo IgG.



**Figura 11. Papel da concentração do inóculo inicial para determinação da carga parasitária e título de anticorpos de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* por diferentes vias.**

A) Resultados da qPCR mostrando a presença de nDNA do *T. cruzi* no coração de camundongos infectados com diferentes concentrações de inóculo pelas vias intraperitoneal, oral, ocular. B) Taxas de anticorpos estabelecidas pelo teste ELISA. A produção de anticorpos foi considerada reagente quando  $> 1,1$  (linha tracejada).

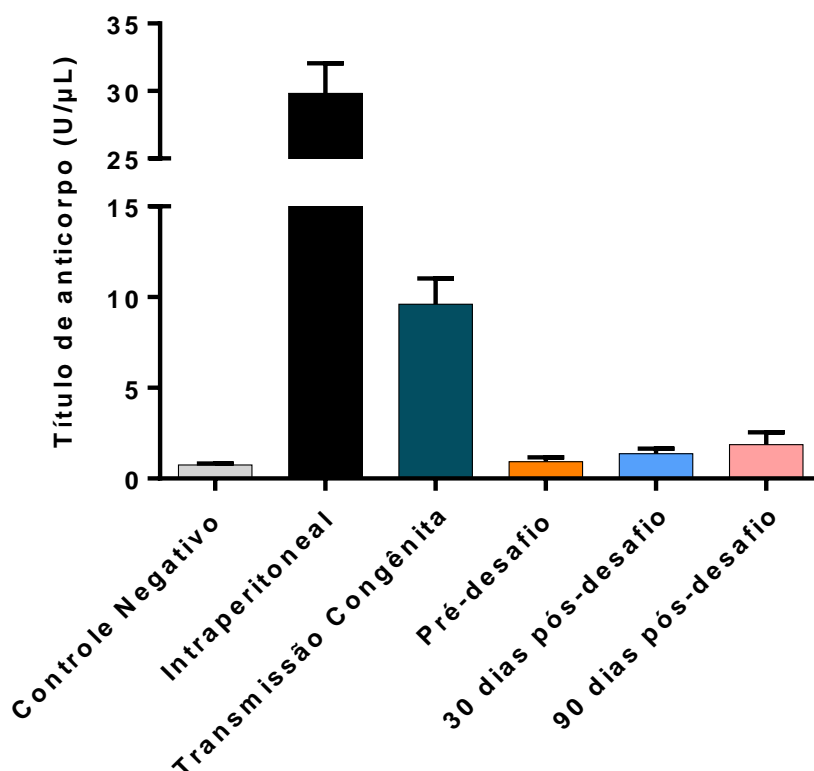
## 6. Teste de Tolerização

Devido ao fato de 12 dos 22 (54,5%) camundongos que adquiriram a infecção pela via transplacentária (qPCR positiva) não apresentarem anticorpos específicos (IgG) anti-*T. cruzi* 90 dias após o nascimento, estes animais receberam um inóculo de  $10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* para se avaliar a possibilidade de tolerização aos antígenos parasitários. Trinta dias após o desafio, três animais (25%) passaram a apresentar IgM positivo nos testes de ELISA e IFI. Após 90 dias, cinco animais (41,6%) mostraram soroconversão para IgG (Tabela 2), porém com baixos títulos de anticorpos (Figura 12). De interesse, os animais que não produziram anticorpos, mesmo após o desafio, apresentaram uma carga parasitária elevada em relação aos soropositivos, como mostra a Figura 13.

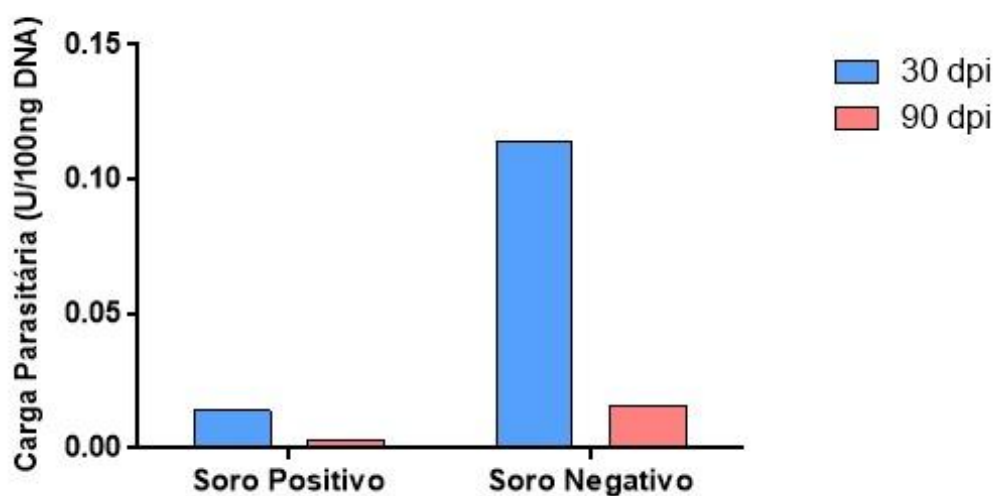


**Tabela 2.** Positividade no diagnóstico sorológico e molecular de camundongos dos grupos via congênita e desafio.

	Transmissão	Desafio	
	Congênita	30 dpi	90 dpi
ELISA	45,4 % (10/22)	25% (3/12)	41,6% (5/12)
N-qPCR	100%	100%	100%



**Figura 12.** Avaliação da tolerização a antígenos do *Trypanosoma cruzi*. Títulos de anticorpos do grupo F pré desafio e pós-desafio (30 e 90 dias), dos animais que tiveram soro conversão. Intraperitoneal: controle positivo. Transmissão congênita: progêne com sorologia e qPCR positivos. Taxa de anticorpos determinada por ELISA.



**Figura 13. Carga parasitária dos filhotes desafiados.** Determinou-se a quantidade de parasitos de cada grupo por *nested* qPCR. Soropositivo: filhotes que passaram a apresentar sorologia positiva após o desafio. Soronegativo: filhotes que permaneceram com sorologia negativa após o desafio. 30 dpi: 30 dias após a infecção. 90 dpi: 90 dias após a infecção.

## VI. DISCUSSÃO

### 1. Influência da via de transmissão e concentração do inóculo inicial na carga parasitária da DC crônica

A infecção de hospedeiros vertebrados pelo *T. cruzi* se inicia quando o parasito alcança lesões na superfície da pele ou mucosas, resultando, então, em uma infecção sistêmica. No presente estudo, avaliou-se a interferência das diferentes vias de transmissão do *T. cruzi* e da quantidade de formas tripomastigotas do inóculo inicial no estabelecimento da carga parasitária na fase crônica da DC.

Nossos dados revelaram que a inoculação de  $10^3$  formas tripomastigotas pela via intraperitoneal resulta em elevada concentração de parasitos no tecido cardíaco dos camundongos, diferindo significativamente da carga parasitária detectada no coração de camundongos infectados com a mesma quantidade de parasitos, porém pelas vias oral e ocular. Igualmente, Dias e cols. (2013) verificaram que a infecção intraperitoneal gera uma maior carga parasitária quando comparada com a infecção oral. Bahia e cols. (2002) mostraram que os níveis de parasitemia foram significativamente influenciados pelas condições de inoculação, tendo sido mais altos nos animais inoculados pela via intraperitoneal em comparação com a conjuntival. De interesse, mesmo com o aumento da quantidade de parasitos do inóculo inicial, a carga parasitária presente nos animais infectados pelas vias oral e ocular continuou bem inferior à da via intraperitoneal (Figura 11).

