



Universidade Federal do Triângulo Mineiro

"ESTUDO COMPARATIVO DO PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS
C57BL/6 EM DIFERENTES MOMENTOS DE INFECÇÃO COM
TRYPANOSOMA CRUZI"

Cesar Augusto França Abrahão

Orientador: Dr. Javier Emilio Lazo Chica

Uberaba-MG

2017

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Cesar Augusto França Abrahão

"ESTUDO COMPARATIVO DO PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS
C57BL/6 EM DIFERENTES MOMENTOS DE INFECÇÃO COM
TRYPANOSOMA CRUZI"

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração "Patologia Básica e Experimental" da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Javier Emilio Lazo Chica

Uberaba-MG

Agosto - 2017

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

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.

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

A139e Abrahão, Cesar Augusto França
Estudo comparativo do pâncreas de camundongos C57BL/6 em diferentes momentos de infecção com *Trypanosoma cruzi* / Cesar Augusto França Abrahão. -- 2017.
100 f. il. : fig., graf.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientador: Dr. Javier Emílio Lazo Chica

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Cepa Y. 4. Glicemia. 5. Pâncreas. I. Lazo Chica, Javier Emílio. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.937

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado no Laboratório e Setor de Morfometria da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM, com o apoio financeiro do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFTM e das seguintes instituições: CAPES-PNPD, CAPES, FUNEPU, FAPEMIG e Bolsa REUNI-CAPES.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Dedicatória

*Dedico este trabalho à **minha esposa, Virgínia Massa Abrahão**, sabendo que não importa os desvios durante, ou parte da jornada, o importante é a segurança e os caminhos que me levem até você. Obrigado por me esclarecer que temos que guardar as certezas advindas pelas próprias dificuldades já superadas.*

*Ao **Valtercides Massa e a Flora Massa** pelo acolhimento, suporte, carinho e respeito ao longo desses anos.*

*A minha querida **vozinha Maria Dalva**, pelo convívio salutar, grande aprendizado no exercício da inteligência emocional e no desprendimento em sempre estar pronta para servir o próximo. Agora compreendo que... “algumas pessoas resmungam por que as rosas têm espinhos. Eu sou grato pelo fato de os espinhos terem rosas.”*

Alphonse Karr (1808-1890).

*Aos **tios Sérgio França e família, Odilon França e família** pelo suporte familiar e pelos longos momentos de diálogos regados a humildes posicionamentos de fé em prol de sustentar a unidade familiar e de superação.*

*Aos **meus pais, Silvania e Osvaldo**, pelo exemplo de trabalho, por me ensinarem que o engrandecimento moral está na aplicação do esforço enraizado no vigor do pensamento e da vontade.*

*À minha irmã querida, **Andreza Maita** e ao meu cunhado **Guilherme Borges**, pelas manifestações de alegria e amor.*

*Aos **meus avôs Adelina e Osvaldo**, pelo apoio, exemplo de fé, disciplina e cumplicidade.*

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Agradecimentos

Ao **meu orientador Profº Dr. Javier Emilio Lazo Chica**, pelo exemplo de postura científica, pela contribuição valiosa em minha formação pessoal, acadêmica e científica.

À **Drª. Aline da Silva Almeida**, pela competência, dedicação, amizade e inestimável ajuda ao longo dessa fase de minha carreira como pós-graduando.

Ao aluno de iniciação científica **Wagner Tavares Gonçalves** pela parceria nos desenvolvimentos dos projetos, só tenho a agradecer por estar sempre motivado a novos desafios intelectuais e pela troca de conhecimentos.

Aos profissionais do laboratório **Júlio César Rodrigues Pereira, Claudiney de Freitas Alves** pelo suporte técnico no desenvolvimento e acompanhamento do trabalho, ao **João Batista Pereira** pelo cuidado em passar as orientações, dedicação, carinho e profissionalismo no preparo de minhas lâminas e nos momentos de auxílio em compartilhar sua experiência de vida.

Ao **Dr. João Saldanha** pelo apoio na análise histopatológica.

Aos amigos da pós-graduação e de laboratório **Camila Botelho e Wellington Francisco Rodrigues** pelo convívio saudável e conhecimentos compartilhados.

Ao mestrando **Marco Aurélio Leite** pelas discussões de cunho científico, troca de experiências acadêmicas e amizade.

Aos amigos e docentes **Drª Débora Tavares, Me. Flávio Rodrigues Oliveira, Me. Gisélia Castro, Dr. Marcos Vinícius, Maria Odete, Drª Marlene Antônia dos Reis, Dr. Miguel Bortolini, Me. Wener Barbosa**, obrigado pela parceria, por serem exemplos de professores engajados na missão de ensinar e por estarem sempre me incentivando.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

*A professora **Me. Luciana Teresinha da Silva** pelo apoio intelectual e ensinamentos compartilhados.*

*Aos secretários do curso de pós-graduação em Ciências da Saúde da UFTM, **Tuânia Alves e André Luis Rodrigues Costa** pelos esclarecimentos e auxílio durante a realização deste trabalho.*

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo esquemático experimental.....	30
Figura 2 – Gabinete para biotério (Biocel/ UFTM).....	30
Figura 3 – Desenho experimental e Processo de coleta sanguínea até separação do plasma.....	32
Figura 4 - Cortes histológicos do pâncreas para análise morfológica e imunohistoquímica.	35
Figura 5 - Análise morfológica do pâncreas.....	37
Figura 6 - Estratégia para mensuração da área de ilhotas pancreáticas	38
Figura 7 - Morfometria do infiltrado inflamatório pancreático.....	39
Figura 8 - Ninho de <i>T. cruzi</i> infectando células acinares do pâncreas (IHQ)	40
Figura 9 - Estratégia para quantificação de ninhos de amastigotas	40
Figura 10 - Variação de peso corporal	43
Figura 11 - Curva de sobrevivência.....	44
Figura 12 - Curva de parasitemia	45
Figura 13 - Parênquima pancreático dos grupos infectados	46
Figura 14 - Densidade parasitária referente à área (cm ²) e a presença de ninhos de <i>T. cruzi</i>	48
Figura 15 - Parênquima pancreático do grupo controle	49
Figura 16 - Percentual de infiltrado inflamatório pancreático.....	50
Figura 17 - Morfometria do infiltrado inflamatório pancreático.....	51
Figura 18 - Área das ilhotas pancreáticas	52
Figura 19 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 7 pós-infecção.....	53
Figura 20 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 14 pós-infecção.....	54
Figura 21 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 21 pós-infecção.....	55
Figura 22 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 28 pós-infecção.....	56
Figura 23 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 90 pós-infecção.....	57
Figura 24 - Dosagem de insulina plasmática.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA** – Bovine Serum Albumin
CD-1 - Cluster of differentiation 1
CD4+ - Cluster of Differentiation 4
CD8+ - Cluster of Differentiation 8
CEUA - Comissão de Ética em Uso de Animais
DAB – Diaminobenzidina
DC – Doença de Chagas
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
GC - Grupos Controle
GI - Grupo de Infectados
GPI – Glicosilfosfatidilinositol
HE - Hematoxilina/Eosina
IP – Ilhotas pancreáticas
IFN- γ – Interferon γ
IHQ - Imunohistoquímica
ITT - Teste de Tolerância à Insulina
LPG – Lipofosfoglicano
LPS – Lipopolissacarídeo
MyD88 – Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88
NK – Natural Killer
NO – Óxido Nítrico
OGTT - Teste Oral de Tolerância à Glicose
PBS - Solução de fosfato tamponada
PP - Polipeptídeo Pancreático
TITG - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*
Th1 – linfócito T Helper tipo 1
TITG – Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
TLR - Toll-like receptor
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

