
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas
prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas
com benzonidazol**

Larissa Alves dos Reis Dias

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas
prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas
com benzonidazol**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Larissa Alves dos Reis Dias

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de
Albuquerque

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 27/06/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dias, Larissa Alves dos Reis

Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol. Ribeirão Preto, 2014.

151 folhas.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio de

1. Doença de Chagas.
2. qPCR.
3. Benzonidazol.
4. Imunofluorescência.

Á Deus pela força e coragem durante toda caminhada, minha mãe Maura, pelo incentivo diário e meu pai Domingos. Obrigada por acreditarem na minha capacidade e esforço. E também pela compreensão e apoio durante todo percurso.

Agradeço a Deus, pois sem Ele eu não teria forças para seguir nessa longa jornada.

À minha família, por acreditar e investir em mim. Mãe, agradeço pelo cuidado, dedicação e consolo tanto nas horas difíceis e quantos nas lágrimas derramadas. Você me deu coragem para chegar até o fim. Pai, agradeço pela presença e segurança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, por acreditar na minha competência, pela oportunidade dada, ensinamento e paciência. Obrigada por ser um exemplo do caminho a ser trilhado.

À Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP - USP, por permitir o uso do espectrofotômetro para quantificação de DNA das amostras utilizadas neste trabalho.

Ao seu pós-graduando Luiz Miguel Pereira, pelas sugestões e conselhos para a execução e cálculos da técnica de Real Time PCR.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura e à pós-graduanda Fernanda Gomes Cardoso, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP, por permitir o uso do termociclador e pela assessoria essencial para a execução de etapas deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório, especialmente à Inara, pela amizade e companheirismo e ao Georgius, pelo auxílio na manipulação dos animais utilizados neste trabalho.

Aos pós-graduandos do laboratório de Parasitologia da FCFRP - USP, especialmente ao Luiz Gustavo e Gisele pelo companheirismo, cumplicidade e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP - USP pela oportunidade.

Aos funcionários da Pós- Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP- USP, especialmente a Rosemary, a Rose, por ter me aturado todo esse tempo, seja para resolver meus problemas particulares ou os do EVTOX. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e conversas. À Rosana por atender meus telefonemas fora do horário. E ao Henrique pelo atendimento sempre cortial, muito obrigada.

Aos amigos que fiz no decorrer deste período: Bruno, pelas longas conversas, passeios, compras e amizade verdadeira. Airton pela oportunidade da amizade

e convivência. As Anas, Ana Cláudia e Ana Débora e também a Juçara pela amizade e consolo. A Gabi pela longa amizade e convivência. E a Greyce por ter me permitido conhece-la verdadeiramente deixando os julgamentos de lado.

Aos animais utilizados neste trabalho que se sacrificaram inocentemente em prol desta pesquisa.

À CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa de estudo concedida.

À Fapesp pelo suporte financeiro.

A todos que alguma forma contribuiu direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada.

RESUMO

DIAS, L.A.R. Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol. 2014. 151f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A transmissão oral ganhou destaque devido aos recentes surtos que ocorreram no Brasil com a ingestão de alimentos contaminados, além dessa via outra de grande importância é a transmissão transplacentária, sendo assim o presente trabalho associou as duas formas de transmissão da doença, juntamente com o tratamento com o benzonidazol único medicamento disponível no Brasil para o tratamento da doença. O medicamento é adotado somente para o tratamento da fase aguda, porém alguns pesquisadores mostraram alguns benefícios da terapia com benzonidazol na fase crônica da doença podendo o medicamento diminuir o avanço da doença e prolongar a soro conversão negativa em pacientes intermediários. Assim o objetivo deste trabalho foi de investigar a eficácia do tratamento tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença, bem como o efeito do tratamento em fêmeas de fase crônica. Utilizou-se camundongos Balb/c infectados com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *T. cruzi* administrado via oral. Os animais de fase aguda tratados receberam 50mg/Kg/dia de benzonidazol por 16 dias enquanto que aos animais de fase crônica o tratamento se iniciou ao 3º dia de gestação sendo administrado pelo mesmo período. O curso da parasitemia sanguínea foi verificada bem como ao fim do tratamento a parasitemia tecidual em baço, fígado e coração; placenta e feto, quando havia, empregando-se as técnicas de qPCR, com dois distintos métodos de cálculos matemáticos, imunofluorescência em microscopia confocal e análise histopatológica por coloração HE. A administração de benzonidazol proporcionou a diminuição das cargas parasitárias de baço, fígado e coração elucidando a eficácia do medicamento também em fase crônica. Porém em placenta e feto o medicamento gerou aumento de parasitas teciduais nos grupos que receberam tratamento em detrimento aos que não receberam. Deste modo, podemos sugerir que o tratamento com benzonidazol pode ser indicado para minimizar a carga de parasitas ou até mesmo para sua completa erradicação em indivíduos em fase crônica. Bem como, sugerimos que o medicamento deve ser ofertado por maior tempo aos indivíduos chagásicos tanto na fase aguda quanto na fase crônica visto que apresenta melhores resultados com o prolongamento da terapia. Entrementes dissuadimos o tratamento durante o período gestacional visto que, pode induzir a diminuição das barreiras imunológicas maternas e/ou facilitar a migração parasitária para os tecidos placentários e fetais.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Infecção oral; gestação; qPCR; Benzonidazol; Imunofluorescência.

***A**BSTRACT*

ABSTRACT

DIAS, L.A.R. **Evaluation of possible tissue changes _ in pregnant mice infected orally with *T. cruzi* and treated with benznidazole.** 2014. 151f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Chagas' disease affect millions of people around the world and the benznidazole is the only drug for the treatment in Brazil, but it is used basically for the acute phase of the disease. Some researchers showed many benefits of benznidazole therapy in chronic phase like reduction of the progression of the disease. Therefore, the objective of this work was investigate the efficacy of treatment in both acute and chronic phase of this disease, as well as the effect of treatment of female mouse in chronic phase. Balb/c mice were infected with 2×10^5 trypomastigotes forms of RC strain of *Trypanosoma cruzi* by oral route. Mice in acute phase were treated with 50mg/Kg/day Benznidazole for 16 days. Some chronically-infected mice were treated by 3rd to 18th day of gestation with the same dose. Blood parasitaemias were determined by microscopic examination of tail vein blood amount. Tissues parasitism were determined by qPCR with two different mathematical forms, immunofluorescence confocal microscopy and histopathology by HE staining. Administration of benznidazole promoted decrease of parasites in spleen, liver and heart indicating the efficacy of the drug in the chronic phase. However in placenta and fetus the drug caused tissues parasites increased in the groups that received treatment. Therefore, we suggest that the treatment with benznidazole would be indicated to minimize the number of parasites or eliminate them in individuals in chronic phase. As well, we suggest that the drug should be offered for longer chagasic individuals to both acute and chronic phase because it shows better results with prolonged therapy. However, our results indicate the treatment do not be offered during pregnancy because it can induce the decrease of maternal immunological barriers and facilitate the parasite migration to the placental and fetal tissues.

Keywords: Chagas Disease; Oral infection; pregnancy; qPCR; benznidazole; Immunofluorescence.

1. INTRODUÇÃO

Descrita há 104 anos, pelo médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), a doença de Chagas está presente na história da humanidade há cerca de 9.000 anos, sendo já detectada em múmias pré-colombianas em diferentes partes do Continente Americano (AUFDERHEIDE et al., 2004; HUEB, 2006).

Durante pesquisa sobre a malária, outra moléstia que assolava a população naquela época, Carlos Chagas realizou em seus estudos uma tripla descoberta, encontrando o vetor, o parasita e posteriormente identificando a patologia da nova enfermidade por ele descrita. Também caracterizou sua epidemiologia, meios de transmissão, profilaxia, sintomatologia, anatomia patológica, etiologia e suas formas clínicas (FERNANDES, 2005; KROPF, 2006).