Tais resultados podem ser explicados pelas barreiras de proteção (imunidade inata e adquirida) presentes nas mucosas dos organismos. Os tecidos linfóides associados às superfícies mucosas do trato gastrointestinal, das vias respiratórias e do trato urogenital possuem um microambiente antigênico diferente ao do interior do organismo, com características imunológicas que os tornam únicos frente ao sistema imune sistêmico (Zarzur e Kudsk, 2001). A integridade do epitélio, o peristaltismo, os movimentos ciliares e o fluxo contínuo de substâncias reduzem a interação

patógeno-hospedeiro (Hooper e Gordon, 2001). Além disso, a presença de proteínas e peptídeos com propriedades antimicrobianas (peroxidases, lactoferrinas, lisoenzimas, etc) nas secreções (Zarzaur e Kudsk, 2001), torna o ambiente das mucosas bastante hostil aos parasitos. É provável que uma grande quantidade de parasitos tenha sido destruída pelos mecanismos de resposta imune das mucosas gastrointestinal e conjuntival. Ademais, sabe-se que as formas tripomastigotas sanguíneas, as quais foram utilizadas em nosso estudo, são mais sensíveis às barreiras das mucosas que as tripomastigotas metacíclicas (Hoft e cols., 1996). Ainda assim, Giddinhs e cols. (2006) viram que infecção conjuntival com tripomastigotas metacíclicas foram 50 vezes menor do que nos controles.

Ainda que não saibamos a quantidade inicial de parasitos inoculados pelas vias congênita e sexual, raciocínio similar deve ser empregado. Para a transmissão por via sexual, o estabelecimento da infecção deve se assemelhar ao que ocorre para as vias oral e ocular, o que nos leva a acreditar que a concentração de parasitos inoculados seja maior que  $10^3$ . A quantificação da carga parasitária no esperma e de secreções vaginais de camundongos chagásicos crônicos pode ajudar a elucidar essa questão. Já para a transmissão congênita, por sua fisiopatologia ser desconhecida, tem sido sugerido que o parasita atinge o feto através da corrente sanguínea por travessia da barreira placentária. Sabe-se que diferentes populações de *T. cruzi* têm diferentes capacidades de sobrevivência ao ambiente placentário (Fretes, 2012). No entanto, o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares da infecção transplacentária é escasso (Kemmerling e cols., 2010). O sincitiotrofoblasto forma uma superfície de cerca de  $12m^2$  em contato com o sangue materno. Portanto, no caso de mulheres com doença de Chagas, o parasito tem a possibilidade de interagir com uma grande superfície celular. No local de contato entre os tecidos fetal e materno há neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células masto, células T, células B, células NK que em conjunto, criam o microambiente local que sustenta a gravidez, porém um desequilíbrio entre essas células ou qualquer alteração inadequada nos seus fenótipos é considerado um mecanismo de doença na gravidez (Hernández e cols., 2015).

Duaso e cols. (2012) ao analisarem placentas de mulheres com DC assintomática, não verificaram infiltrado inflamatório. A ausência de inflamação pode

ser devido a uma baixa carga de parasitas no sangue e tecidos, característica de fases assintomáticas e crônicas da doença. Assim, outros fatores podem também determinar a capacidade do parasita para infectar a placenta ou, alternativamente, prejudicar a transmissão congênita. Liempi e cols. (2014) analisando o processo de infecção de tripomastigotas infecciosas “*in vitro*” mostraram que o sinciciotrofoblasto e o citotrofoblasto têm uma susceptibilidade diferencial a infecção pelo agente etiológico da doença de Chagas congênita. A redução da infecção no sinciciotrofoblasto foi associada a menor viabilidade dos parasitos na cultura e aumento de óxido nítrico, dessa forma, os autores mostram a placenta atuando como barreira para a transmissão do parasita. Por outro lado, as graves alterações placentárias em gestantes infectadas pelo *T. cruzi*, indica que o parasita induz reorganização dos componentes da matriz extracelular (MEC), de tal maneira que pode regular as respostas imunes e inflamatórias no hospedeiro. Se este for o caso, as alterações na MEC do tecido placentário, em conjunto com o estado imunológico de mãe para o feto, e a carga parasitária podem determinar a probabilidade de transmissão congênita do *T. cruzi* (Duaso e cols., 2012). Todos esses mecanismos corroboram com nossos resultados, onde vimos na transmissão congênita, cargas parasitárias mais elevadas quando comparadas as vias de mucosas, porém significativamente baixas quando comparadas a via intraperitoneal.

## **2. Influência da via de transmissão e concentração do inóculo na produção de anticorpos específicos anti-*Trypanosoma cruzi***

O *T. cruzi* mobiliza múltiplos mecanismos de respostas imune inata e adaptativa do organismo hospedeiro. A infecção é combatida por amplo repertório de células imunes que secretam citocinas e outras substâncias que reduzem a carga parasitária, bem como pela resposta imune mediada por anticorpos. Antígenos induzem resposta humoral IgM e IgG e ativação policlonal dos linfócitos B (Bryan e cols., 2010). De fato, a via de infecção do *T. cruzi* pode ter efeitos substanciais sobre a resposta imune produzida pelo hospedeiro (Collins e cols., 2011). Meis e cols. (2013) sugerem que a via de entrada do *T. cruzi* indicará se inicialmente o parasito ficará na circulação ou invadirá células, o que pode determinar se a resposta imune

será capaz de controlar a infecção. De acordo, sabe-se que a via de entrada de bactérias no hospedeiro é importante para a diferenciação de células T em células efectoras (Peper e cols., 2010; Paolo e cols., 2012).

Em nosso estudo, a passagem dos parasitos pela mucosa determinou o estabelecimento de uma carga parasitária menor, e esta, uma menor produção de anticorpos específicos. Ao compararmos a taxa de IgG com a quantidade de parasitos estabelecida por cada rota de transmissão (Figura 10), observa-se que, quanto maior a carga parasitária na DCC, maior a produção de anticorpos. Baixas cargas parasitárias parecem não ser suficientes para estimular o organismo a produzir as imunoglobulinas específicas. Os resultados também sugerem que cada via de infecção necessita de uma quantidade mínima de parasitos inoculados para produzir os anticorpos anti-*T. cruzi*. Ultrapassado esse limiar, os títulos de anticorpos parecem não aumentar na mesma proporção da carga parasitária (Figura 11).

A DC é uma patologia complexa, onde a resposta imune é dependente da quantidade do inóculo, da cepa do parasito, da interação com o hospedeiro e da via de infecção (Gutierrez e cols., 2009). Isso nos leva a acreditar que as manifestações patológicas da DC dependem da contribuição cumulativa de diversos mecanismos, os quais variam em função das características individuais dos hospedeiros.