SUMÁRIO

Lista de figuras	VIII
Lista de abreviaturas e siglas	IX
Sumário	X
Resumo	XII
Abstract	XIII
1 Introdução	14
1.1 Histórico e situação atual	14
1.2 Transmissão	15
1.3 Ciclo de vida, Resposta Imune e fisiopatogenia	16
1.4 Pâncreas e Doença de Chagas	23
2 HIPÓTESE	27
3 Objetivo Geral	28
3.1 Objetivos Específicos	28
4 Materiais e Métodos	29
4.1 Animais	29
4.2 Eutanásia, exames sanguíneos e coleta de materiais biológicos	31
4.3 Curvas de Mortalidade, Parasitemia e Massa dos Animais	32
4.4 Exames laboratoriais	33
4.4.1 Determinações dos níveis plasmáticos de insulina	33
4.4.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)	33
4.5 Análises histopatológicas	34
4.5.1 Preparo dos tecidos para os cortes histológicos	34
4.5.2 Detecção de antígenos de Trypanosoma cruzi no pâncreas	35
4.5.3 Análise morfométrica	36
4.5.4 Mensurações da área das ilhotas pancreáticas	37
4.5.5 Quantificação da área de infiltrado inflamatório pancreático	38
4.5.6 Quantificação de ninhos de T. cruzi	39
4.6 Análise estatística	41

Sumário

4.8	Normas Adotadas.....	42
5	Resultados	43
5.1	Controle e comportamento da massa corporal.....	43
5.2	Curvas de sobrevivência	44
5.3	Curvas de parasitemia.....	44
5.4	Densidade parasitária.....	45
5.5	Quantificação do infiltrado inflamatório.....	48
5.6	Mensuração das ilhotas pancreáticas	51
5.7	Testes intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG).....	52
5.8	Teste de insulina plasmática	57
6	Discussão	59
7	Conclusões	66
8	Referências.....	69

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

1 **RESUMO**

2 A Tripanossomíase americana, ou mais comumente conhecida, doença de Chagas
3 (DC), é atualmente uma das mais importantes antroponose endêmica. É
4 causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). *T. cruzi* pode ser encontrado
5 em diferentes locais dentro do hospedeiro vertebrado. As formas tripomastigotas
6 sanguíneas predominam na fase aguda, bem como a infecção por amastigotas de
7 praticamente todos os órgãos e sistemas. A carga parasitária é um fator importante
8 que influencia o progresso do estágio agudo e, conseqüentemente, a doença, e está
9 ligada a alterações cardíacas, intestinais e renais. A diabetes e a doença de Chagas
10 foram relatadas em estudos anteriores, mas as alterações pancreáticas na doença
11 de Chagas foram pouco estudadas e focadas em estudos funcionais de metabolismo
12 de carboidratos e pâncreas exócrino, principalmente nas formas indeterminada e
13 crítica da doença. Aqui estabelecemos infecção chagásica aguda e crônica em
14 camundongos C57BL/6 machos com cepa Y e parasitemia de acesso, infiltrado
15 inflamatório pancreático, mortalidade e histopatologia pancreática, morfometria e
16 funcionalidade com TITG e quantificação de insulina plasmática. A infecção por *T.*
17 *cruzi* leva ao parasitismo e conseqüentes alterações morfológicas e funcionais no
18 pâncreas, de um modo dependente do inóculo. Alta carga parasitária induz a uma
19 infecção aguda com alta parasitemia, mortalidade e menor parasitismo tecidual, com
20 ligeiras alterações pancreáticas (estruturais e funcionais). A menor carga parasitária
21 acarreta parasitismo pancreático acentuado, com intenso infiltrado inflamatório
22 associado, área das ilhotas pancreáticas, associada a menor insulina plasmática e
23 glicemia. Em camundongos na fase crônica com diferentes inóculos manteve-se de
24 forma semelhante o parasitismo e a inflamação pancreática e menor insulina
25 plasmática. Essas diferentes alterações pancreáticas em relação às diferentes
26 cargas parasitárias podem ser partes importantes no amplo enigma de variações
27 clínicas e metabólicas associadas à doença de Chagas.

28
29 Palavras-chave: Doença de Chagas; Pâncreas; Cepa Y; Glicemia; *Trypanosoma*
30 *cruzi*

ABSTRACT

1
2 American Trypanosomiasis, or more commonly known, Chagas Disease (CD), is
3 currently one of the most important endemic anthroponosis. It is caused by the
4 *Trypanosoma cruzi* protozoan (*T. cruzi*). *T. cruzi* can be found in different sites inside
5 the vertebrate host; the blood trypomastigote forms predominate in the acute stage,
6 as well as the amastigote infection is present all organ and systems. The parasite
7 load is an important factor that influences the progress of the acute stage, and
8 consequently, the disease, and are linked to heart, intestinal and kidney changes.
9 Diabetes and Chagas disease was related in previous studies, but pancreatic
10 changes in Chagas Disease were little studied and focused in functional studies of
11 carbohydrate metabolism and exocrine pancreas, mainly in the indeterminate and
12 critical forms of the disease. Here we did establish acute and chronic chagasic
13 infection in male C57BL/6 mice with Y strain and access parasitaemia, pancreatic
14 inflammatory infiltrate, mortality and pancreatic histopathology, morphometry and
15 functionality with Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (TITG) and plasma insulin
16 quantification. *Trypanosoma cruzi* infection leads to parasitism, and consequent
17 morphological and functional changes in the pancreas, in an inoculum dependent
18 way. High parasite load leads to an aggressive acute infection with high parasitemia,
19 mortality and smaller tissue parasitism, with slight pancreatic changes (structural and
20 functional). Lower parasite load leads to marked pancreatic parasitism, with intense
21 associated inflammatory infiltrate, reduction of the pancreatic islet area, associated
22 with lower plasma insulin and glycemia. At chronic phase mice with different inocula
23 similarly maintained the parasitism and the pancreatic inflammation and lower
24 plasma insulin. These different pancreatic changes in relation to different parasite
25 loads can be important parts in the wide variation puzzle of clinical and metabolic
26 changes that are associated with Chagas Disease.

27

28 Keywords: Chagas Disease; Pancreas; Y strain; Glycemia; *Trypanosoma cruzi*

1 1 INTRODUÇÃO

2 1.1 HISTÓRICO E SITUAÇÃO ATUAL

3 A Tripanossomíase americana, ou como é mais conhecida doença de Chagas
4 (DC), é uma das antropozoonoses endêmicas mais importantes da atualidade (Rassi
5 e Marin-Neto, 2010). É causada por protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)
6 (Chagas, 1909), e sua distribuição geográfica da infecção chagásica, incluindo os
7 seus reservatórios e seus vetores, estendem-se desde o sul dos Estados Unidos até
8 o sul da Argentina e Chile, afetando cerca de 7 milhões de pessoas e com outras 25
9 milhões em risco de infecção (Who, W. H. O., 2015).