No decorrer da pesquisa, encontrou formas flageladas de um tripanosoma no intestino de um inseto hemíptero. O inseto ocultava-se da claridade do dia, nas frestas das paredes de barro batido, das casas de pau-a-pique, e à noite saía para se alimentar, picando os moradores, principalmente na região da face. Esse hemíptero hematófago era conhecido vulgarmente como “barbeiro” (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; LANA et al., 2000). Após estudo verificou ser uma nova espécie de protozoário flagelado, denominando-o de *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum cruzi*), em homenagem ao mestre, Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909).

Ainda em 1909, após analisar o sangue de uma menina de dois anos, Berenice, que apresentava sintomas clínicos agudos, Chagas encontrou o parasito, confirmando assim a descoberta de uma nova enfermidade humana (FERNANDES, 2005; LANA et al., 2000).

Mais de um século se passou desde sua descrição, porém poucos avanços foram dados após anos de pesquisa (TARLETON et al., 2012). Com incidência inicial do sul dos Estados Unidos à Argentina, a doença ganhou espaço atualmente, tanto nas demais áreas da América do Norte quanto na Europa e Ásia (SILVA et al., 2006; CUCUNUBÁ et al., 2012; BARRY et al., 2012).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) assim como a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que existam cerca de 10 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo.

Na América Latina estão cerca de 7,5 milhões e destas 5 milhões apenas no Brasil. Nos Estados Unidos este número é de cerca de 1 milhão (HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; BARRY et al., 2012; CDC, 2012; CARVALHO et al., 2011; WHO, 2012).

A doença possui uma incidência de 200.000 casos por ano (RASSI et al., 2012). Destes 14.000 são em países não endêmicos, e em torno de 13.000 pessoas morrem a cada ano, além de 28 milhões de pessoas encontrarem-se em risco de contrair a doença em quinze diferentes países. A alta incidência mundial é devido à globalização que facilitou a locomoção populacional entre a América Latina e os demais continentes em razão das migrações em busca de melhores condições sociais (CORTEZ et al., 2012; SILVA et al., 2012; HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; SHIKANAI-YASUDA et al., 2012; PÉREZ-MOLINA et al., 2012).

A enfermidade é característica da camada mais pobre da população, estando relacionada com o subdesenvolvimento e condições precárias de habitação (CHIPPAUX et al., 2010; BARRETT et al., 2012).

A doença de Chagas é um exemplo típico da consequência que as alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente podem provocar. O hemoflagelado até então restrito a vida silvestre, presente apenas entre os mamíferos selvagens, passou a fazer parte do leque de doenças humanas quando o homem tomou posse de ecótopos, permitindo assim se incluir no ciclo epidemiológico da zoonose ocorrendo a sinantropia. (CORTEZ et al., 2012; LANA et al., 2000; WHO, 2002).

1.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

O ciclo da doença envolve dois hospedeiros – intermediário e definitivo. No hospedeiro intermediário passam três formas morfológicas distintas de *T. cruzi*. Ao se alimentar de sangue infectado, o barbeiro ingere a forma tripomastigota sanguínea que ao atingir o intestino se converte em epimastigota, forma replicativa.

Após algumas semanas estas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, forma não replicativa, que é eliminada nas fezes (CHAGAS, 1909).

No hospedeiro definitivo estão presentes duas formas do parasita, o tripomastigota e o amastigota. O tripomastigota metacíclico proveniente do vetor invade o tecido e as células próximas ao local do contato inicial, se convertem em formas amastigotas, replicam-se e em seguida transformam-se em tripomastigotas sanguíneas ainda no interior dessas células. No último estágio ocorre a explosão das células infectadas e as novas formas são enfim são liberadas, estas podem penetrar em novas células locais ou alcançar a corrente sanguínea atingindo os demais tecidos do hospedeiro (BARRETT et al., 2012; BARRY et al., 2012).

1.2. TRANSMISSÃO

A infecção pelo protozoário ocorre por diferentes tipos de transmissão como vetorial, transfusional, vertical (transplacentária), oral, aleitamento materno, acidentes laboratoriais, transplante de órgãos, via sexual e uso comunitário de drogas injetáveis (VINHAES et al., 2000; DIAS et al., 2011; CARTER et al., 2012).

A transmissão vetorial corresponde de 80 a 90% dos casos. O vetor pertence à família *Reduviidae* e as principais espécies transmissoras no Brasil são *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e o *Rhodnius prolixus* (CARDOSO et al., 2006). A contaminação acontece quando um barbeiro infectado urina ou defeca sobre a pele lesada, liberando os tripomastigotas metacíclicos, ou quando o parasita entra em contato com mucosas oral, olfativa ou ocular (SILVA et al., 2012). Nenhum barbeiro nasce contaminado, não existindo portando a transmissão trans-ovariana, mas se infecta quando se alimenta do sangue humano ou de animal contaminado com o flagelado (GUIA PARA VIGILÂNCIA, PREVENÇÃO, CONTROLE E MANEJO CLÍNICO DA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA TRANSMITIDA POR ALIMENTOS, 2009).

Existem três diferentes ciclos biológicos de transmissão: o silvestre, o doméstico e o peridoméstico. O ciclo silvestre ocorre entre os animais silvestres como gambás e tatus. O ciclo doméstico se iniciou com a invasão humana no ambiente silvestre, sendo que em seguida houve ocupação das frestas das casas de

barro pelos tritomíneos. Já o ciclo peridoméstico ocorre entre os animais que habitam os sótãos, telhados, porões e lugares próximos às habitações humanas (LANA et al., 2000; COURA, 2007).

No Brasil a transmissão vetorial da doença sofreu queda significativa devido a projetos governamentais de combate a seus vetores, principalmente a *Triatoma infestans* (DIAS et al., 2008; DIAS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011).

A transmissão sanguínea é a principal forma de transmissão da doença em países não endêmicos e em países que adotaram medidas de controle do vetor. Essas medidas ajudaram significativamente na queda da transmissão devido ao maior controle exercido pelos bancos de sangue, sendo que a transmissão por transfusão sanguínea representa atualmente de 8% a 18% dos casos da doença (CARTER et al., 2012).

O transplante de órgãos é ainda a segunda principal via de veiculação da doença de Chagas no mundo, principalmente em país não endêmicos. E pode ocorrer quando um doador está infectado, além da possibilidade de reativação da fase aguda da doença após um transplante quando o receptor já possui a patologia (KUN et al., 2009). Existe a possibilidade de transmissão por diferentes órgãos dentre eles o coração, fígado, medula óssea, pâncreas e rim. Essa forma de transmissão irá depender da parasitemia tecidual no momento da doação e do estado imunológico do receptor (DIAS et al., 2011; FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014).

A transmissão por aleitamento materno é rara não impedindo portando a amamentação proveniente de mãe infectada, exceto quando há fissura mamilar com extravasamento sanguíneo (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014).

Outra via rara e pouco notificada é a acidental, pois costuma ser devido a erros do manipulador de material biológico contaminado, despreparo técnico ou falta de uso apropriado de EPIs. Podem ocorrer em laboratórios ou hospitais, durante a manipulação de triatomíneos infectados ou materiais infectados como sangue, cultura do parasita, entre outros (KINOSHITA-YANAGA et al., 2009).

Como as duas principais formas de transmissão da doença de Chagas foram relativamente controladas em alguns países endêmicos, a transmissão vertical

(transplacentária), descrita já em 1911 por Carlos Chagas, ganhou destaque, assim como a transmissão oral, que teve relativo aumento devido a surtos recentes no Brasil e em outros países endêmicos.