### **3. Importância da via de transmissão para a evolução clínica da Doença de Chagas**

Por ser um fator importante para o estabelecimento da carga parasitária e produção de anticorpos específicos na DCC, a rota de aquisição do *T. cruzi* também influenciará a evolução das manifestações clínicas. Dias e cols. (2013) mostraram que, independentemente do DTU do *T. cruzi*, infecções através de gavagem (intragástrica) apresentam menor infectividade, parasitemia e mortalidade do que a infecção intraperitoneal. Albuquerque e cols. (2015) observaram que, apesar da infecção oral de camundongos ter induzido uma taxa infecciosa mais elevada que a de camundongos infectados por via gastrointestinal, o segundo resultou em miocardite mais grave. Corroborando com nossos resultados, Marsden (1967)

demonstrou que a infecção de camundongos com *T. cruzi* pelas vias sistêmicas (intraperitoneal, intravenosa e subcutânea) têm maiores taxas de infecção (67% a 100%) e mortalidade do que camundongos infectados pelas mucosas (oral, gastrointestinal, intra-retal, órgãos genitais, e conjuntival) (17 a 67%). Além disso, Caradonna e Pereiraperrin (2009) infectaram camundongos BALB/c e C57BL/6 com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, pelas vias subcutânea e intranasal, e encontraram maior mortalidade no grupo subcutâneo. Há grande presença de células do sistema fagocitário pelas vias sistêmicas. A cavidade peritoneal abriga uma variedade de células do sistema imune (linfócitos T, linfócitos B, células NK, granulócitos e fagócitos do sistema mononuclear), no sangue há cerca de 10% de leucócitos e grande quantidade de células dendríticas e macrófagos. Porém, essas células parecem não serem barreiras suficientes para o parasito, a alteração da matriz extracelular produzida pelo *T. cruzi* não só promove a sua motilidade nos tecidos e a sua entrada nas células, mas também altera a presença de citocinas e quimiocinas, que por sua vez permite o parasito a modular e evitar tanto as respostas inflamatórias e imunes (Duaso e cols., 2012), dessa forma, o *T. cruzi* teria maior facilidade de invadir novas células para multiplicação do mesmo, o que explicaria as vias sistêmicas apresentarem maior infectividade.

A inoculação do *T. cruzi* pela via ocular representa um processo natural de transmissão da DC que pode trazer sérias consequências ao hospedeiro, devido à proximidade do olho com o cérebro e à elevada irrigação arterial desse órgão (Dias, 2000; Giddings e cols., 2006). Bahia e cols. (2002) verificaram a influência das vias intraperitoneal e conjuntival no curso da infecção por *T. cruzi* em cães. Todos os animais tiveram alto nível de infectividade quando inoculados por tripomastigotas metacíclicas; contudo, quando infectados com tripomastigotas sanguíneos, as porcentagens de infectividade foram significativamente inferiores pela via ocular. Dessa forma, conclui-se que a fonte de inóculo e a via de inoculação influenciaram na evolução da DC no hospedeiro vertebrado.

Estudos de rotas alternativas para a infecção pelo *T. cruzi* são escassos, no entanto, há cada vez mais evidências da transmissão sexual do *T. cruzi*, a qual pode ser um agente em potencial de dispersão da DC no mundo. Chagas (1916a, b); Hartz e Toledano (1954) descreveram a presença de *T. cruzi* em órgãos genitais

masculinos durante os estudos de autópsias em pacientes chagásicos. Sabe-se que os órgãos urogenitais são regularmente parasitados em infecções experimentais (Tavares e cols., 1994; Lenzi e cols., 1996; Scorza e cols., 1996), porém não existem estudos que demonstrem o comprometimento funcional desses órgãos. Alguns trabalhos demonstraram que a instilação genital e inoculação escrotal, em ratos, são menos eficazes que a injeção intraperitoneal, na avaliação da infectividade por essas vias (Torrealba, 1970; Herrera e Morales, 1997), o que pode repercutir em manifestações clínicas menos acentuadas em animais infectados pela via sexual.

Sabe-se que a prevalência das rotas de transmissão do *T. cruzi* diferem de acordo com os ecossistemas, graus de urbanização e condições sócio-econômicas. Assim, estudos mais detalhados sobre a via de aquisição desse parasito nas diversas regiões de nosso país, poderão auxiliar na compreensão da evolução da doença de Chagas no Brasil e na consequente adoção de medidas terapêuticas mais apropriadas.

#### **4. Transmissão congênita do *Trypanosoma cruzi* e possível tolerização aos antígenos parasitários**

A transmissão congênita do *T. cruzi* resulta da complexa interação entre a resposta imune materna, fatores placentários e fatores associados ao parasito (Duaso e cols., 2012). Durante a gravidez, é necessária uma tolerância do sistema imune materno aos antígenos fetais, o que é ocasionado pelo desvio da resposta imune para o tipo 2, inibindo a resposta do tipo 1 (Kemmerling e cols., 2010). Essa alteração da resposta imune pode aumentar a susceptibilidade da puérpera às infecções por protozoários, com aumento de carga parasitária e, consequentemente, do risco de transmissão da infecção para a progênie.

Nossos resultados revelaram uma taxa de transmissão congênita de 45,4% (10/22) para a pesquisa de anticorpos específicos IgG, enquanto que a *Nested* qPCR detectou a presença do parasito em 100% da progênie, ou seja, 54,5% (12/22) dos filhotes do grupo D (via sexual) apresentaram testes imunológicos negativos, porém com resultados moleculares positivos. Tal discrepância entre os



resultados sorológicos e moleculares nos levou a investigar se o contato dos fetos com *T. cruzi* antes do desenvolvimento do sistema imune poderia torná-los imunologicamente tolerantes aos antígenos do parasito, o que resultaria em falsos negativos nos testes imunológicos. Para tanto, inoculamos os animais com sorologia negativa, por via intraperitoneal, com  $10^3$  formas tripomastigotas e avaliamos a responsividade imunológica. Dos 12 camundongos desafiados, apenas cinco sofreram soroconversão 90 dpi, sugerindo a ocorrência de tolerização aos antígenos do *T. cruzi* nos demais animais. O acompanhamento desses animais por um período maior (por exemplo, 180 dias) seria importante para reforçar a hipótese de tolerização.

A tolerância imunológica é um estado de não-reatividade dos linfócitos contra determinados antígenos, e é adquirida pela deleção clonal ou inativação dos linfócitos em desenvolvimento. Uma vez que foi estabelecida, a tolerância torna-se sistêmica. Sabe-se que fetos expostos a antígenos parasitários durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário tornam-se hiporresponsivos aos mesmos antígenos se desafiados após o nascimento, isto é, passam a reconhecer os antígenos parasitários como próprios (Malhotra e cols., 2009). Tal fenômeno já foi demonstrado em camundongos nascidos de mães infectadas com *Wuchereria bancrofti*, onde os filhotes mostraram-se tolerantes aos antígenos das microfilárias quando desafiados após o nascimento (Rajasekariah e cols., 1989). Igualmente, a prole de camundongos fêmeas infectadas com *Toxocara canis* tornou-se não responsiva aos ovos desse parasito quando a transmissão ocorreu nas fases iniciais da gestação (Oteifa e cols., 1996).

A esse respeito, diversos estudos têm demonstrado que testes sorológicos de alguns pacientes chagásicos são consistentemente negativos, ainda que os testes moleculares sejam capazes de identificar a infecção ativa (Duffy e cols., 2013; Hecht e cols., 2010). Silva (2013) analisou camundongos nascidos de fêmeas chagásicas, obtendo uma taxa de transmissão congênita de 58,5% por PCR e 14% por sorologia. Dessa forma, é possível que muitos desses camundongos também estivessem tolerizados aos antígenos do *T. cruzi*. Alarcón e cols. (2011) mostraram que fetos são capazes de gerar a sua própria resposta imunitária a antígenos transmitidos

pela mãe, o que induz a secreção de citocinas as quais atuam em sinergia com os anticorpos maternos, o que lhes confere um estado de proteção contra a infecção.

## **5. E como fica o diagnóstico para a doença de Chagas?**

Nossos resultados demonstraram grande discrepância entre o imunodiagnóstico (ELISA e IFI) e o diagnóstico molecular (*Nested* qPCR), a qual parece estar associada a uma baixa carga parasitária, insuficiente para estimular o sistema imune a produzir anticorpos anti-*T. cruzi*, e a uma possível tolerização aos antígenos parasitários. Tal constatação levanta uma importante questão sobre 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 baseados apenas em resultados sorológicos.