10 Em um feito ainda inigualado na medicina, Carlos Chagas identificou o agente
11 etiológico, o vetor e descreveu o quadro clínico e as principais formas da doença
12 que seria batizada com seu nome (Chagas, 1909). De forma interessante,
13 evidências paleoparasitológicas indicam que *T. cruzi* está presente parasitando o ser
14 humano há milhares de anos, como em múmias no Chile (Ferreira *et al.*, 2000;
15 Moncayo e Ortiz Yanine, 2006).

16 Diversos fatores se apresentam como condicionantes para a transmissão da
17 doença de Chagas, como migrações humanas não controladas, baixa condição
18 sócio-econômica e degradação ambiental (Pinto Dias, 2013; Coura *et al.*, 2014). Até
19 este momento, a globalização contribuiu para identificação de casos em países não
20 endêmicos, como na Europa, América do Norte, Ásia e Oceania. Além dos
21 processos migratórios, a melhora nos testes e exames de triagem apenas
22 recentemente instalados nessas regiões também contribuíram para um maior
23 número de diagnósticos (Riera *et al.*, 2006; Bern *et al.*, 2007; Buekens *et al.*, 2008;
24 Dias *et al.*, 2008). Segundo o último consenso brasileiro em Doença de Chagas, no

Introdução

1 período de 2000 a 2013 foram notificados 1.570 casos de doença de Chagas aguda,
2 oriundos de registros da maioria dos estados brasileiros, com a exceção do Mato
3 Grosso do Sul, Distrito Federal e Paraná. A maioria destes casos (1.430, 91,1%)
4 concentrava-se na região Norte, seguida pelas regiões Nordeste (73, 4,7%), Sul (28,
5 0,2%), Centro-Oeste (27, 1,8%) e Sudeste (12, 0,8%). Ressalta-se que o Estado do
6 Pará foi responsável por 75% de todos os casos no país e por 82% dos casos da
7 região Norte (Saúde, 2015; Dias *et al.*, 2016).

8

9 1.2 TRANSMISSÃO

10 Classicamente, as formas de transmissão da doença de Chagas envolvem as
11 vias: vetorial, transfusional, transplacentária ou oral. A transmissão também pode ser
12 por mecanismos menos comuns, que envolvem acidentes de laboratório, manejo de
13 animais infectados e transplante de órgãos sólidos (Sánchez-Guillén *et al.*, 2002;
14 Moncayo e Ortiz Yanine, 2006; Gascon *et al.*, 2010). Em relação à via vetorial, *T.*
15 *cruzi* é transmitido pelos insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como
16 barbeiros. Dentre as mais de 100 espécies de triatomíneos presentes nas américas,
17 a maioria destas sendo importante apenas no ciclo silvestre da doença de Chagas,
18 uma pequena parcela infesta casas e desta forma são importantes no ciclo
19 doméstico de *T. cruzi*. Destes, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* são dois dos
20 principais vetores (Kollien e Schaub, 2000).

21 No Brasil a principal forma de transmissão durante várias décadas foi a
22 vetorial, com o *Triatoma infestans* figurando como a principal espécie (Coura e Dias,
23 2009). Contudo, nos últimos anos, a forma prevalente no último reporte oficial foi
24 peça via oral (1.081, 68,9%), seguida pela transmissão vetorial em 100 casos (6,4%)
25 (Saúde, 2015). Cabe ressaltar que a Organização Mundial de Saúde acredita que

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Introdução

1 possa haver uma subnotificação dos casos com transmissão vetorial, devido
2 especialmente à sua ocorrência em regiões com sistemas de saúde precários. Por
3 exemplo, em 372 (23,7%) casos notificados não foi identificada a forma de
4 transmissão, sendo 93,0% (306 casos) destes somente do Estado do Pará (Saúde,
5 2015; Who, 2015).

6

7 1.3 CICLO DE VIDA, RESPOSTA IMUNE E FISIOPATOGENIA

8 O ciclo de vida de *T. cruzi* é baseado em seu desenvolvimento em um
9 hospedeiro vertebrado e em um hospedeiro invertebrado. De forma geral, a partir de
10 um hospedeiro infectado os insetos triatomíneos ingerem os parasitos, que se
11 desenvolvem em seu trato digestivo e são eliminados nas fezes durante ou após o
12 repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado. Após entrar em contato com este
13 hospedeiro, *T. cruzi* invade células e se replica no interior destas, levando à lise das
14 células infectadas, liberação na corrente sanguínea e invasão de novas células,
15 podendo ainda infectar um novo inseto vetor (Chagas, 1909; Brener, 1973; Brener *et*
16 *al.*, 2000).

17 Durante este ciclo de vida, *T. cruzi* desenvolve três formas morfológica e
18 funcionalmente distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Estas formas se
19 diferem não somente pelo hospedeiro onde são encontradas, mas também por sua
20 capacidade de invadir células, se desenvolver em meio intracelular e terem
21 mecanismos de resistência e suscetibilidade diferentes aos mecanismos
22 imunológicos dos hospedeiros vertebrados e triatomíneos. A forma tripomastigota
23 metacíclica está presente no intestino posterior do triatomíneo, na corrente
24 sanguínea do hospedeiro vertebrado e dentro das células parasitadas, nos
25 momentos iniciais pós infecção e imediatamente antes da lise destas células: a

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Introdução

1 forma amastigota, encontrada no interior das células dos hospedeiros mamíferos e
2 possivelmente também no sangue; e a forma epimastigota, encontrada no tubo
3 digestivo do inseto vetor e também na maior parte das culturas axênicas (Brener,
4 1973; Brener *et al.*, 2000; Kollien e Schaub, 2000; Rassi e Marin-Neto, 2010).

5 A forma tripomastigota sanguínea tem capacidade de invadir, ativa ou
6 passivamente, qualquer célula do organismo, se diferenciando em forma amastigota
7 intracelular, encurtando seu flagelo e incorporando-o ao seu corpo. Estas formas são
8 capazes de destruir a membrana do vacúolo parasitóforo, ficando livre no
9 citoplasma, iniciando uma fase de divisão binária que ocorre por vários dias,
10 dependendo da cepa de *T. cruzi* (Brener, 1973; Burleigh e Andrews, 1995). Após
11 este período se inicia um processo de diferenciação de amastigotas em
12 tripomastigotas sanguíneas, que sob esta forma, rompem a célula hospedeira,
13 invadem as células vizinhas ou caem na corrente circulatória dando início ao novo
14 ciclo (Brener, 1973; Brener *et al.*, 2000; Kollien e Schaub, 2000; Rassi e Marin-Neto,
15 2010). Conforme podemos observar, *T. cruzi*, *in vivo* e *in vitro*, replica-se de forma
16 intracelular, sendo que, uma vez no hospedeiro, pode infectar várias células
17 nucleadas. É, desta forma, um parasito intracelular importante e bem sucedido,
18 devido a sua virulência e capacidade de infectar vários tipos celulares (Reed, 1998).