1.2.1. TRANSMISSÃO VERTICAL

A transmissão vertical da doença de Chagas pode ocorrer em qualquer estágio de doença materna, fase aguda ou crônica, e em qualquer período da gestação. A transmissão é mais frequente entre o 4º e 9º mês de gestação, inclusive no momento do parto, na passagem do feto pelo canal vaginal, onde suas mucosas podem entrar em contato com o sangue infectado da mãe (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014).

Segundo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) a transmissão congênita ocorre em 1 a 10% das crianças nascidas de mães infectadas e depende de fatores desconhecidos (CUCUNUBÁ et al., 2012; CDC, 2012). Algumas condições podem favorecer tal processo como: cepa infectante, fatores placentários, obstétricos, imunológicos da mulher e sua nutrição, tempo de gestação, parasitemia e a fase da doença que a mulher se encontra enquanto grávida, sendo que na fase aguda aumentam-se as chances de infecção fetal em relação à fase crônica. Sabe-se que uma mesma mulher pode transmitir a doença a um filho e não transmiti-la nas demais gestações (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

Durante a gravidez ocorre uma relativa diminuição da imunidade mediada por células evitando assim a rejeição do feto, podendo a gestante estar mais susceptível à infecção (SANCHEZ et al., 2012; RAGHUPATHY et al., 2009).

A gravidez na presença de *T. cruzi* pode afetar sobremaneira o feto no seu desenvolvimento, crescimento e maturidade, causando em alguns casos: aborto, prematuridade, crescimento intrauterino retardado e malformações fetais. Há casos mais graves com nascimento de natimortos ou com diferentes manifestações clínicas, entre elas: febre, hepatomegalia, esplenomegalia e sinais de cardiopatia aguda ou comprometimento do sistema nervoso central. (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; TORRICO et al., 2004; RIVERA, 1995; BADRA et al., 2008).

Estima-se que a mortalidade no primeiro ano de vida em recém-nascidos infectados seja de 49% quando não devidamente tratados. Porém, quando é ofertado o tratamento correto, a recuperação em até 1 ano de vida é de 90 a 100% (CARDONI e ANTUNEZ, 2004).

Somente de 10 a 40% dos bebês apresentam sintomas como baixo peso ao nascer, hepatoesplenomegalia, dificuldade respiratória, anasarca e insuficiência cardíaca, sendo na maioria das vezes assintomáticos, dificultando assim o diagnóstico precoce da doença. Assim, os sinais clínicos apresentados pelos recém-nascidos não podem ser considerados marcadores importantes da patologia, havendo grande necessidade de um diagnóstico laboratorial precoce da doença (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; CDC, 2012).

1.2.2. TRANSMISSÃO ORAL

A transmissão oral ocorre através de alimentos contaminados com triatomíneos ou suas excretas que são trituradas durante a preparação de alimentos como o açaí, caldo de cana e suco de palma (WHO 2002; BARBOSA, 2006; DIAS et al., 2008; RAMÍREZ et al., 2013).

A transmissão pode ocorrer também por ingestão de carne crua ou mal passada de espécimes silvestres infectados, alimentos crus contaminados com urina ou secreção anal de marsupiais infectados, contaminação dos utensílios da cozinha usados durante o preparo dos alimentos, consumo inadequado de sangue de mamíferos contaminados e presença de baratas ou moscas, com fezes de triatomíneos, sobre os alimentos (DIAS et al., 2011; RAMÍREZ et al., 2013).

No Brasil, os primeiros casos de transmissão por via oral foram documentados na década de 1960, no Rio Grande do Sul, em Teutônia, por consumo de alimentos contaminados. Mais recentemente foram relatados novos casos com alguns óbitos confirmados devido ao consumo de caldo de cana, açaí e suco de palma, principalmente nos estados do norte, nordeste e sul do país (DIAS et al., 2011; NÓBREGA et al., 2009).

A doença por via oral não se restringe somente ao Brasil, sendo encontrados muitos casos em países próximos como Colômbia, que notificou quatro surtos da doença em sua forma aguda entre 1992 e 2008, além do México e Venezuela (DIAS et al., 2011; RÍOS et al., 2011).

Sabe-se que a incidência da infecção via oral é maior pela mucosa bucal se comparado às demais vias digestivas, esofagiana, gástrica e intestinal, visto que, a maior parte dos parasitas que irão causar a doença se utiliza da mucosa bucal para penetrar nas células do hospedeiro. Porém, uma porcentagem de protozoários que chegam ao estômago é capaz de resistir à passagem pelo suco gástrico estomacal, devido à proteção externa que possuem, determinada pela presença de glicoproteínas que interagem com a mucina gástrica, conseguindo assim ultrapassar a camada de muco, chegando à mucosa gástrica onde invadem células da mucosa e se diferenciam em formas amastigotas, replicam-se e transformam-se em formas tripomastigotas sanguíneas, as quais então são liberadas, atingindo novas células. Para este processo o período de incubação varia de 3 a 22 dias (BASTOS et al., 2010; CARDOSO et al., 2006; YOSHIDA et al., 2011).

A taxa de mortalidade devido à infecção oral por *T. cruzi* nas primeiras duas semanas após a infecção é de 8% a 35% dos infectados, devido principalmente a complicações como insuficiência cardíaca congestiva aguda, miocardite e meningoencefalite (SANCHEZ et al., 2012).

1.3. FASES, FORMAS DA DOENÇA E QUADRO CLÍNICO

São duas as fases da doença: aguda e crônica. A fase aguda da doença de Chagas inicia-se com manifestações no local de introdução de *T. cruzi* com um sinal característico, o sinal de Romaña ou um chagoma de inoculação, que aparece em 50% dos indivíduos dentro de 4 a 10 dias após a picada do inseto, regredindo em até 2 meses. Esta fase pode ser assintomática ou sintomática variando com a imunidade do hospedeiro. Os sintomas são em geral febre baixa, 37,5 a 38,0°C, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, edema localizado e generalizado, poliadenia, insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas (PINTO et al., 2004; LANA et al., 2000; SILVA et al., 2006).

A fase crônica compreende diferentes formas de manifestação da doença: indeterminada, cardíaca, digestiva e nervosa. A forma indeterminada é assintomática, podendo durar de 10 a 30 anos. É caracterizada por exames sorológicos positivos, ausência de sintomas e eletrocardiograma normal podendo haver discreta miocardite. Nesse estágio da doença, 30% dos indivíduos podem evoluir para a forma cardíaca (SILVA et al., 2006; FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; WHO, 2007).

A forma cardíaca acomete de 20 a 40% dos indivíduos infectados e seu quadro clínico é a insuficiência cardíaca congestiva (ICC) que ocorre pela diminuição de massa muscular substituída por fibrose (miocardiopatia inflamatória fibrosante). A ICC pode vir acompanhada de hipóxia, trombos cardíacos, desprendimento de êmbolo com possibilidade de infartos, gerando um quadro potencialmente fatal (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; LANA et al., 2000).

A forma digestiva engloba de 7 a 11% dos casos com sintomas indo desde tosse e soluço à disfagia, dor retroesternal, regurgitação e pirose devido à presença do megaesôfago e megacólon provocados pelo comprometimento do sistema nervoso autônomo. A fase nervosa da doença é muito controversa e pouco estudada, mas sabe-se que ocorre perda ou diminuição dos neurônios (LANA et al., 2000).

1.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado usando três principais critérios: o parasitológico, o sorológico e o molecular. O exame parasitológico positivo indica fase aguda da doença, pois na fase crônica a parasitemia encontra-se muito baixa não sendo detectada pelo exame direto do sangue periférico. No exame sorológico pesquisam-se anticorpos anti-*T. cruzi* classe IgM e IgG no sangue periférico (LANA et al., 2000; CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

Na década de 1990 foi desenvolvida a *Polymerase Chain Reaction* – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) onde é amplificado o DNA do *T. cruzi*. Este método é altamente específico, pois permite detectar com sucesso as distintas

cepas de *T. cruzi* mesmo na presença de excesso de DNA humano que não interfere no processo de amplificação seletiva do DNA do protozoário (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014).