Atualmente, técnicas moleculares são consideradas auxiliares para o diagnóstico da DC em pacientes com sorologia inconclusiva. De fato, a utilização de métodos moleculares é uma boa alternativa para complementar ou estabelecer o diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi* (Gilber e cols., 2013). São testes tidos como mais específicos por permitirem a identificação mais precisa de agentes patogênicos. Já a sensibilidade sofre variações a depender das condições utilizadas na PCR (Ferrer e cols., 2013; Gilber e cols., 2013). Diferentes protocolos de PCR vêm sendo descritos com o objetivo de tornar o diagnóstico mais sensível, como a *Nested* PCR (Marcon e cols., 2002) e a qPCR (Freitas e cols., 2005, Pirón e cols., 2007).

No que se referem ao diagnóstico da DC congênita, os testes moleculares ainda estão sob avaliação da OMS, pois a presença do DNA do parasito no sangue do recém-nascido não indica, necessariamente, infecção ativa, uma vez que não prova que os parasitos são viáveis (Cevallos e Hernández, 2014). Carlier e Torrico (2003) defendem que não é recomendado que se considere apenas a sorologia para determinação de infecção congênita, uma vez que a IgG específica não permite discriminar anticorpos transmitidos pela mãe daqueles produzidos pelo feto; e a IgM específica não é positiva em todos os casos congênitos.

Dessa forma, seria bastante interessante o emprego da PCR como técnica confirmatória do diagnóstico da DC. Ainda que os dados acerca da baixa carga parasitária e da tolerância imunológica devam ser tratados com cautela, pois novos testes devem ser feitos para se confirmar essas hipóteses, o uso de testes moleculares poderia contribuir para a identificação de um número maior de casos de infecções pelo *T. cruzi* durante a triagem de neonatos e de doadores de sangue e órgãos.

## VII. CONCLUSÕES

- i. A via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* influencia na determinação da carga parasitária de camundongos na fase crônica da doença;
- ii. O perfil de produção de anticorpos varia em função das diferentes vias de transmissão do *T. cruzi* em camundongos e da quantidade de parasitos inoculados;
- iii. A *nested* qPCR padronizada por nós mostrou-se um diagnóstico molecular mais específico e sensível para quantificar o DNA do parasito;
- iv. O desafio de animais infectados pela via congênita (com sorologia negativa e *nested* qPCR positiva) demonstrou a possibilidade de tolerização aos antígenos parasitários.

## VIII. PERSPECTIVAS

- i. Verificar o padrão de citocinas produzidas de acordo com a via de infecção do *Trypanosoma cruzi*;
- ii. Avaliar a influência das vias de transmissão do *T. cruzi* sobre a autoimunidade e a evolução das manifestações clínicas da DC;
- iii. Determinar se diferentes tipos de cepas do *T. cruzi* podem alterar a produção de anticorpos específicos e carga parasitária dos animais infectados pelo *T. cruzi* pelas diferentes vias;
- iv. Verificar a influência das vias no curso da infecção utilizando formas tripomastigotas metacíclicas.
- v. Confirmar a tolerização aos antígenos parasitários em camundongos infectados pela via congênita, a partir do acompanhamento mais prolongado das proles.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, M.; GONCALVES, L.; COLASANTE, C.; ARAUJO, S.; MORENO, E.; AGUILAR, M. C. P. **Trypanosoma cruzi** infection in pregnant mice induces a cellular immune response with cytokines production in their fetuses. *Invest. Clin.*, v. 52, n. 02, p. 150-161, 2011.

ALBUQUERQUE, J. B.; DOSSANTOS, D. S.; PÉREZ, A. R.; BERBERT, L. R.; VLIET, E. D. S. V.; OLIVEIRA, D. A. F.; ET AL. **Trypanosoma cruzi** infection through the oral route promotes a severe infection in mice: new disease form from an old infection? *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 09, n. 06, 2015.

ALENCAR, A.; BRITO, C.; AZEVEDO, B. **Involvement of the male genital apparatus in Chagas' disease. Experimental study with albino mice (possibility of transmission of the disease through the semen).** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, p. 82: 59, 1987.

AMUNÁRRIZ, M.; CHICO, M. E.; GUDERIAN, R. H. **Chagas disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region.** *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 94, n. 03, p. 145-149, 1991.

ANDERSSON, J. **Molecular diagnosis of experimental Chagas disease.** *Trends Parasitol.*, v. 20, n. 02, p. 52-3, 2004.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES J. B. SOBRAL, K. S. C.; ROSADO, A. P.; OLIVEIRA, F. L. S. **Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi isoladas durante o surto agudo de doença de Chagas por transmissão oral, em Santa Catarina, Brasil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, p. 7, 2006.

ANDRADE, Z. A. **Immunopathology of Chagas disease.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 71-80, 1999.

BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CALIARI, M. V.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; COELHO, G. L. L. M.; DE LANA, M. **Comparison of Trypanosoma cruzi infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35, n. 04, p. 339-345, 2002.

BERRIZBEITIA, M.; NDAO, M.; BUBIS, J.; GOTTSCHALK, M.; ACHE, A.; LACOUTURE, S.; MEDINA, M.; WARD, B. J. **Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or**

**trypomastigote excreted-secreted antigens from two *Trypanosoma cruzi* strains.** *Transfus. Med.*, v. 16, p. 419–431, 2006.

BEZERRA, W. S.; DIONATAS, U. O. M.; LUIS, M. A. C. **A busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de Negligência.** *Saúde (Santa Maria)*, v. 38, n. 01, p. 920, 2012.

BITTENCOURT, A. L. **Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34, p. 403-408, 1992.

BOAS, F. V.; FEITOSA, G. S.; SOARES, M. B. P.; FILHO, J. A. P.; MOTA, A.; ALMEIDA, A. J. G.; CARVALHO, C.; CARVALHO, H. G.; OLIVEIRA, A. D.; SANTOS, R. R. **Transplante de células de medula óssea para o miocárdio.** *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 82, p. 181-184, 2004.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. **Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?** *Curr. Mol. Med.*, v. 8, n. 06, p. 510-518, 2008.

BRASIL, P. E. A. A.; CASTRO, L.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; SANGENIS, L. H. C.; BRAGA, J. U. **ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis.** *BMC Infect. Diseases.*, v.10, p.337, 2010.

BRENER Z. **Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*.** *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRISK. A. **Specific Humoral Immunity versus Polyclonal B Cell Activation in *Trypanosoma cruzi* Infection of Susceptible and Resistant Mice.** *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v .04, n. 07, p. 733, 2010.

CARBALLERO, Z. **Origem, evolução e relações filogenéticas de homólogos de prolina racemase em espécies de *Trypanosoma*.** 2014. 48 páginas. Tese de doutorado em Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

CARADONNA, K.; PEREIRAPERRIN, M. **Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*.** *Infect. Immun.*, v. 77, p. 1349–1356, 2009.

CARLIER, Y.; DIAS, J. C. P.; LUQUETTI, A. O.; HONTEBEYRIE, M.; TORRICO, F.; TRUYENS, C. **Trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas.** *Encicl. Med. Chirurgicale*, v. 8, p. 505-520, 2002.

CARLIER, Y. **Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, n. 02, p. 105-107, 2005.

CARLIER, Y.; TORRICO, F. **Congenital infection with *Trypanosoma cruzi* from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control: conclusions of round tables and synopsis of an International Colloquium.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, n. 06, p. 767-771, 2003.

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.*, v. 90, n. 01, p. 52-57, 2009.