19 Em todas essas fases da infecção com *T. cruzi* o sistema imune tem
20 participação crucial, sendo desencadeados diversos mecanismos imunológicos que
21 vão atuar na tentativa de eliminar ou conter a infecção. A resposta imune na doença
22 de Chagas ocorre principalmente em três níveis: detecção e destruição dos
23 parasitos diretamente, particularmente por macrófagos e células dendríticas;
24 ativação de células dendríticas e macrófagos no intuito de potencializar suas
25 funções como apresentadores de antígenos, e desta forma, direcionar uma resposta

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Introdução

1 imune adaptativa eficiente; e por último, monitorando a infecção de células não-
2 fagocíticas, como por exemplo, cardiomiócitos, neurônios e ilhotas pancreáticas
3 (Reed, 1998; Nardy *et al.*, 2015).

4 De modo geral, a imunidade inata fornece a primeira linha de defesa contra
5 agentes agressores, como por exemplo, *T. cruzi*, utilizando-se de diversos
6 receptores, como os *Toll-like receptors* (TLR). Estes reconhecem padrões
7 microbianos, como LPS, LPG, flagelina, entre outros, sendo que a estimulação da
8 maioria de TLRs condiciona células dendríticas a atuar na diferenciação de linfócitos
9 T auxiliares, com prevalência de Th1 na doença de Chagas (Schnare *et al.*, 2001).
10 Ilustrando essa importância, camundongos deficientes do principal sinalizador de
11 TLR, MyD88, tem deficiência na produção de citocinas inflamatórias, junto com
12 parasitemia e a mortalidade aumentadas (Campos e Gazzinelli, 2004).

13 Outros papéis importantes da imunidade inata na doença de Chagas seriam a
14 ativação de outros componentes desta imunidade, como células *Natural killer* (NK)
15 (Hatcher *et al.*, 1981), macrófagos (Ortiz-Ortiz *et al.*, 1976), e ativação secundária
16 policlonal de células T, com aumento de moléculas pró-inflamatório, pelo menos nos
17 eventos iniciais da infecção, por *T. cruzi* (Huang *et al.*, 2000; Ropert *et al.*, 2001;
18 Huang *et al.*, 2003; Petersen e Burleigh, 2003; Ropert *et al.*, 2003).

19 Além de células da imunidade inata, células não imunes alvos da infecção
20 pelo *T. cruzi*, como os cardiomiócitos são ativadas em um padrão inflamatório
21 durante a infecção por *T. cruzi*, produzindo mediadores como citocinas, quimiocinas
22 e intermediários de oxigênio e nitrogênio, resultando em aumento da inflamação
23 tecidual (Teixeira *et al.*, 2002). Embora este efeito esteja mais claramente
24 caracterizado no tecido cardíaco, no parasitismo de outros sítios, como as ilhotas
25 pancreáticas, é razoável esperar um fenômeno parecido, e os dados deste e de

Introdução

1 outros trabalhos fortalecem este conceito. Neste contexto, diversas moléculas do
2 parasito parecem ter papel na ativação desta inflamação, destacando-se âncoras-
3 GPI, glicoproteínas e mucinas relacionadas à GPI, trans-sialidades, além do próprio
4 DNA do parasito (Almeida *et al.*, 1999; Procopio *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2000).

5 As células T compreendem a grande maioria das células no infiltrado
6 inflamatório de pacientes chagásicos e são provavelmente principais controladoras
7 da reatividade imune nesta doença (Reis *et al.*, 1993). No que diz respeito à ativação
8 de célula T paciente chagásico crônico, mostrou-se que indivíduos com a forma
9 indeterminada ou severa da doença de Chagas tem uma alta frequência de
10 circulação de células T CD4+ e T CD8+ (Dutra *et al.*, 1996), além de T CD8+ no
11 infiltrado inflamatório das lesões (Reis *et al.*, 1993).

12 Ainda, evidências pioneiras já apontavam uma resposta predominantemente
13 do tipo Th1 como determinante da resistência à infecção, representado
14 principalmente pelas citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α , ativadores de
15 macrófagos e desencadeantes de produção elevada de agentes antimicrobicidas
16 como o óxido nítrico (NO) e as espécies reativas do oxigênio, demonstrando o papel
17 crucial deste eixo de resposta imune (Silva *et al.*, 2003; Mantovani *et al.*, 2004).

18 Após a infecção e o desencadeamento das respostas imunes iniciais, que
19 culminam com controle inicial da parasitemia e do parasitismo tecidual, a miocardite,
20 bem como a ativação policlonal de linfócitos, são atenuados durante a fase crônica
21 da doença. Mecanismos imunorreguladores entram em cena, controlando atividade
22 do sistema imune, fator necessário para prevenção dos aspectos deletérios da
23 estimulação imunológica excessiva (Hunter *et al.*, 1997). Neste contexto,
24 mediadores imunorregulatórios, como citocinas e outros mediadores (Pinge-Filho *et*
25 *al.*, 1999), ou indução de apoptose de células B e T (Lopes *et al.*, 1995; Lopes e

Introdução

1 Dosreis, 1995; Freire-De-Lima *et al.*, 2000; Zuniga *et al.*, 2002) tem papel relevante
2 no controle da exacerbação da resposta imune e a passagem da fase aguda para a
3 fase crônica da infecção.

4 De fato, citocinas imunorregulatórias, como TGF- β e IL-10, têm importante
5 papel no controle da resposta imune durante a infecção com *T. cruzi* e modelos
6 experimentais reforçam a importância destas citocinas, com camundongos
7 deficientes de IL-10 exibindo forte resposta inflamatória e embora controlem bem o
8 parasitismo, sucumbem perante uma resposta inflamatória exacerbada (Hunter *et*
9 *al.*, 1997). Outra evidência importante é a demonstração de que expressão
10 aumentada de mRNA de IL-10 já é observada 15 dias após a infecção, sugerindo
11 sua participação desde os eventos iniciais da doença (Golgher e Gazzinelli, 2004).

12 Um importante aspecto a ser considerado nesse contexto de
13 imunorregulação como controle de danos derivados da inflamação é sua utilização
14 pelo parasito para estabelecer uma infecção de longo prazo, tanto nos sítios
15 clássicos de desenvolvimento de lesão, como o coração, ou outros menos
16 estudados, como rins, intestino, cérebro, sistema fagocítico mononuclear e
17 pâncreas. (Silva *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992; Golgher e Gazzinelli, 2004).

18 Tomando todos estes conceitos em conjunto, podemos resumir que a fase
19 aguda da doença de Chagas apresenta alta parasitemia inicial, ativação de múltiplos
20 componentes do sistema imune, com intensos processos inflamatórios associados
21 ao parasitismo e que culminam com desenvolvimento de resposta imune específica,
22 polarização especialmente do tipo Th1, controle da infecção sistêmica e do
23 parasitismo tecidual, contudo sem levar à esterilidade (Fragata Filho *et al.*, 1995;
24 Rassi *et al.*, 2010). A todos esses eventos iniciais segue uma fase crônica da
25 infecção, mantida com três características básicas: parasitemia baixa ou

Introdução

1 indetectável, parasitismo tecidual e altos níveis de anticorpos específicos e
2 inespecíficos (Fragata Filho *et al.*, 1995; Rassi *et al.*, 2010). De forma extremamente
3 interessante, o prognóstico é deveras imprevisível, com apenas algumas
4 características comuns, em humanos: uma longa fase dita indeterminada, as quais
5 manifestações clínicas são mais suaves, embora progressivas, ou formas
6 determinadas, especialmente com sintomas cardíacos e gastrointestinais (Rassi *et*
7 *al.*, 2010).