Posteriormente o *Real Time* Polymerase Chain Reaction – RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) veio potencializar a forma de diagnóstico das várias cepas de *T. cruzi*. O RT-PCR utiliza sondas fluorescentes que permitem o monitoramento contínuo da reação durante toda a amplificação do DNA. É uma técnica rápida, sensível, específica e com baixos riscos de contaminação, visto que a amplificação e detecção são realizadas em uma única etapa, não envolvendo novo contato com a amostra, ao contrário do PCR convencional (Mackay, 2004). Devido a todas as vantagens a técnica é a mais adequada para o diagnóstico, monitoramento e avaliação da resposta ao tratamento em indivíduos chagásicos.

Existem ainda outras formas de diagnóstico menos utilizadas como o xenodiagnóstico, hemocultura, inoculação do sangue em cobaias, além das sorológicas como hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), teste imunoenzimático (ELISA) e *Western blot* (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; COURA e PEREIRA, 2012).

1.5. TRATAMENTO

O tratamento atual é parcialmente eficaz, e compreende o benzonidazol e o nifurtimox, aplicados principalmente durante a fase aguda da doença, pois possuem baixa atividade terapêutica na fase crônica (BOSCARDIN et al., 2010). Esses medicamentos não podem ser aplicados em terapias prolongadas devido aos efeitos colaterais apresentados.

O benzonidazol, 2-(2-nitroimidazol-1-il)-N-(fenilmetilacetamida), foi primeiramente produzido em 1972 pela Roche que mais tarde cedeu a produção do medicamento para Lafepe que atualmente é o único distribuidor no país. É a única droga atualmente disponível no Brasil sendo administrado via oral por até 60 dias e age sobre as formas sanguíneas do parasita. A dose adotada para o tratamento em adultos é de 5-7 mg/dia/kg de peso corpóreo, e para crianças é de 5-10 mg/dia/kg de

peso corpóreo (SILVA et al., 2012; BARRETT et al., 2012; HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; RIGALLI et al., 2012).

O medicamento é rapidamente absorvido no trato-gastrointestinal e metabolizado no fígado pelo sistema citocromo P450 e enzimas xantinas oxidoreductase e aldeído-oxidase. Pelo citocromo P450 é metabolizado pelas nitroreductase tipo I dependente de NADH que gera glioxal, agente citotóxico e mutagênico e pela nitroreductase tipo II que na presença de oxigênio favorece a formação de radicais livres intermediários e espécies reativas de oxigênio. Seus metabólitos são excretados via urinária (BARTEL et al., 2010; PÉREZ-MOLINA et al., 2009; RIGALLI et al., 2012).

Possui ação tripanossomicida contra todas as formas parasitárias, sendo mais eficiente contra as formas extracelulares (fase aguda) do que contra as formas intracelulares (fase crônica). A biodisponibilidade é relativamente elevada, 3 a 6 µg/mL, porém o risco de toxicidade dérmica ocorre em concentrações de 20µg/mL. Metabólitos reativos intermediários do medicamento se ligam covalentemente ao DNA, proteínas, lipídeos e macromoléculas do parasita promovendo alterações, como inativação de enzimas, inibição da síntese proteica, degradação do DNA, mutagênese e efeitos genotóxicos (BARTEL et al., 2010; CASTRO et al., 2006; MURCIA et al., 2012; PINAZO et al., 2013).

Não é a terapia ideal devido aos efeitos adversos secundários múltiplos como hipersensibilidade, lesões dérmicas, neurológicas entre outras. Além de sua eficácia limitada que pode estar relacionada com as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, tais como meia-vida curta, entorno de 12 a 15 horas. (DÍAZ-CHIGUER et al., 2012; PINAZO et al., 2013).

Existem evidências demonstrando os benefícios da terapia com benzonidazol na fase crônica da doença podendo o medicamento diminuir o avanço da doença e prolongar a soro conversão negativa em pacientes intermediários. A persistência no tratamento pode aumentar em até 18 vezes a probabilidade da resposta do paciente à terapia (PÉREZ-MOLINA et al., 2009; PINAZO et al., 2010)

O Nifurtimox, existente na América Central, pode ser utilizado como alternativa em caso de intolerância ao benzonidazol, porém causa mais efeitos

indesejáveis que o benzonidazol. Age sobre as formas sanguíneas e pouco sobre as teciduais, possui meia-vida de 3 horas e a dose indicada para adultos é de 8-10 mg/dia/kg de peso corpóreo e para crianças é de 15 mg/dia/kg de peso corpóreo, também administrado por via oral por até 90 dias.

O tratamento é sugerido para a fase aguda da infecção, fase crônica reativada e paciente menores de 18 anos infectados (OLIVEIRA et al., 2008).

Nas infecções crônicas ocorre uma exaustão imunológica induzida pelo parasita, com uma perda progressiva das células imunológicas específicas que atuam contra o patógeno (células T CD8+). Além disso, as citocinas que participam do controle da infecção por *T. cruzi* também induzem a patogenia durante a mesma, e essa pode ser exacerbada na presença do benzonidazol visto, que o medicamento pode afetar a regulação imunológica do hospedeiro (BUSTAMANTE et al., 2008; CUTRULLIS et al., 2011).

Essa desregulação imunológica juntamente com o aumento da produção materna de TNF- α (fator de necrose tumoral) pode ser responsável por diminuir a imunidade materna durante a gestação o que favorece a passagem das formas tripomastigotas sanguíneas através da barreira placentária podendo ainda atingir os tecidos fetais (BOUFKER et al., 2006).

Visto que a transmissão da Doença de Chagas por via oral e congênita são hoje consideradas importantes formas de transmissão do protozoário, devido aos programas implantados para reduzir a transmissão vetorial e melhorias no controle efetuadas nos bancos-de-sangue para se evitar a transmissão por transfusão sanguínea. Acreditamos na importância de se avaliar o comportamento de uma cepa silvestre de *T. cruzi* na transmissão oral e suas consequências no período gestacional bem como o impacto terapêutico do benzonidazol na diminuição da carga parasitária dos animais tratados. A cepa silvestre foi escolhida, pois as transmissões orais documentadas recentemente ocorreram por trituração de barbeiros infectados contendo cepas silvestres.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos terapêuticos e tecidais do benzonidazol sobre a infecção experimental de camundongas fêmeas por *T. cruzi*, pela via oral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos deletérios da infecção congênita do protozoário *T. cruzi* em fêmeas prenhes infectadas por via oral, na fase crônica, através da incidência de transmissão vertical de *T. cruzi* na prole por meio da histopatologia e imunofluorescência.
 - Observar a eficácia do medicamento benzonidazol como fonte de tratamento também durante a gravidez, bem como as alterações tóxicas que ele determina nas fêmeas e na prole durante a fase crônica da infecção.
 - Padronizar e quantificar o índice de parasitismo por qPCR nos tecidos coletados: baço, fígado, coração, tecido fetal e placentário dos diferentes grupos.
-

5. DISCUSSÃO

Adotada como um critério para o diagnóstico da Doença de Chagas a parasitemia sanguínea indica a fase aguda da infecção, visto que, na fase crônica, os parasitas circulantes do sangue periférico encontram-se em declínio, não sendo possível sua detecção pelo método direto (MONCAYO, 2003).

Neste estudo a técnica foi realizada, nos camundongos Balb/c infectados via oral com 2×10^5 formas por gotejamento de sangue, entre o 5º e 11º dia de infecção para os grupos de fase aguda (NPI e NPIB) e entre o 5º e 24º dia de infecção para os grupos de fase crônica (INPP 60 e INPPB 60).