CASTRO, E. **Chagas' disease: lessons from routine donation testing.** *Transfus. Med.*, v. 19, n. 01, p. 16-23. 2009.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) 2013. **Global health - Division of parasitic diseases and malaria** - Estados Unidos da América. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/gallery.html>> Acesso em: 06 de Abril de 2015.

CESTARI, I. S. ***Trypanosoma cruzi* e o sistema complemento: mecanismos de ativação e o papel do gene Crit (Complement C2 Inhibitor Trispanning) na resistência à lise em cepas de Classe I e II.** 2006. 113 páginas. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. **Chagas' Disease: pregnancy and congenital transmission.** *BioMed Res. Intern.*, v. 10, 2014.

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 01, n. 02, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. **Processos patojênicos da tripanozomíase americana.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.8, p. 5-35, 1916a.

CHAGAS, C. **Trypanosomíase americana. Forma aguda da moléstia.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 08, p. 37-65, 1916b.

CHIEFFI, P. P.; NETO, V. M. **Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*.** São Paulo: CLB Brasileiro Editores; 2000.

CHOCAIR, P. R.; SABBAGA, E.; NETO, V. A.; SHIROMA, M.; GÓES, G. M. **Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas.** *Rev. Inst. Med, Trop.*, v. 23, p. 280-292, 1981.



CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2 ed. São Paulo: editora Atheneu, p. 81-112, 2008.

COLLINS, M. H.; CRAFT, J. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. **Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8<sup>+</sup> T cell response and protection against heterotopic challenge**. *Infect. Immun.* v. 79, n. 08, p. 3397-3406, 2011.

CORTEZ, M.; SILVA, M. R.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; SASSO, G. R. S.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; YOSHIDA, N. ***Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 down regulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice**. *Microb. Infect.*, v. 8, p. 36-44, 2006.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 324, 2002.

CROFT, S. L. **Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 215-220, 1999.

DAO, L. L. **Otros casos de enfermedad de Chagas en el estado Guárico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre enfermedad de Chagas congênita**. *Rev. Policl. Caracas*, v. 17, p. 17-32, 1949.

DEJOUR, D. S.; BLANCHET, D.; AZNAR, C.; RUCHE, G.; JEANNEL, D.; ETCHEGORRY, M. G. **La maladie de Chagas (ou trypanosomose américaine) en France**. *Med. Malad. Infect.*, v. 42, n. 08, p. 344-348, 2012.

DEVERA, R.; ILLARRAMENDI, X.; ARAÚJO, R. M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. **Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais**. *Rev. Soc. Bras. Med.*, v. 35, p. 323-330, 2002.

DIAS, E. **Um ensaio de profilaxia da moléstia de Chagas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1945.

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

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A.; LUNA, E. J. A. **Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 44, n. 03, p. 375-379, 2011.

DIAS, J. C. P.; NETO, V. A.; **Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 44, s. 02, p. 68-72, 2011.

DIAS, J. C. P. **Epidemiologia.** Em: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 48 – 74, 2000.

DIAS, J. C. P.; MACÊDO, V. O. **Doença de Chagas.** Em: Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 555-593, 2005.

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

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*, v. 94, p. 103–121, 1999.

DIAS, S. M. S. **Estudo bio-molecular de três estoques mistos de *Trypanosoma cruzi/Leishmania* spp. isolados de pacientes chagásicos crônicos após terapêutica específica para a doença de Chagas.** 2006. 61 páginas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiânia.

DINARDI, L. F. L.; PALAZZO, J. F.; PEREIRA, T. V.; COELHO, A. Q.; ROSSENER, R.; SANTOS, M. M.; SANTOS JÚNIOR, V. P.; CANIZARES, B.; FIORELLI, A. I.; STOLF, N. A. G. **Transplante cardíaco na doença de Chagas.** *Rev. Med.*, v. 91, n. 04, p.: 229-240, 2012.

DUASO, J.; YANEZ, E.; CASTILLO, C.; GALANTI, N.; CABRERA, G.; CORRAL, G.; MAYA, J. D.; ZULANTAY, I.; APT, W.; KEMMERLING, U. **Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic Chagas disease: mechanism of parasite invasion or local placental defense?** *J. Trop. Med.*, 2012.

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.; RIASTE, A.; NASSER, J. R.; OCAMPO, S. B.; YADON, Z. E.; TORRICO, F.; NOYA, B. A. de; RIBEIRO, I.; SCHIJIMAN, 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.*, v. 07, n. 01, 2013.

FAUCI, A. S.; LANGFORD, C. A. **Reumatologia de Harrison.** 3 ed. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA (Direitos reservados), p.28-29, 2014.

FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; LEITE, P. C. **Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária.** *Vig. Sanit. Debate*, v. 02, n.04, p. 4-11, 2014.

FERRER, E; LARES, M; VIETTRI, M; MEDINA, M. **Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.** *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v. 31, n. 05, p. 277–282, 2013.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. **Mitochondria and Trypanosomatids: targets and drugs.** *Pharmac. Research*, v. 28, n. 11, p. 2758-70, 2011.

FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) 2013. **Doença de Chagas.** Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2015.

FREILIJ, H.; ALTCHED, J. **Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects.** *Clin. Infect. Dis.*, v. 21, n. 03, p. 551-555, 1995.

FREITAS, J. L. P. et al. **Moléstia de Chagas em bancos de sangue na capital de São Paulo.** *Hospital*, Rio de Janeiro, v. 41, p. 229-236, 1952.

FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. **Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues.** *Int. J. Parasitol.*, v. 35, n. 04, p. 411-417, 2005.

FRETES, R. E.; KEMMERLING, U. **Mechanism of *Trypanosoma cruzi* placenta invasion and infection: the use of human chorionic villi explants.** *J. Trop. Med.*, 2012.

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.*, v. 85, p. 165-170, 2003.

GALVÃO, C.; CARVALHO, R.; ROCHA, D. S.; JURBERG, J. **A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes.** *Zootaxa*, v. 202, p. 1–36, 2003.

GIDDING, O. K.; EICKHOFF, C. S.; SMITH, T. J.; BRYANT, L. A.; HOFT, D. F. **Anatomical Route of Invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection.** *Infect. Immunit.*, v. 74, n. 10, p. 5549-5560, 2006.

GILBER, S. R.; ALBAN, S. M.; GOBOR, L.; BESCROVAINE, J. O.; MYIAZAKI, M.I.; THOMAZ-SOCCOLS, V. **Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 46, n. 03, p. 310-315, 2013.

GILBER, S. R. **Reação em cadeia da polimerase em comparação com o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (enzima imuno ensaio) no diagnóstico para a doença de Chagas.** 2007. Dissertação de Mestrado em Processos biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná.

GONÇALVES, R. G.; GALVÃO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A. T. **Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil.** *J. Trop. Med.*, v. 705326, 15, 2012.

GUTIERREZ, F. R.; GUEDES, P. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. **The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease.** *Parasite. Immunol.*, v. 31, p. 673–685, 2009.

HARTZ, P. H.; TOLEDANO, D. **Specific orchitis in Chagas' disease.** *Doc. Med. Geog. Trop.*, v. 06, p. 124-130, 1954.

HECHT, M. M.; NITZ, N.; ARAÚJO, P. F.; SOUSA, A. O.; ROSA, A. C.; GOMES, D. A.; LEONARDECZ, E.; TEXEIRA, A. R. L. **Inheritance of DNA transferred from American Trypanosomes to human host.** *Plos One*. v. 05, n. 02, 2010.