8 Este período de “latência” da infecção pode perdurar por toda a vida do
9 hospedeiro. Porém, em uma parcela dos indivíduos este equilíbrio é quebrado e as
10 manifestações clínicas da doença se manifestam. A exata relação parasito
11 hospedeiro envolvida neste desequilíbrio ainda é muito controversa, com as teorias
12 fundamentadas principalmente em três hipóteses: dano direto pelo parasito,
13 autoimunidade e suscetibilidade genética do hospedeiro.

14 Primeiramente, a patologia seria devido a uma ruptura da célula parasitada e
15 liberação dos antígenos do parasito, afetando o tecido e direcionando uma
16 inflamação crônica. Contudo, esta teoria esbarrava na ausência de demonstração de
17 parasitos nos tecidos de cerca de 80% dos indivíduos já com a patologia
18 desenvolvida (Teixeira *et al.*, 2006). De fato, as manifestações crônicas da doença
19 de Chagas não estão relacionadas com severa parasitemia, pelo contrário, esta é
20 praticamente ausente na fase crônica da doença (Teixeira *et al.*, 2006). Esta
21 dificuldade foi resolvida com o advento de testes imunológicos e, em especial
22 moleculares, que demonstraram a presença de kDNA de *T. cruzi* nos tecidos de
23 indivíduos chagásicos (Zhang e Tarleton, 1999), embora esse não seja indicativo de
24 infecção ativa com *T. cruzi* (Lauria-Pires *et al.*, 2000).

Introdução

1 Ainda, nas últimas décadas, a autoimunidade tem sido considerada um
2 importante aspecto na patogenia da doença de Chagas, recebendo atenção e
3 suporte substanciais (Girones e Fresno, 2003). Dados experimentais têm
4 demonstrado que a autoimunidade é um importante componente da patogênese da
5 Doença de Chagas (Levitus *et al.*, 1991; Abel *et al.*, 1997; Correa-Oliveira *et al.*,
6 1999; Dutra *et al.*, 2000; Dutra *et al.*, 2005). É atualmente aceito que resposta
7 antiparasitas e autoreativas não são mutuamente exclusivas na doença de Chagas e
8 que as combinações destes tipos de resposta imune podem estar envolvidas no
9 estabelecimento da patologia (Dutra *et al.*, 2005). Ainda, fatores genéticos do
10 parasita e hospedeiro também podem influenciar o resultado da infecção
11 (Kierszenbaum, 2003).

12 A grande maioria dos dados ao longo dos anos aponta que, no Brasil, a forma
13 cardíaca é a mais frequente, acometendo cerca de 30% dos pacientes com doença
14 de Chagas (Rassi *et al.*, 2000; Coura, 2007; Pinto Dias, 2013; Saúde, 2015). Devido
15 à isso grande parte do conhecimento acerca dos mecanismos que levam as
16 alterações na doença de Chagas está contextualizado no tecido cardíaco, podendo
17 em grande medida ser transposto a demais tecidos parasitados.

18 Dentre todos os mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da forma cardíaca
19 da Doença de Chagas, é relativamente consensual que a miocardite, tanto na fase
20 aguda quanto crônica (Brener *et al.*, 2000), é o componente principal para
21 desencadear as repercussões funcionais observadas, como a cardiomegalia,
22 insuficiência cardíaca congestiva e arritmias (Bilate e Cunha-Neto, 2008; Gutierrez *et*
23 *al.*, 2009). A reação inflamatória frente aos parasitas que colonizam estes órgãos é
24 amplamente suportada por estudos como fator crucial para as manifestações da
25 doença de Chagas. Nesta perspectiva, as lesões crônicas seriam geradas por uma

Introdução

1 contínua destruição do tecido infectado através de uma resposta inflamatória
2 induzida por *T. cruzi* e mediada por clones linfocitários específicos para o parasita
3 (Zhang e Tarleton, 1999).

4

5 Embora cada vez mais estudos confirmem esses dados, desde os estudos
6 pioneiros no início do século passado autores já apontavam para o fato de o
7 infiltrado inflamatório parecer mais lesivo para as células cardíacas do que no
8 controle parasitário (Viana, 1911). Esta miocardite é caracterizada
9 fundamentalmente por um infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras
10 miocárdicas no foco inflamatório, áreas de fibrose e raros parasitos nas lesões
11 (Brener *et al.*, 2000). Ocorre destruição de células cardíacas mediadas por
12 mecanismos estabelecidos logo no início da infecção e perpetuados pela contínua
13 estimulação antigênica durante o curso da doença (Santos-Buch e Teixeira, 1974).

14 Esta característica dinâmica do processo inflamatório nos tecidos parasitados
15 leva, comumente ao reparo via fibrose (Andrade *et al.*, 2000), com todos os padrões
16 de fibrose descritos (focal, difuso, intersticial, perivascular e plexiforme), até mesmo
17 em um mesmo corte histológico, sendo fator decisivo no mecanismo de insuficiência
18 cardíaca (Ju e Dixon, 1996). De fato, mesmo pacientes crônicos assintomáticos
19 apresentam lesões avançadas de inflamação e fibrose (Pereira e Coura, 1986),
20 reduzida experimentalmente com tratamento antiparasitário (Andrade *et al.*, 1991).

21

22 1.4 PÂNCREAS E DOENÇA DE CHAGAS

23 *T. cruzi* pode ser encontrado em diferentes sítios no hospedeiro vertebrado,
24 predominando na fase aguda os tripomastigotas sanguíneos e a infecção por
25 amastigotas de órgãos e sistemas como o músculo cardíaco, músculos esqueléticos

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Introdução

1 e lisos, células sanguíneas e do sistema fagocítico mononuclear (inclusive em
2 linfonodos, baço e fígado), supra-renal, sistema nervoso, ovários, testículos, pele,
3 tecido subcutâneo e pâncreas, cuja fibrose e atrofia foram descritas em 26,6% dos
4 chagásicos portadores de megaesôfago e megacólon, incluindo alterações
5 funcionais como hiperglicemia e amilasemia (Vieira e Hadler, 1961).

6 Alterações pancreáticas na doença de Chagas foram pouco estudadas e
7 focadas em estudos funcionais do metabolismo dos carboidratos e do pâncreas
8 exócrino principalmente nas formas indeterminada e crônica da doença. Estes
9 trabalhos demonstraram níveis diminuídos de glucagon e polipeptídeo pancreático
10 (PP) em pacientes com megacolon grave em comparação com grupo controle sem
11 doença após infusão de insulina (Long, R. *et al.*, 1980; Long, R. G. *et al.*, 1980).

12 Alterações pancreáticas podem ser decorrentes de alterações difusas da
13 inervação neste órgão, particularmente do sistema parassimpático afetando células
14 α , β e PP; ou alterações do componente simpático do sistema nervoso autonômico;
15 lesão de gânglios intrapancreáticos; lesão direta das células β pelos parasitas ou
16 pelo processo inflamatório e alterações do eixo êntero-pancreático (Mott *et al.*, 1989;
17 Guariento *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 1993; Dos Santos *et al.*, 1998; Silva *et al.*,
18 2012).