A via oral foi abordada em virtude dos recentes episódios de infecção através do consumo de alimentos contaminados pelas diferentes formas do parasita (BARBOSA et al., 2012; MARTINS et al., 2010). O gotejamento sanguíneo foi escolhido em detrimento à gavagem, pois a infecção pela cavidade oral é mais susceptível do que pelas demais vias digestivas (CARDOSO et al., 2006).

Nos grupos de fase aguda a contagem parasitária foi necessária para verificar se a infecção havia ocorrido, antes do início do fornecimento de tratamento com o benzonidazol para as fêmeas. Por tanto somente três coletas de sangue caudal foram suficientes para a confirmação da infecção.

Entretanto nos grupos de fase crônica a coleta sanguínea caudal se prolongou ao 24º dia de infecção para se estabelecer o pico parasitêmico da infecção pela via oral da cepa em estudo, o qual foi evidenciado ao 14º dia de infecção, apresentando média de 424.494 parasitas/mL de sangue. A contagem parasitêmica estendida, também foi escolhida para acompanhar o curso da fase aguda da cepa, que se estende entre 27 e 40 dias após a inoculação do parasita. Pela infecção por via oral, o declínio parasitêmico iniciou-se a partir do 18º dia de exposição à cepa, corroborando os resultados obtidos por Albuquerque e Barreto, em 1970.

Utilizada nos laboratórios de pesquisa com umas das alternativas de diagnóstico para as técnicas parasitológicas tradicionais, a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi uma das ferramentas de escolha para a monitorização da

carga parasitária tecidual. Dentre as vantagens pode-se ressaltar o baixo risco de contaminação, maior sensibilidade e por contrair dados da reação a cada novo ciclo de amplificação, o que permite o cálculo do produto por região da curva (SCHIJMAN et al., 2011).

No presente trabalho a técnica foi utilizada nos tecidos dos órgãos baço, fígado, coração, placenta e nos fetos, com o objetivo de detectar e verificar a carga parasitária nas fases aguda e crônica bem como na monitorização da eficácia do tratamento com benzonidazol em ambas as fases, se apresentando como uma forma de diagnóstico rápido, específico, sensível e reprodutível.

Para padronizar as amplificações foi utilizado DNA de *T. cruzi* de 1 a 10^6 cópias do genoma do parasita. E como controle interno para normalizar as quantidades de DNA das reações foi utilizado GAPDH de 1 a 10^5 cópias do genoma do camundongo. As condições do ensaio como temperatura, tempo de ciclagem e concentração dos reagentes e DNA foram otimizadas para se obter alta eficiência de amplificação.

Devido à recuperação de DNA amostral ter se apresentado variável foi essencial o uso do controle endógeno para normalizar a quantidade de tecido analisado, corrigir variações intra-amostrais e obter uma quantificação reprodutível. Essa reprodutibilidade foi demonstrada na tabela 10 através da quantificação de uma mesma amostra em triplicata, sendo visualizada para todos os órgãos estudados (KARA et al., 2003).

O desempenho global do ensaio foi mensurado através da estimativa da eficiência de amplificação, valor no qual o produto de PCR é gerado. Para melhorar a eficiência, o DNA amostral extraído foi diluído para a concentração 20ng/ μ L de DNA. Assim obtiveram-se índices de eficiência acima de 90% para as curvas padrões de *T. cruzi* e de GAPDH, como apresentado nas tabelas 8 e 9. Essa associação só foi possível, pois o normalizador interno, GAPDH, e *T. cruzi* tiveram eficiência de amplificação semelhantes (CUMMINGS e TARLETON, 2003; KARA et al., 2003).

Outro parâmetro importante adquirido, o valor de R^2 corresponde ao coeficiente de regressão e é obtido a partir da linha de regressão linear da curva

padrão. R^2 indica a precisão na distribuição dos pontos da curva. No presente trabalho obteve-se R^2 superior a 0,99 em ambas as curvas tabelas 8 e 9.

Através dos resultados obtidos pela qPCR optou-se por calcular tanto o número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH quanto o número de parasitas/ 30mg de tecido com o intuito de se comparar os dois distintos métodos matemáticos utilizados na verificação da carga parasitária tecidual.

Neste contexto, na quantificação do parasitismo do baço, para os quatro grupos estudados, empregando os dois métodos, não observamos diferenças pelo número de cópias. Porém, pelo número de parasitas em 30 mg de tecido a diferença foi evidente se compararmos o grupo de fase aguda não tratado (NPI) com o grupo de fase aguda que recebeu benzonidazol (NPIB), assim como na comparação do grupo de fase crônica não tratado (INPP 60) com o grupo de fase crônica que recebeu benzonidazol (INPPB 60). A queda no número de parasitas em ambos os grupos tratados (NPIB e INPPB 60) poder ser devido à eficácia do tratamento com o benzonidazol.

Nos grupos de fase aguda (NPI e NPIB) essa diferença parasitária, provocada pela medicação, foi confirmada pelos dois métodos, sendo mais expressiva através do número de cópias ($p = 0,0003$), se comparado ao número de parasitas ($p < 0,05$). Em contrapartida nos grupos de fase crônica a confirmação estatística não ocorreu, restringindo-se somente na confirmação visual pelos dados representados nas barras dos dois gráficos, sendo mais evidente pelo número de cópias.

Em relação ao parasitismo tecidual do fígado, nos quatro grupos não observamos diferenças estatísticas pelos dois métodos. Porém, na comparação individual dos grupos de fase aguda a diferença despontou em ambos os métodos, apresentando $p = 0,0005$, pelo número de cópias, e $p < 0,005$ pelo número de parasitas. Porém, não observamos ocorrência semelhante para os grupos de fase crônica.

No tocante a parasitemia tecidual cardíaca, para os quatro grupos confrontados entre si evidenciamos diferença estatística somente na contagem de parasitas ($p < 0,05$), sendo possível visualizar no gráfico esta diferença (Figura 19), principalmente nos grupos de fase aguda, onde os dados representados para o

grupo controle (NPI) se mostram muito superior àqueles do grupo tratado (NPIB). Isso se aflora na comparação individual da fase aguda pelos dois métodos, obtendo-se para p valores idênticos ($p < 0,05$). Todavia, na avaliação isolada dos grupos de fase crônica não observamos resultados semelhantes.

Após a avaliação dos três tecidos, baço, fígado e coração a hipótese levantada é que o tratamento com benzonidazol é mais eficaz na fase aguda da doença em contraste com a fase crônica (PINAZO et al., 2013). Assim entendemos que o número de parasitas/tecido e cópias de *T. cruzi*/GAPDH diminuiu nos grupos NPIB e INPPB 60, tratados, porém essa redução e a variação de dados, observada pelo desvio padrão dos diferentes grupos, não é matematicamente suficiente para que essa situação seja apontada pelos testes estatísticos. Pinazo e colaboradores (2010) discutiram que em longo prazo, o tratamento com benzonidazol na fase crônica da infecção pode restringir a progressão da doença, além de aumentar a soro conversão negativa em pacientes que se encontram na fase indeterminada.

Segundo os pesquisados, tais reduções começaram a ser evidenciadas em pacientes chagásicos seis meses após o início do tratamento com benzonidazol. No presente trabalho esta diminuição começou a despontar em todos os órgãos dos animais de fase crônica que receberam tratamento. Porém, não foi observada diferença estatisticamente positiva para os grupos afins, pois a duração da administração do medicamento não foi extensa o suficiente para apresentar valores de p importantes. Entretanto foi possível, por meio da visualização dos gráficos, observarmos que a diminuição parasitária já havia se iniciado somente com 16 dias de tratamento.