HERNÁNDEZ, M.; RODRIGUEZ, P. T. S.; MIAL, T. N.; ROBERTSON, S. A.; LOPEZ, N. G. **Isolamento de Leucócitos a partir de tecidos de murino na interface materno-fetal.** *J. Vis. Exp.*, v. 99, 2015.

HERRERA, L.; MORALES, S. **Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela.** *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 39, p. 279-282, 1997.

HIGUCHI, M. L.; BENVENUTI, L. A.; MARTINS, R. M.; METZGER, M. **Pathophysiology of the heart in Chagas' diseases: current status and new developments.** *Cardiov. Res.*, v. 30, p. 96-107, 2003.

HOFT, D. F. **Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 55, p. 360-364, 1996.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. **Commensal host-bacterial relationships in the gut.** *Science*, v. 11, n. 292, p. 1115-1158, 2001.

HOWARD, E. J.; XIONG, X.; CARLIER, Y.; ESTANI, S. S.; BUEKENS, P. **Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis.** *BJOG*. v. 121, p. 22–33, 2014.

HUPRIKAR, S.; BOSSERMAN, E.; PATEL, G.; MOORE, A.; PINNEY, S.; ANYANWU, A.; NEOFYTOS, D.; KETTERER, D.; STRIKER, R.; SILVEIRA, F.; QVARNSTROM, Y.; STEURER, F.; HERWALDT, B.; MONTGOMERY, S. **Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011.** *Am. J. Transplant.*, v. 13, p. 2418-2425, 2013.

ISUSI, A. I.; MOYANO, M. J.; RUIZ, P. R.; MARTIN, V. P. **Imported Chagas disease: alarm in Europe... as it should be.** *Aten. Primaria*, v. 44, n. 02, p. 115-116, 2012.

KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. **Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: a proposal.** *Biol. Res.*, v. 43, n. 3, p. 307-16, 2010.

KRANSDORF, E. P.; ZAKOWSKI, P. C.; KOBASHIGAWA, J. A. **Chagas disease in solid organ and heart transplantation.** *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 27, n. 05, p. 418-424, 2014.

KROPF, S. P. **Carlos Chagas e os debates e controvérsias sobre a doença do Brasil (1909-1923).** *Hist., Cienc., Saúde – Manginhos*, v. 16, p.205-227, 2009.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. **Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice.** *J. Immunol.*, v. 166, p. 4596-4603, 2001.

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*, v. 71, p. 117-129, 1998.

LENZI, H.; OLIVEIRA, D.; LIMA, M.; GATTAS. ***Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection.** *Exp. Parasitol.*, v. 84, p. 16-27, 1996.

LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; DUASO, J.; DROGUETT, D.; SANDOVAL, A.; BARAHONA, K.; HERNÁNDEZ, A.; GALANTI, N.; MAYA, J. D.; KEMMERLING, U. ***Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: a potential local antiparasitic mechanism of the human placenta?** *Placenta*, v. 35, n. 12, p. 1035-1342, 2014.

LOPES, M. D. M. **Transmissão materno-infantil da Doença de Chagas.** 1983. Tese de Mestrado. Universidade de Brasília.

LOPES, M. D. M. **Transmissão do *Trypanosoma cruzi* em um caso, durante aleitamento, em área não endêmica.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, n. 03, p. 151-153, 1988.

LUQUETTI, A. O.; MILES, M. A.; RASSI, A.; DE REZENDE, J. M.; DE SOUZA, A. A.; POVOA, M. M.; ET AL. ***Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil.** *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, p. 462-470, 1986.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. **Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis.** *Expert Rev. Mol. Med.*, v. 04, p.1-16, 2002.

MAGDESIAN, M. H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R. I.; COLLI, W.; ALVES, M. J. **Infection by *Trypanosoma cruzi* Identification of a parasite ligand and its host cell receptor.** *J. Biol. Chem.*, v. 22, n. 276, p. 19382-19389, 2001.

MALLHOTRA, I.; DENT, A.; MUNGAI, P.; WAMACHI, A.; OUMA, J. H.; NARUM, D. L.; MUCHIRI, E.; TISCH, D. J.; KING, C. L. **Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya.** *PLoS Med.*, v. 06, n. 07, 2009.

MARÇANEIRO, L. O. F. **Expressão de imunoproteassoma em células infectadas com *Trypanosoma cruzi*.** 2008. 103 páginas. Tese de Doutorado em Biologia Molecular, Universidade de Brasília.

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

MARCILI, A. ***Trypanosoma cruzi*: diversidade, relações filogenéticas e padrões ecogeográficos de isolados silvestres.** 2008. 70 páginas. Tese de Doutorado em Ciências Médicas, Universidade de São Paulo.

MARGOTTO, P. R. **Assistência ao Recém-Nascido de Risco.** 2ed., 2004.

MARSDEN, P. D. ***Trypanosoma cruzi* infections.** Em CFI mice.II. Infections induced by different routes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 61, p. 62–67, 1967.

MARTIN, D. L.; LOWE, K. R.; MC NEILL, T.; THIELE, E. A.; ROELLIG, D. M.; ZAJDOWICZ, J.; HUNTER, S. A.; BRUBAKER, S. A. **Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice.** *Acta. Trop.* v. 14, n. 149, p. 15-18. 2015.

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

MEIS, J.; ALBUQUERQUE, J. B.; SANTOS, D. S.; OLIVEIRA, D. A. F.; BERBERT, L. R.; ET AL. ***Trypanosoma cruzi* entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in mice.** *Front. Immunol.*, v. 4, p. 1–7, 2013.

MELO, F.; R.; M. **Epidemiologia e distribuição espacial da mortalidade relacionada à doença de Chagas no Brasil, 1999 a 2007.** 2011. 259 páginas. Dissertação de Mestrado em Saúde Coletiva, Universidade Federal do Ceará.

MIYAMOTO, C. T.; GOMES, M. L.; MARAGON, A. V.; ARAÚJO, S. M.; LIBERATI, A. P. T.; CABRAL, R. F.; BAHIA, M. T.; LANA, M. L.; TOLEDO, M. J. **Reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos.** *RBAC.*, v. 39, n. 04, p. 275-278, 2007.

MOLINA, J.; FILHO, O. M.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J. A. **Activities of the triazole derivate SCH 56592 (Posaconazole) against drugresistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine host.** *Antim. Agents Chem.*, v. 44, p. 150-155, 2000.

MONCAYO A. **Carlos Chagas: biographical sketch.** *Acta Trop.*, v. 115, p.1-4, 2010.

MOSER, D. R.; COOK, G. A.; OCHS, D. E.; BAILEY, C. P.; MCKANE, M. R.; DONELSON, J. E. **Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction.** *Parasitology*, v. 99, p. 57–66, 1989.

MUÑOZ, C.; ZULANTAY, I.; APT, W.; ORTIZ, S.; SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; FERRADA, V.; HERRERA, C.; MARTÍNEZ, G.; SOLARI, A. **Evaluation of nifurtimox treatment of chronic chagas disease by means of several parasitological methods.** *Ant. Agent. Chem.*, v. 57, n. 09, p. 4518-4523, 2013.

MS (Ministério da Saúde) 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Consenso Brasileiro em Doença de Chagas – Brasil.** *Rev. Soc. Med. Trop.*, v. 38, p. 3-29.

MS (Ministério da Saúde) 2010. **Doenças infecciosas e parasitárias – Brasil.** Guia de bolso. Ed. 8, Brasília.

MS (Ministério da Saúde) 2013. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Informe técnico: recomendações sobre o Diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular para confirmação da doença de Chagas aguda e crônica – Brasil.** *Rev. Patol. Trop.*, v. 42, n. 04, p. 475-478.