19 O processo inflamatório na fase crônica e na fase aguda também foi relatado
20 em alguns trabalhos que demonstraram grande infiltrado celular, atrofia e fibrose na
21 porção exócrina, endócrina e parênquima pancreático (Dos Santos *et al.*, 2004;
22 Coura, 2007), menor crescimento do pâncreas com aumento do índice glicêmico
23 (Albuquerque *et al.*, 1991), presença de desorganização e degeneração em algumas
24 áreas do pâncreas (Albuquerque *et al.*, 1991), desorganização causando alterações
25 nas ilhotas pancreáticas (IP), ductos inter e intralobulares; e a desorganização acinar

Introdução

1 (De Scorza *et al.*, 1995). Marinho e colaboradores (1999) mostram que a carga
2 parasitária é um relevante fator que influencia no curso da fase aguda e,
3 conseqüentemente, da fase crônica, juntamente com a resposta imune desenvolvida
4 pelo hospedeiro contra a infecção (Marinho *et al.*, 1999).

5 Com relação aos aspectos morfológicos e morfométricos de chagásicos
6 crônicos com a forma digestiva, Saldanha *et al.* (2001), encontraram aumento da
7 área e densidade de ilhotas pancreáticas na região da cauda do pâncreas (Saldanha
8 *et al.*, 2001), concordando com estudo anterior que demonstrou aumento das ilhotas
9 pancreáticas na doença de Chagas (Teixeira *et al.*, 1989).

10 Apesar de estudos observacionais em humanos apontarem a relação da
11 doença de Chagas com alterações pancreáticas, a maioria falha em monitorar como
12 o desenvolvimento da infecção, especialmente na fase aguda, mas também durante
13 o estabelecimento da fase crônica (Lana *et al.*, 1992; Ramirez *et al.*, 1994; Corbett *et*
14 *al.*, 2002a; Romanha *et al.*, 2010). Neste contexto, o camundongo é amplamente
15 utilizado, uma vez que a doença manifesta-se de forma semelhante à observada na
16 infecção em humanos, com uma fase aguda sintomática que evolui para a fase
17 crônica, infectando quase todos os tipos celulares, sendo de maior importância os da
18 musculatura cardíaca e da musculatura esquelética (Brener, 1973; Burleigh e
19 Andrews, 1995).

20 Neste trabalho, demonstramos a variação da curva parasitária entre os grupos
21 estudados, além das alterações na resposta imunitária, histopatológicas,
22 morfométricas e funcionais do pâncreas em ambas fases da infecção. O que
23 contribui para melhor compreensão das conseqüências de diferentes inóculos
24 parasitários para o hospedeiro, auxilia a esclarecer a gravidade e o prognóstico nas

Introdução

- 1 diferentes formas de infecção, além de contribuir para a criação de estratégias
- 2 terapêuticas e preventivas para a doença de Chagas.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

1 2 HIPÓTESE

- 2 A infecção em camundongos C57BL/6 por diferentes cargas parasitárias de *T.*
- 3 *cruzi* causa alterações funcionais e morfológicas em pâncreas de camundongos na
- 4 fase aguda e crônica da doença de Chagas experimental.

1 **3 OBJETIVO GERAL**

2

3 Analisar as ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6 infectados *T.*
4 *cruzi* cepa "Y", por meio do estudo bioquímico, histológico, imunohistoquímico e
5 morfométrico, durante a fase aguda e crônica da infecção experimental.

6 **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

7

- 8 I. Comparar o peso dos animais controles com o grupo dos animais infectados;
9 II. Avaliar a curva de sobrevivência ao longo da infecção;
10 III. Avaliar a parasitemia entre os grupos infectados;
11 IV. Detectar os antígenos de *T. cruzi* por Imunohistoquímica;
12 V. Analisar a densidade parasitária de ninhos de amastigotas de *T. cruzi* no
13 pâncreas.
14 VI. Quantificar o infiltrado inflamatório das ilhotas pancreáticas;
15 VII. Mensurar a média das áreas das ilhotas pancreáticas;
16 VIII. Avaliar a curva de tolerância à glicose;
17 IX. Dosar a insulina plasmática.

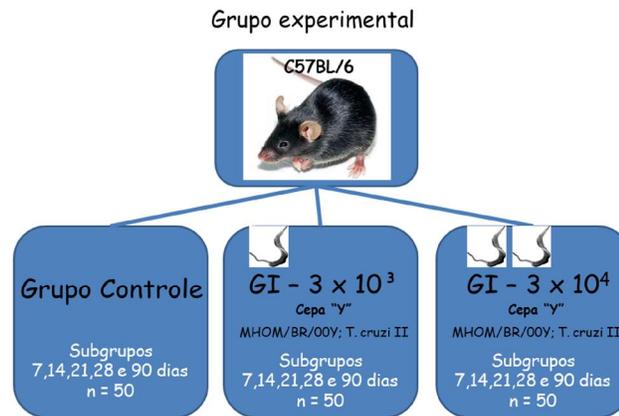
1 4 MATERIAIS E MÉTODOS

2

3 4.1 ANIMAIS

4 Foram utilizados 150 camundongos da linhagem C57Bl/6, isogênicos,
5 machos, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando entre 18 e 24 gramas. A escolha
6 desta linhagem decorreu da sua relativa resistência, permitindo uma melhor
7 sobrevivência e mesmo cronificação da infecção com relativa facilidade dependendo da
8 concentração do inóculo (ARAÚJO-JORGE 17 & CASTRO, 2000).

9 Foram constituídos grupos controle (GC) com 50 animais e dois grupos de
10 infectados (GI) com cepa "Y" MHOM/BR/00Y (*T. cruzi* II) com 50 animais cada. Os
11 animais, tanto no grupo controle quanto no grupo infectado, foram separados em
12 subgrupos de 5 animais para cada dia de eutanásia (7, 14, 21, 28 e 90 dias), assim
13 totalizando 10 animais por subgrupo, constituindo um n de 50 animais por grupo
14 conforme elucidado no modelo esquemático experimental da figura 1. Os animais
15 foram mantidos no Biotério da Disciplina de Biologia Celular da UFTM em gaiolas
16 plásticas contendo cama de maravalha esterilizada, de 414 mm x 344 mm, sendo
17 cinco animais por gaiola, em sala especial com renovação constante do ar, à
18 temperatura de 22° a 26°C, umidade relativa do ar entre 45 e 55% e ciclo noite/dia
19 de 12 horas. A alimentação foi feita com ração comercial de composição conhecida
20 (Nuvilab-CR-1, Nuvital Nutrientes Produtos Veterinários Ltda. Curitiba-PR.) e água
21 esterilizada oferecida *ad libitum*. A limpeza e desinfecção do biotério e das gaiolas
22 foram feitas semanalmente com solução clorada, sendo também realizada a troca da
23 cama de maravalha.



1

2 **Figura 1 - Modelo esquemático experimental.**

3

4 Todos os procedimentos com os animais seguiram as normas propostas pela
 5 Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (MEZADRI *et al.*, 2004;
 6 ANDERSEN *et al.*, 2004), conforme 2.