Sendo assim, a hipótese aventada é que quanto mais extenso o fornecimento medicamentoso para os animais em fase crônica, possivelmente maiores seriam as diminuições parasitárias teciduais, podendo inclusive a longo prazo chegar a zerar a carga parasitária durante a fase crônica da doença de Chagas, como já ocorre em 90 a 100% das crianças recém-nascidas que recebem o tratamento logo que expostas ao parasita (CARDONI e ANTUNEZ, 2004).

Os resultados das análises teciduais da placenta apontaram diferença estatística apenas na confrontação pelo número de cópias dos dois grupos de fase

crônica (INPP 60 e INPPB 60), sendo maior o número de cópias no grupo que recebeu tratamento, INPPB 60, que no grupo controle que não o recebeu, INPP 60.

Semelhante resultado foi divisado nas quantificações teciduais realizadas para os fetos, onde o grupo que recebeu tratamento apresentou número superior de cópias de *T. cruzi*/GAPDH, em detrimento ao grupo que não recebeu.

Várias hipóteses podem ser aventadas na tentativa de se esclarecer a presença de amastigotas nos tecidos placentário e fetal, dentre elas a de que o benzonidazol pode diminuir a imunidade materna favorecendo assim uma maior passagem das formas tripomastigotas sanguíneas pela barreira placentária atingindo em seguida os tecidos fetais. Uma via plausível para esta interferência na imunidade materna pode ser pela formação do agente citotóxico e mutagênico, glioxal que na presença de oxigênio gera radicais livres intermediários e espécies reativas de oxigênio que podem interagir com os tecidos placentários facilitando a passagem do parasita (BARTEL et al., 2010; PÉREZ-MOLINA et al., 2009; RIGALLI et al., 2012).

Além disso, segundo Cardoni e Antunez (2004), durante a gestação ocorre uma supressão da resposta imunológica materna objetivando-se proteger os tecidos fetais de potenciais danos que podem vir a serem causados pela resposta materna a alo-antígenos fetais. Entretanto tais conhecimentos ainda não podem ser aplicados a respeito da queda imunológica materna aos patógenos circulantes pelo sangue materno (SANCHEZ et al., 2012).

Posteriormente comparamos as quantificações parasitárias dos diferentes órgãos pertencentes ao mesmo grupo de estudo. Nesta confrontação interna não foram evidenciadas diferenças estatísticas em nenhum dos quatro grupos propostos, na análise parasitária pelos dois métodos utilizados.

Em relação a todas as comparações realizadas no presente trabalho, utilizando a contagem parasitária pelo número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH e número de parasitas em 30mg de tecido, podemos observar que ambos os métodos são eficazes e podem ser reproduzidos.

Dos 15 confrontos executados houve concordância de resultados em ambos os métodos em 73,33%. Porém, quando verificamos a sensibilidade matemática, o

método da análise gráfica de parasitas por 30mg de tecido foi superior ao método de número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH, exceto nos casos de placenta e feto, em que o método de cópias identificou resultados positivos enquanto que o método de número de parasitas não gerou tal desfecho matemático, somente no aspecto visual.

No tocante da análise de carga parasitária pela imunofluorescência em microscopia confocal foi possível visualizar ninhos de amastigotas nos tecidos estudados confirmando assim os dados previamente obtidos na qPCR.

Para o baço visualizou-se nos cortes de animais não tratados (NPI e INPP 60) maior número de ninhos amastigotas que em animais tratados (NPIB e INPPB 60), sendo que para os animais de fase crônica houve maior observação da presença dos ninhos de formas amastigotas que nos animais de fase aguda. O mesmo foi verificado tanto para os tecidos hepáticos quanto para os tecidos cardíacos confirmando os achados na qPCR para tais órgãos.

Assim demonstrou-se que na fase crônica ocorre predominância parasitária nos tecidos em detrimento a corrente sanguínea e que o tratamento com benzonidazol mesmo em curto período já foi eficaz na diminuição das formas do parasito.

Em relação às imagens de cortes placentários e fetais foi visualizado maior presença de ninhos amastigotas nos grupos tratados (NPIB e INPPB 60), quando confrontados com as imagens dos grupos não tratados (NPI e INPP 60), confirmando assim os resultados apresentados na qPCR para os dois tecidos, confirmando a hipótese de que o benzonidazol pode ter diminuído as barreiras imunológicas maternas, permitindo a passagem de parasitas ao feto.

Outro recurso empregado neste trabalho, com o intuito de figurar as alterações fisiológicas provenientes da doença e do tratamento foi a observação histopatológica dos cortes.

Nos tecidos baço, placenta e feto não foram observados quaisquer indícios de alterações histológicas, em todos os grupos, quando comparados a cortes de animais sadios. Entretanto nos cortes de fígado desses animais foram divisados inúmeros pontos com infiltrado inflamatório, indicando assim, que houve uma reação imunológica contra o patógeno. O mesmo ocorreu para os tecidos cardíacos em

todos os grupos, sendo possível perceber presença de infiltrado inflamatório bem como de pericardite evidenciando que houve também no coração uma reação imunológica.

Por conseguinte, a presença de *Trypanosoma cruzi* além de estar pautada na elevada carga parasitária também está relacionada com o desequilíbrio das respostas imunológicas que, quando exacerbadas na tentativa de proteger o organismo do hospedeiro infectado, podem prejudicá-lo, levando então a uma imunopatologia associada à doença (ROGGERO et al., 2002).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As técnicas empregadas para caracterização parasitária no presente trabalho foram sensíveis, consistentes, adequadas e sustentaram os resultados apresentados entre si no monitoramento da infecção.

A análise da carga parasitária demonstrou que para baço, fígado e coração o tratamento, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, foi eficaz na diminuição de ninhos de amastigotas. Entretanto para placenta e feto o tratamento contribuiu para o aumento da intensidade de ninhos de amastigotas.

Deste modo, podemos sugerir, teoricamente, que o tratamento com benzonidazol pode ser indicado para minimizar a carga de parasitas ou até mesmo para sua completa erradicação em indivíduos em fase crônica, bem como, sugerimos que o medicamento deve ser ofertado por maior tempo aos indivíduos chagásicos tanto na fase aguda quanto na fase crônica, visto que apresenta melhores resultados, sem levarmos em conta os efeitos colaterais já demonstrados pelo medicamento e largamente apontados na literatura científica.

Entrementes dissuadimos o tratamento durante o período gestacional visto que, pode induzir a diminuição das barreiras imunológicas maternas e/ou facilitar a migração parasitária para os tecidos placentários e fetais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, R.D. & BARRETTO, M.P. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* – XLIV – infecção natural da raposa-do-campo, *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* (LUND, 1842) pelo 'T. cruzi'. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.12, suppl. 6, p. 375-382, 1970.
 2. AOKI, V., SOUSA JR., J.X., FUKUMORI, L.M.I., PÉRIGO, A.M., FREITAS, E.L., OLIVEIRA, Z.N.P., Imunofluorescência direta e indireta. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.
 3. AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B., RENIER, C.; WITTMERS, L.E.; FORNACIARI, G. J.; ALLISON, M. A 9,000- year record of Chagas disease. **PNAS**, v. 101, n. 7, p. 2034-2039, 2004.
 4. BADRA, E.S.; SALA, M.A.; LOPES, R.A.; PRADO, J.C.Jr.; ALBUQUERQUE, S. ZUCOLOTO, S.; CARRARO-ABRAHÃO, A.A. Histopathological changes in the placentas and fetuses of mice infected with *Trypanosoma cruzi* isolated from the *Myotis nigricans* bat, **J. Comp. Path.** 2008, v. 139, p. 108-112.
 5. BARBOSA, P. R. B. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. **Internacional Journal of Cardiology**, v. 112, p. 132-133, 2006.
 6. BARBOSA, R. L., DIAS, V.L., PEREIRA, K.S., SCHMIDT, F.L., FRANCO, R. M.B., GUARALDO, A.M.A., ALVES, D.P., PASSOS, L.A.C. Survival *in vitro* and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. **Journal of food protection**, v. 75, n. 3, p. 601-606, 2012.
 7. BARRETT, M. P., e CROFT, S. L., Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**; v. 104, p. 175–196, 2012.
 8. BARRY, M. A.; BEZEK, S.; SERPA, J.A.; HOTEZ, P.J.; WOC-COLBURN, L. Neglected Infections of Poverty in Texas and the Rest of the United States: Management and Treatment Options, **Nature publishing group**, v. 92, n. 2, August, 2012.
 9. BARTEL, L. C., DE MECCA, M. M., DE CASTRO, C. R., BIETTO, F. M., CASTRO, J. A. Metabolization of nifurtimox and benznidazole in cellular
-