NDAO, M.; KELLY, N.; NORMANDIN, D.; MACLEAN, J. D.; WHITEMAN, A.; KOKOSKIN, E.; AREVALO, I.; WARD, B. J. **Trypanosoma cruzi** infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries. *Comp. Med.*, v. 50, n. 06, p. 658-665, 2000.

NEGRETTE, O. S.; MORA, M. C.; BASOMBRIO, M. A. High prevalence of Congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*, v. 115, n. 06, p. 668-672, 2005.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Intern. J. Parasit.*, v. 32, p. 405–414, 2002.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: editora Atheneu, p. 85-108, 2005.

NOYA, B. A.; BELLO, Z. D.; COLMENARES, C.; GUEVARA, R. R.; MAURIELLO, L.; CALDERÓN, A. M.; NOYA, O. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 03, 2015.

NOYA, B. A.; BELLO, Z. D.; COLMENARES, C.; GUEVARA, R. R.; MAURIELLO, L.; JASPE, R. Z.; SUAREZ, 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. *J. Infect. Dis.*, v. 201, n. 09, p.1308-1315, 2010a.

NOYA, B. A.; BELLO, Z. D.; COLMENARES, C.; RUIZ, R.; NOYA, O. Enfermedad de Chagas de transmisión oral: vinculación del caso índice con una microepidemia urbana en Venezuela. *Bol. Mal. Sal. Amb.*, v. 60, p. 135-138, 2010b.

NOYA, B. A.; COLMENARES, C.; GUEVARA, R. R.; BELLO, Z. D.; NOYA, O. La transmisión oral em La enfermedad de Chagas. *Rev. Fac. Med.*, v. 33, n. 02, 2010c.

NYBO, K. Immunology and Immunochemistry: ELISA. *BioTechniques*, v. 49, n. 02, p. 555–556, 2010.

OLIVEIRA, M. F.; DIAS, A. T. N.; PONTES, V. M. O. JÚNIOR, A. S. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Pato. Trop.*, v. 37, n. 03, p. 209-228, 2008.



OMS (Organização Mundial de Saúde) 2002. **Control of Chagas disease. Second report of a WHO expert committee.** *Technical Report Series*, 905.

OMS (Organização Mundial de Saúde) 2007. **Report of the Scientific Working Group on Chagas disease. Buenos Aires, Geneva.** Disponível em <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR\\_SWG\\_09\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf)>. Acesso em: 15 de Abril de 2015.

OMS (Organização Mundial de Saúde) 2008. **Chagas disease: control and elimination.** Report of the Secretariat; EB124/17.

OMS (Organização Mundial de Saúde) 2013. **Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006–2010.** Disponível em: <[http://www.who.int/chagas/Global\\_distribution\\_Chagas\\_disease\\_2006\\_2010.pdf](http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf)>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2015.

OMS (Organização Mundial de Saúde) 2015. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 21 de Janeiro de 2015.

OPAS (Organização Pan Americana de Saúde); OMS (Organização Mundial de Saúde). 2010. **Estratégia e plano de ação para prevenção, controle e atenção à doença de Chagas.**

OPAS (Organização Pan Americana de Saúde); OMS (Organização Mundial de Saúde) 2014a. **General Information - Chagas Disease.** Disponível em <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5856%3A2011-informacion-general-enfermedad-chagas&catid=1232%3Achagas-content&](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856%3A2011-informacion-general-enfermedad-chagas&catid=1232%3Achagas-content&)>. Acesso em: 21 de Janeiro de 2015.

OPAS (Organização Pan Americana de Saúde); OMS (Organização Mundial de Saúde) 2014b. **World Health Day 2014: small bite, big threat 'Protect yourself and your environment from vector-borne diseases'.** Disponível em <<http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/04/Chagas-esp.pdf>>. Acesso em: 21 de Janeiro de 2015.

OSTERMAYER, A. L.; PASSOS, A. D. C.; SILVEIRA, A. C.; FERREIRA, A. W.; MACEDO, V.; PRATA, A. R. **O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008).** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 44, 2011.

OTEIFA, N. M.; MOUSTAFA, M. A.; EL-GOZAMY, B. R.; OTEIFA, N. M. **Experimental congenital toxocariasis: effect on foetal future immune response.** *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, v. 26, n. 03, p. 629-38, 1996.

PAOLO, R. W.; KAMDAR, K.; KHAKPOUR, S.; SUGIURA, Y.; WANG, W.; JABRI, B. **A specific role for TLR1 in protective T(H)17 immunity during mucosal infection.** *J. Exp. Med.*, v. 209, p. 1437–1444, 2012.

PEPPER, M.; LINEHAN, J. L.; PAGAN, A. J.; ZELL, T.; DILEEPAN, T.; CLEARY, P. P.; ET AL. **Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells.** *Nat. Immunol.*, v. 11, p. 83–89, 2010.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A.; VALENTE, V. C.; FIGUEIRAS, A. C. M. **Doença de Chagas congênita por infecção aguda maternal por *Trypanosoma cruzi* transmitida via oral.** *Rev. Pan-Amaz. Saúde*, v. 02, n. 01, 2011.

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 tem yearsafter treatment with anti-trypanosoma nitroderivatives.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 63, p. 111-118. 2000.

PIRÓN, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; CHEJADE, P. L.; PUIG, L.; VERGÉS, M.; GASCÓN, J.; PRAT, J. G. I.; PORTÚS, M.; SAULEDA, S. **Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples.** *Acta Tropica*, v. 103, n. 03, p. 195-200. 2007.

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.*, v. 78, n. 02, p. 292-298, 1989.

RAMÍREZ, J. D.; MONTILLA, M.; CUCUNUBÁ, Z. M.; FLORÉZ, A. C.; ZAMBRANO, P.; GUHL, F. **Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia.** *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 07, n. 02, p. 2041, 2013.

RASSI, A.; AMATO, N. V.; SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLI, F. F.; AMATO, V. S.; RASSI, G. G.; RASSI, JR. A. **Tratamento da fase crônica da doença de Chagas com nifurtimox associado a corticóide.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35, p. 547-550, 2002.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; NETO, J. A. M. **Chagas disease.** *Lancet*, 375: 1388–1402, 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; NETO, J. A. M. **Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 104, n. 1, p. 152-158, 2009.

RIBEIRO, M. A. **Transmissão sexual do *Trypanosoma cruzi* em camundongos chagásicos crônicos.** 2015. 105 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas, Universidade de Brasília.

RODRIGUEZ, B.; MAYA, B.; BLANCO, M.; NICHOLLS, S.; HERNÁNDEZ, C. A.; GUALDRÓN, L. E. **Estudio de un brote de carditis chagásica aguda en una población adulta.** *Acta Med.*, v. 17, p. 280, 1992.

RUSSOMANDO, G.; FIGUEIREDO, A.; ALMIRÓN, M.; SAKAMOTO, M.; MORITA, K. **Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum.** *J. Clin. Microb.*, v. 30, n. 11, p. 2864-2868, 1992.

SALOMONE, O. A.; BASQUEIRA, A. L.; SEMBAJ, A.; AGUERRI, A. M.; REYES, M. E.; OMELIANUK, M.; FERNADEZ, R. A.; ENDERS, J.; PALMA, A.; BARRAL, J. M.; MADOERY, R. J. ***Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 09, p. 1558–1562, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2ed. *Colsd Spring Harbor Lab. Press*, v. 01, 1989.

SÁNCHEZ, L. V.; RAMÍREZ, J. D. **Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects.** *Parasitology*. v. 140, n. 02, p. 147-159. 2013.