7



8

9 **Figura 2 – Gabinete para biotério (Biocel/ UFTM)**

10 Sala especial com renovação e controle constante do ar, temperatura, umidade e
 11 ciclo noite/dia de 12 horas.

12

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

1 4.2 EUTANÁSIA, EXAMES SANGUÍNEOS E COLETA DE MATERIAIS
2 BIOLÓGICOS

3 Após 7, 14, 21, 28 e 90 dias de infecção, foram realizadas as eutanásias e
4 necropsias dos animais infectados e dos controles. Para tal, foram heparinizados
5 com um volume de 15 µl/grama por animal, anestesiados e colhido o sangue do
6 plexo venoso oftálmico com o auxílio da pipeta Pasteur após 7, 14, 21, 28 e 90 dias
7 de infecção e dos controles durante o procedimento da eutanásia. O sangue
8 coletado foi centrifugado à 1831g por 10 minutos para separação do plasma e
9 guardado em freezer a - 20°C, Figura 3.

10 Em seguida os animais foram submetidos à necropsia sendo realizada incisão
11 mento-pubiana com subsequente exposição das cavidades torácica e abdominal. A
12 abertura da cavidade abdominal foi feita removendo-se pele e peritônio, expondo-se
13 as vísceras abdominais. O pâncreas foi retirado "*in totum*", distendido em papel de
14 filtro, pesado em balança de precisão e fixado em metacarn por 24 horas e depois
15 colocado em álcool 70% para a análise histopatológica e imunohistoquímica.
16 Terminadas as necropsias as carcaças dos animais foram armazenadas em formol a
17 10% durante 48 horas e, após este período foram descartadas no lixo hospitalar
18 (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2000).

19

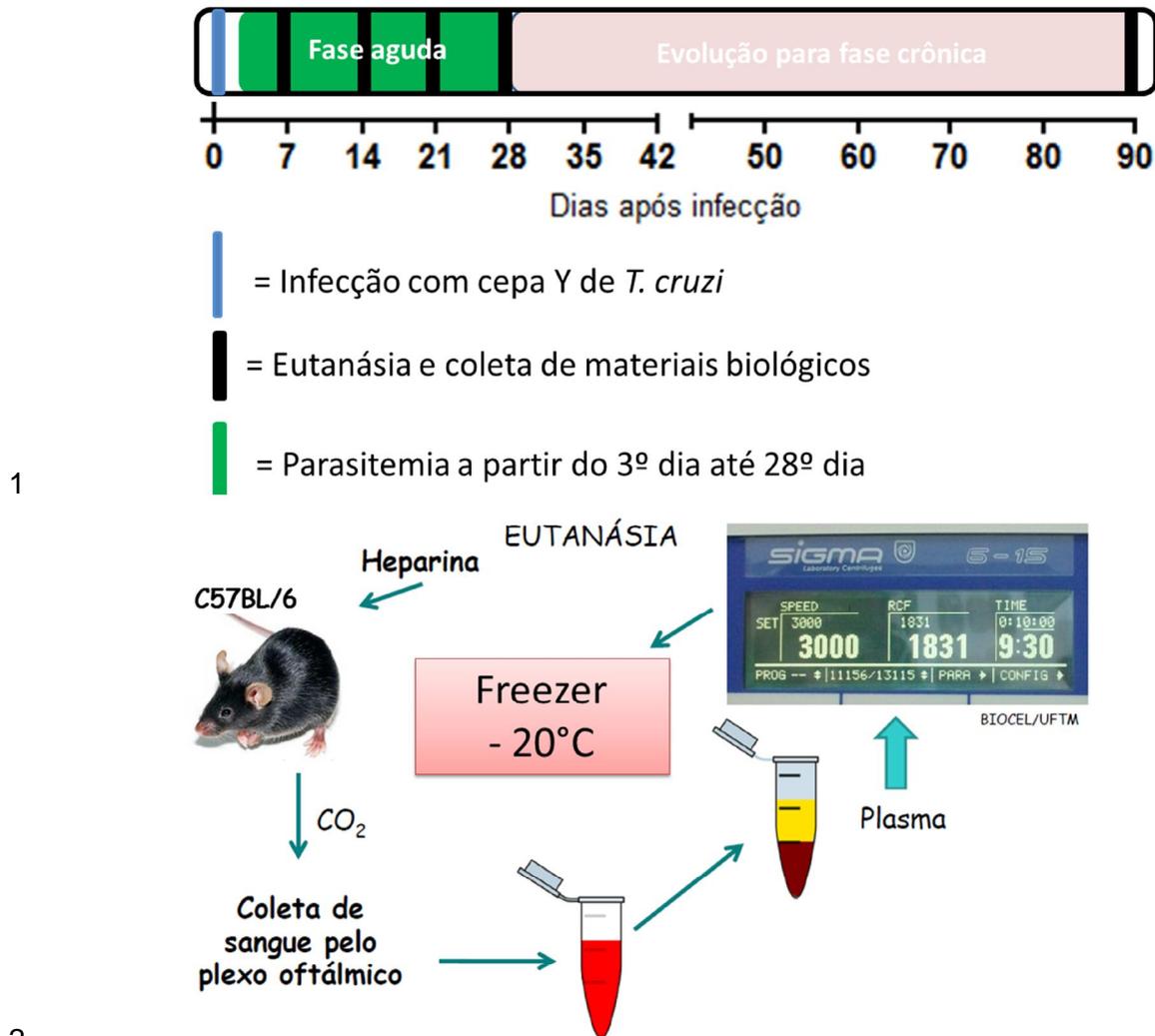


Figura 3 – Desenho experimental e Processo de coleta sanguínea até separação do plasma

4.3 CURVAS DE MORTALIDADE, PARASITEMIA E MASSA DOS ANIMAIS

O exame parasitológico sanguíneo (direto) dos animais infectados foi realizado a partir do terceiro dia de infecção diariamente até o vigésimo oitavo dia de infecção para construir a curva de parasitemia. O procedimento do exame parasitológico foi realizado conforme protocolo previamente estabelecido na literatura (ARAÚJO-JORGE & CASTRO, 2000).

1 Em ambos os grupos, os animais foram pesados diariamente em balança de
2 precisão (Indústria e Comércio eletroeletrônicos GEHAKA Ltda. Indústria brasileira)
3 para construir uma curva de ganho ou perda de peso. O resultado foi apresentado
4 calculando a percentagem de peso ganho ou perdido tomando como referência o
5 peso inicial do camundongo.

6 A curva de sobrevivência foi feita verificando-se diariamente a ocorrência de
7 óbito nos diferentes grupos até o nonagésimo dia.

8

9 4.4 EXAMES LABORATORIAIS

10 **4.4.1 Determinações dos níveis plasmáticos de insulina**

11 Os níveis de insulina foram determinados no plasma dos animais utilizando a
12 metodologia de imunoabsorção ligado à enzima com kit da marca Millipore (St.
13 Charles, Missouri- USA. Rat / Mouse Insulin ELISA Kit).

14

15 **4.4.2 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)**

16 Após jejum de 6 horas dos camundongos, os animais foram pesados e
17 realizados a primeira dosagem de glicemia em uma gota de sangue retirada da
18 extremidade da cauda pós corte cutâneo, utilizando o glicosímetro Accu-Chek
19 (Roche Diagnostics). Logo após foi administrado por via intraperitoneal uma solução
20 de glicose a 20%, na dose de 1g/Kg. A glicemia foi novamente mensurada aos 15,
21 30, 45, 60, 90 e 120 minutos pós-administração (MIZRACHI-BERNAL *et al.*, 2001).