- fractions of rat mammary tissue. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 813–822, 2010.
10. BASTOS, C.J.C.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J.P.; JESUS, R.S.; FREIRE, M.S.; ARAÚJO, E.G.; PRAZERES, J.; GRASSI, M.F.R. Clinical
11. BOSCARDIN, S.B.; TORRECILHAS, A.C.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E.G.; TONELLI, R.R.; SILBER, A.A. Chagas' disease: na update on imune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, England, 2010.
12. BOUFKER, H.I., ALEXANDRE, H., CARLIER, Y., TRUYENS, C., Infertility in murine acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with inhibition of pre-implantation embryo development. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 5, 2006.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38 (Supl. III), p.12-14, 2005.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. **Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ**. Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=1>, diversos autores. Acessado em 17/03/2014.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de chagas aguda transmitida por alimentos. **Organização Pan Americana da Saúde**, Rio de Janeiro, 2009.
16. BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med.Trop.** São Paulo v. 4, p.389–396, 1962.
17. BURGOS, V.O. Análise bioquímica e histopatológica do fígado e pâncreas em modelos experimentais de camundongos Balb/c machos e Fêmeas infectados pela cepa RAL e RC de *Trypanosoma cruzi*. **Tese. Universidade Estadual de Campinas**. Campinas, 2007.
18. BUSTAMANTE, J.M., BIXBY, L.M., TARLETON, R.L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8⁺ T central memory response in chronic Chagas disease. **Nat Med**, v. 14, n. 5, p. 542-550, 2008.
19. CARDONI AND ANTÚNEZ. Outcome of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant Balb/c mice. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v. 98, n. 8, p. 883-887, 2004.
-

20. CARDOSO, A.V.N.; LESCANO, S.A.Z.; NETO, V.A.; SANTOS, S.V. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. **Rev. Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 287-289, sept-out, 2006.
21. CARTER Y.L.; JULIANO, J.J.; MONTGOMERY, S.P.; QVARNSTROM, Y.; Acute Chagas disease in a returning traveler. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, October 22, 2012.
22. CARVALHO, E.O.C.; ROSA, J.A.; CARVALHO, A.A.; CHAVES, H.C.O.; SOUZA, E.A.; OSTERMAYER, A.L.; CAMARGO, L.M.A. Estudo da ocorrência da doença de Chagas em Monte Negro, Estado de Rondonia, Amazonia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 703-707, nov-dez, 2011.
23. CASTRO, J. A., DE MECCA, M. M., BARTEL, L. C. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006.
24. CENCIG, S.; COLTEL, N.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with AmBisome. **Neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. 1216, 2011.
25. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, **Congenital Transmission of Chagas Disease — Virginia, 2010**. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 61, n. 26, July 6, 2012.
26. CHAGAS, Carlos. **Nova Tripanozomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem**. In: *Carlos Chagas: Coletânea de Trabalhos Científicos*. Editora Universidade de Brasília, p. 9-80; Publicado originalmente em Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. I Fasc. II em 1909, 1981.
27. CHIPPAUX, J.P.; CLAVIJO, A.N.S.; SANTALLA, J.A.; POSTIGO, J.R.; SCHNEIDER, D.; BRUTUS, L. Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 1, p. 87–93, January, 2010.
28. CORTEZ, C.; MARTINS, R.M.; ALVES, R.M.; SILVA, R.C.; BILCHES, L.C.; MACEDO, S.; ATAYDE, V.D.; KAWASHITA, S.Y.; BRIONES, M.R.S.; YOSHIDA, N. Differential Infectivity by the Oral Route of *Trypanosoma cruzi*

- Lineages Derived from Y Strain. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. 1804, October, 2012.
29. COURA, J. R. **Chagas disease: what is known and what is needed – A background article**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, suppl. I, p. 113-122, 2007.
30. COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. Doença de Chagas. O que é conhecido e o que deve ser melhorado: uma visão sistêmica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 3, p. 286-296, maio-jun, 2012.
31. CUCUNUBÁ, Z.M.; FLÓREZ, A.C.; CÁRDENAS, A.; PAVÍA, P.; MONTILLA, M.; ALDANA, R.; VILLAMIZAR, K.; RÍOS, L.C.; NICHOLLS, R.S.; PUERTA, C.J.; Prevalence and Risk Factors for Chagas Disease in Pregnant Women in Casanare, Colombia. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 87 v.5, p. 837–842, 2012.
32. CUMMINGS, K.L., TARLETON, R.L., Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 53-59, 2003.
33. CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular e Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 53-59, 2003.
34. CUTRULLIS, R.A., MOSCATELLI, G.F., MORONI, S., VOLTA, B.J., CARDONI, R.L., ALTCHER, J.M., CORRAL, R.S., FREILIJ, H.L., PETRAY, P.B. Benznidazole therapy modulates interferon- γ and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children. **Early Chagas disease treatment and immune response. Plos One**, v. 6, n. 10, 2011.
35. 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. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 3, p. 375-379, mai-jun, 2011.
36. DIAS, J.P. ; BASTOS, C. ; ARAÚJO, E. ; MASCARENHAS, A.V. ; NETTO, E.M. ; GRASSI, F. ; SILVA, M. ; TATTO, E. ; MENDONÇA, J. ; ARAÚJO, R.F. ; SHIKANAI-YASUDA, M.A. ; ARAS, R. ; Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296-300, mai-jun, 2008.
-

37. DÍAZ-CHIGUER D. L., **In vitro and in vivo trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains of *Trypanosoma cruzi***. *Acta Tropica* v. 122 p. 108– 112, 2012.
38. DOST, K.C; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W.; PRADO, J.C.Jr. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitol.Res.** v.88, p.609-616, 2002.
39. FERNANDES, R. M. **A Evolução no conhecimento e o controle da doença de chagas no Brasil: um estudo de caso sobre a interação entre a ciência, a tecnologia, a saúde e a economia**. 2005 134f. *Dissertação (Mestrado em Economia)*- Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional da Faculdade de ciências Econômicas, UFMG, Belo Horizonte, 2005.
40. FREITAS, J.M., AUGUSTO-PINTO, L., PIMENTA, J.R., BASTOS-RODRIGUES, L., GONCALVES, V.F., TEIXEIRA, S.M., CHIARI, E., JUNQUEIRA, A.C., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., PENA, S.D.J. Ancestral genomes, Sex and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, v. 2, p. 226-235, 2006.
41. HASSLOCHER-MORENO, A.M.; BRASIL, P.E.A.A.; SOUSA, A.S.; XAVIER, S.S.; CHAMBELA, M.C.; SILVA, G.M.S. Safety of benzimidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 67, p. 1261-1266, 2012.
42. HUEB, M. F. D. Doença de chagas: indicadores cognitivos, de transtorno orgânico cerebral, de uso de álcool e qualidade de vida. 2006 153f. **Tese (Doutorado em Saúde Mental)** – Departamento de Neurologia Psiquiatria e Psicologia médica, FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2006.
- I., WIETZERBIN J., SERRA E., REVELLI S. & BOTTASSO O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin.Exp.Immunol.** **128**, 421-428, 2002.
43. KINOSHITA-YANAGA A.T., TOLEDO, M.J.O.; ARAÚJO, S.M.; VIER, B.P.; GOMES, M.L. Infecção acidental pelo *Trypanosoma cruzi* acompanhada pela reação em cadeia da polimerase: relato de caso. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, V. 51, n. 5 p. 295-298, São Paulo Sept./Oct. 2009.