SANTALLA, J.; OPORTO, P.; ESPINOZA, E.; RÍOS, T.; BRUTUS, L. **Primer brote reportado de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia.** *BIOFARBO*, v. 19, p. 52-58, 2011.

SANTILIANO, F. C.; ALMEIDA, B. R. **Resposta imune e mecanismos de evasão desenvolvidos pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de chagas.** – *Encicl. Biosfera, Centro Científ. Conhecer*, v. 08, n. 14, p. 1625-1636, 2012.

SARMENTO, R. R. **Interação do *Trypanossoma cruzi* com células da resposta imune inata.** 2008. 73 páginas. Dissertação de Mestrado em Patologia Clínica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, N.; HEISE, M. L.; ALMEIDA, R. A. C.; MORTARA, R. A.; YOSHIDA, N. **Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosiylphosphatidy-linositol anchor the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*.** *Mol. Biochem. Parasit.*, v. 59, p. 293-304, 1993.

SCHMUNIS, G. A. ***Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries.** *Transfusion*, v. 31, n. 06, p. 547-557, 1991.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. **Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem.** *Acta Tropica*, v. 115, p. 14–21, 2010.

SCHUST, D. J.; QUAYLE, A. J.; AMEDEE, A. M. **Mucosal co-infections and HIV-1 transmission and pathogenesis.** *Curr. HIV Res.*, v. 10, n. 03, p. 195–201, 2012.

SCORZA, C. DE; HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. ***Trypanosoma cruzi*: histopathology in mice infected with strains isolated from *Didelphis marsupialis* from the valley of Caracas (Venezuela).** *Acta Cient.Venez.*, v.47, p. 244-247, 1996.

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

SILVA, C. F. **Atividade de amidinas aromáticas sobre *Trypanosoma Cruzi*: estudos in vitro e in vivo.** 2011. 119 páginas. Tese de Doutorado em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz.

SILVA, V. L. C.; LUNA, E. J. A. **Prevalência de infecção pelo *T. cruzi* em doadores de sangue nos hemocentros coordenadores do Brasil em 2007.** *Epidem. Serv. Saúde*, v. 22, n. 01, p. 103-110, 2013.

SILVEIRA, A. C. **Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas.** *Cad. Saúde Pública*, v. 16, p. 35-42, 2000.

SOBRINHO, J. L. S.; MEDEIROS, F. P. M.; ROCA, M. F.; SILVA, K. E. R.; LIMA, L. N. A.; NETO, P. J. R. **Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas.** *Rev. Pato. Trop.*, v. 36, n. 02, p.103-118, 2007.

SOUSA, A. O. **Transferência de DNA de *Trypanosoma cruzi* para retrotransposons line-1 de camundongos chagásicos tratados com nitroderivado benzonidazol.** 2012. 119 páginas. Tese de Doutorado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

SOTO, H.; TIBADUIZA, T.; MONTILLA, M.; TRIANA, O.; SUÁREZ, D. C.; TORRES, M. T.; ARIAS, M. T.; LUGO, L. **Investigación de vectores y reservorios en brote de Chagas agudo por posible transmisión oral en Aguachica, Cesar, Colombia.** *Cad. Saúde Pub.*, v. 30, n. 04, 2014.

STEVERDING, D. **The history of Chagas disease.** *Parasites & Vectors*, v. 07, p. 317, 2014.

STORINO, R. JORG, M. E. **Vías de infección y aspectos clínicos.** Em: *Enfermedad de Chagas*, Bayma, Buenos Aires, p. 132-141, 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. Paras.*, v. 33, n.03, p. 205-214. 1989.

TAVARES, M.; CARRARO, A.; FAVARETTO, A.; PETENUSCI, S.; LAMANO, C. T. **The male reproductive organs in experimental Chagas' disease.** *Exp. Tox. Pat.*, v. 46, p. 243-246, 1994.

TEIXEIRA, A. R. L. **Apresentações clínicas da doença de Chagas. Em: Doença de Chagas e evolução.** Brasília: Editora UnB, p. 79-88, 2007.

TEIXEIRA, A. R. L.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. **Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity.** *Clinic. Microb. Reviews*, v. 24, n. 03, p. 592-630, 2011.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. **Evolution and pathology in Chagas disease – a review.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 101, n. 05, p. 463-491, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L; ROTERS, F; MOTT, K. E. **Acute Chagas de disease.** *Gaz. Med.Bahia*, v. 70, p. 176-186, 1970.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; SOUZA, W. **Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease.** *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 06, n. 08, 2012.

TORREALBA, A. B. **Observaciones sobre el comportamiento en ratón blanco de una cepa humana de *Trypanosoma cruzi*.** Thesis, Universidad Central de Venezuela, Caracas, p. 56, 1970.

TORRICO, F.; ALONSO-VEJA, C.; SUAREZ, E.; RODRÍGUEZ, P.; TORRICO, M. C.; DRAMAIX, M. **Endemic level of congenital *Trypanosoma cruzi* infection in the areas of maternal residence and the development of congenital Chagas disease in Bolivia.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, p. 17-20, 2005.

VALENTE, S. A. S. **Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas.** Exposição na Mesa Redonda Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Florianópolis, 2005.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CHIARI, E., MACEDO, A. M. **Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA.** *Acta Tropica*, v. 72, p.203-212, 1999.

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*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, p. 177-185, 1996.

VIANNA, G. **Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 03, p. 276-294, 1911.

VILLALTA, F.; SMITH, C. M.; RUIZ-RUANO, A.; LIMA, M. F. **A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection**. *FEBS Lett.*, v.505, n.3, p.383-388, 2001.

VINHAES, M. C; DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas no Brasil**. *Cad. Saúde Pub*, v.16, p. 7-12, 2000.

VINHAES, M. C; OLIVEIRA, S. V; REIS, P. O; SOUSAB, A. C. L; SILVA, R. A; OBARA, M. T; BEZERRA, C. M; COSTA, V. M; ALVES, R. V; GURGEL-GONÇALVES, R. **Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis**. *Acta Tropica*, v. 137, p. 105–110, 2014.

VIRGILIO, F. S.; PONTES, C.; DOMINGUEZ, M. R.; ERSCHING, J.; RODRIGUES, M. M.; VASCONCELOS, J. R. **CD8<sup>+</sup> T Cell-Mediated immunity during *Trypanosoma cruzi* infection: a path for vaccine development?** *Mediat.Inflam.*, 2014.

WESTPHALEN, E. V. N.; BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L. **Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano**. *BEPA.*, v. 09, n. 105, p. 17-34, 2012.

WINCKER, P.; BOSSENO, M. F.; BRITTO, C.; YAKSIC, N.; CARDOSO, M. A.; MOREL, C. M.; BRENIERE, S. F. **High correlation between Chagas’ disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area**. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 124, p. 419–423, 1994.

YASUDA, M. A. S.; CARVALHO, N. B. **Oral transmission of Chagas disease**. *Emerg. Infect.Cid.*, v. 54, 2012.

YOSHIDA, N.; FAVORETO, Jr. S.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M. **Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells**. *Braz. J. Med. Biol.*, v.33, p.269–278, 2000.

ZARZAUR, B. L.; KUDSK, K. A. **The mucosa-associated lymphoid tissue structure, function, and derangements**. *SHOCK*, v. 15, n. 06, p. 411-420, 2001.

ZINGALES, B; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYREC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. G. e cols. **The revised *Trypanosoma cruzi***

**subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications.** *Inf. Gen. Evol.*, v. 12, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*, um ou múltiplos parasitas? *Rev. Biol.*, p. 44-48, 2011.