44. KROPF, S. P. Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação (1909-1962). 546f. **Tese (Doutorado em História)** – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.
 45. KUN H.; MOORE, A.; MASCOLA, L.; STEURER, F.; LAWRENCE, G.; KUBAK, B.; RADHAKRISNA, S.; LEIBY, D.; HERRON, R.; MONE, T.; HUNTER, R.; KUEHNERT, M.; Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. **Clinical Infectious Diseases**. V. 48, p. 1534–40, 2009.
 46. LANA, M. & TAFURI, W. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas In: NEVES, D. P. (Org), **Parasitologia Humana**. Editora Atheneu, São Paulo SP, 10ª Edição. p.85-108, 2000.
 47. MACKAY I.M., Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clin.Microbiol.Infect**. v. 10, p. 190-212, 2004.
 48. MARTINS, L.P.A., CASTANHO, R.E.P., NOGUEIRA, A.B., SILVA, O.T., GUSMÃO, A.S., Incidence of *Trypanosoma cruzi* transmission through breastfeeding during acute experimental Chagas disease. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. 116-118, 2011.
 49. MONCAYO, A., Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.
 50. MORTARA, R.A., SILVA, S., PATRÍCIO, F.R., HIGUCHI, M.L., LOPES, E.R., GABBAI, A.A., CARNEVALE, P., ROCHA, A., FERREIRA, M.S., SOUZA, M.M, FRANCO, M.F., TURCATO JR., G., NETO, B.H.F. Imaging *Trypanosoma cruzi* within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. **Parasitol Res**, v. 85, p. 800-808, 1999.
 51. MURCIA, L., CARRILERO, B., VIÑAS, P. A., SEGOVIA, M. Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients. **Rev Esp Quimioter**, v. 25, n. 1, p. 74-75, 2012.
 52. NÓBREGA, A.A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W.N.; Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious diseases**. v. 15, n. 4, abril, 2009.
-

53. OLIVEIRA, M. F.; NAGÃO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; JÚNIOR, A. S. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical, Brasil**, v. 37; p. 209-228, 2008.
- outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 6, p. 711, June, 2010.
54. PÉREZ-MOLINA, J. A., PÉREZ-AYALA, A., MORENO, S., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C., ZAMORA, J., LÓPEZ-VELEZ, R., Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 1139–1147, 2009.
55. PÉREZ-MOLINA, J.A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, **Clinical Presentation and Treatment**. *Curr Infect Dis Rep*, v. 14, p.263–274, 2012.
56. PINAZO, M. J., GUERRERO, L., POSADA, E., RODRÍGUEZ, E., SOY, D., GASCON, J., Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n. 1, p. 390–395, January, 2013.
57. PINAZO, M. J., MUÑOZ, J., POSADA, E., LÓPEZ-CHEJADE, P., GÁLLEGO, M., AYALA, E., DEL CACHO, E., SOY, D., GASCON, J., Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 4896–489, NOV, 2010.
58. PINTO, A. Y. N., VALENTE, S. A. S., VALENTE, V. C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, Belém, v. 8 n. 8 p. 454-460, 2004.
59. PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGÉS, M.; GASCÓN, J.; PRAT, J.G.; PORTÚS, M.; SAULEDA, S. Development of real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta tropica**, v. 103, p. 195-200, 2007.
60. RAGHUPATHY, R.; AL-MUTAWA, E.; AL-AZEMI, M.; MAKHSEED, M.; AZIZIEH, F.; SZEKERES-BARTHO, J. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women
-

- with recurrent miscarriage or preterm delivery. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 80, p. 91–99, 2009.
61. 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. 2041, February, 2013.
62. RASSI, A.JR.; RASSI, A.; REZENDE, J.M.; American Trypanosomiasis (Chagas Disease), **Infect Dis Clin N Am**, v.26, p. 275–291, Goiânia, 2012.
63. RIGALLI, J. P., PERDOMO, V. G., LUQUITA, M. G., VILLANUEVA, S. S. M., ARIAS, A., THEILE, D., WEISS, J., MOTTINO, A. D., RUIZ, M. L., CATANIA, V. A. Regulation of Biotransformation Systems and ABC Transporters by Benznidazole in HepG2 Cells: Involvement of Pregnane X-Receptor. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. 1951, December, 2012.
64. RÍOS, J.F.; ARBOLEDA, M.; MONTOYA, A.N.; ALARCÓN, E.P.; PARRAHENAO, G.J.; Probable brote de transmission oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia. **Biomédica**, v. 31, n. 1, p. 85-95, 2011.
65. RIVERA, M.T.; ARAUJO, S.M.; LUCAS R, DEMAN J, TRUYENS C, DEFRESNE MP, DE BAETSELIER P, CARLIER Y. High tumor necrosis factor alfa (TNF- α) production in *Trypanosoma cruzi* – Infected pregnant mice and increased TNF- α gene transcription in their offspring. **American Society for Microbiology**, Maringá, v. 63, n. 2, p. 591-595, 1995.
66. ROGGERO E., PEREZ A., TAMAE-KAKAZU M., PIAZZON I., NEPOMNASCHY
67. SANCHEZ, L.V.; RAMÍREZ, J.D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, p. 113, January, 2012.
68. SCHIJMAN, A.G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; JARAMILLO, A.M.M.; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R.H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; LEON, Z.S.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; RUMI, M.M.; LEVI, J.E.; RAMIREZ, J.D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M.I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; CASTRO, A.M.; GONZALEZ, C.I.; VIANA, K.A.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.;

- CHAVEZ, O.T.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; ESTANI, S.S.; DASILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **Neglected tropical diseases**, v. 5, n. 1, p. 931, 2011.
69. SHIKANAI-YASUDA, M. A. & CARVALHO, N. B., Oral Transmission of Chagas Disease. **Emerging Infections**, v. 54, p. 845- 852, March, 2012.
70. SILVA, M. A., NAI, G.A., ROSA, J.A. Caracterização biológica e Molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes na fase crônica, forma cardíaca da doença de Chagas. **Rev. De Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n.3, p. 213-226, set-dez, 2006.
71. SILVA, R. M. Preclinical Monitoring of Drug Association in Experimental Chemotherapy of Chagas' Disease by a New HPLC-UV Method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 56, p. 3344–3348, June, 2012.
72. SILVEIRA A.C.; DIAS, J.C.P.; O Controle da transmissão vetorial. **História sobre a Doença de Chagas no Brasil** v. 44 Suplemento II, 2011.
73. TARLETON, R. L. & CURRAN, J. W., Is Chagas Disease Really the “New HIV/AIDS of the Americas”? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, October, v. 6 n. 10 e1861, 2012.
74. TECHNICAL MANUAL of kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System by **Promega Corporation**, outubro de 2012.
75. TORRICO F.; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, M.C.; DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y.; Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 70 n. 2, p. 201- 209, 2004.
76. VINHAES, M. C., DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 7-12, 2000.
77. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Consultation on International Biological reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests**. Geneva, 2007.
-

78. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of Chagas Disease**. Geneva, *Technical Report Series*, n. 905, 96 p., 2002.
79. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly epidemiological record Relevé** Geneva, 2012.
80. YOSHIDA, N., TYLER, K.M., LLEWELLYN, M.S., Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends en Parasitology**, v. 27, n. 10, 2011.