22

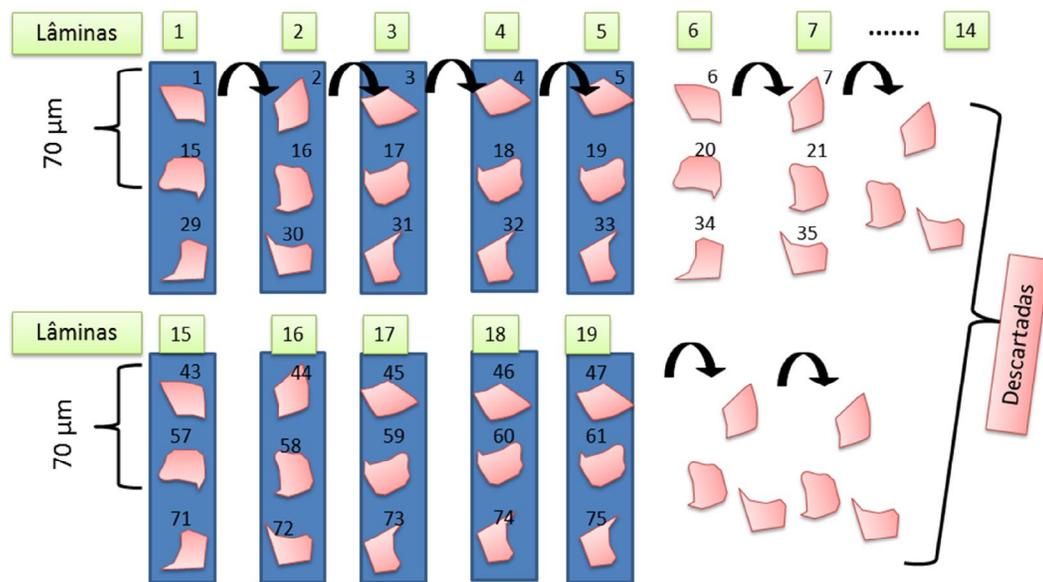
1 4.5 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

2 4.5.1 Preparo dos tecidos para os cortes histológicos

3 O pâncreas foi submetido aos processos de desidratação em uma série
4 crescente de álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em parafina para
5 microtomia de acordo com as práticas rotineiras do laboratório de histotecnologia.

6 A inclusão de cada fragmento foi feita posicionando seu eixo longitudinal
7 paralelo ao plano de microtomia. Os blocos de parafina com os fragmentos de
8 pâncreas foram cortados em micrótomo rotativo obtendo-se secções seriadas com 5
9 micrômetros (μm) de espessura. Os cortes seriados foram estendidos em lâminas de
10 vidro para microscopia previamente tratadas com adesivo (3
11 aminopropiltriétoxissilano, Sigma). Os cortes foram estendidos na parte superior das
12 lâminas até um total de 14. O procedimento se repetiu até completar 3 secções em
13 cada lâmina com intervalo de 70 μm entre as secções. Esta sequência se repetiu
14 mais cinco vezes totalizando 89 lâminas. O seriado total consistiu de 294 secções de
15 pâncreas. Foram avaliadas as cinco primeiras colunas de 7 lâminas com 3 secções
16 de cada sequência de 14 cortes, conforme Figura 4. Os cortes histológicos após
17 secagem em estufa a 60°C por um período de 24 horas foram corados pela técnica
18 de Hematoxilina/Eosina (HE) (Stevens, 1982) e pela técnica de imunohistoquímica
19 (IHQ) anti-*T. cruzi* (Da Silva *et al.*, 2016).

20



1

2

3 **Figura 4 - Cortes histológicos do pâncreas para análise morfométrica e**
 4 **imunohistoquímica.**

5 Secções histológicas com espessura de 5 µm.

6

7 4.5.2 Detecção de antígenos de *Trypanosoma cruzi* no pâncreas

8 A técnica imunohistoquímica (IHQ) para a detecção de ninhos de *T. cruzi* no

9 pâncreas foi realizada em lâminas de vidro para microscopia contendo cortes
 10 histológicos previamente tratados com adesivo (3 aminopropiltriétoxissilano, Sigma).

11 Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, das ligações inespecíficas e a
 12 recuperação antigênica. Após esses procedimentos os cortes foram incubados com

13 o anticorpo anti-*Trypanosoma cruzi* produzido em coelho a partir de formas
 14 tripomastigotas sanguíneas obtidas de camundongos "Swiss". O anticorpo foi

15 utilizado a uma concentração de 1: 100 diluído em 2% de BSA em PBS (LEMOS *et*
 16 *al.*, 2013) e incubado durante 2 hora à temperatura ambiente (37°C). Posteriormente,

17 as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com a proteína A conjugada com

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

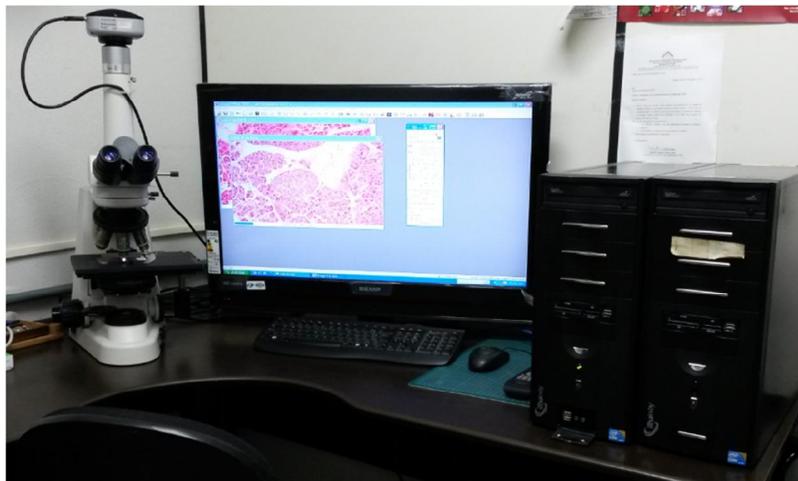
1 peroxidase (1:100). Após a lavagem com PBS as lâminas foram reveladas com
2 DAB-diaminobenzidina (26,5 µL DAB em 1000 µL de tampão - Tris-HCl pH 7,4);
3 lavado em água corrente e contra-corado rapidamente com hematoxilina.

4

5 **4.5.3 Análise morfométrica**

6 As imagens para a análise morfométrica do pâncreas foram obtidas
7 utilizando-se uma câmera de vídeo digital (Evolution MP 5.0 - color - Média
8 Cibernetic Inc. USA) acoplada a um microscópio de luz (Nikon - Eclipse 50i) e
9 computador (Pentium dual core). O tamanho das imagens capturadas foi de 2560 x
10 1920 pixels, calibradas através de lâmina (Leica) com régua graduada de 2 mm
11 dividida em unidades de 0,01 mm (10µm) para as objetivas de 10 e 20 vezes. Sendo
12 utilizando o aumento de 10 x na análise de imagens capturadas com o preparo das
13 lâminas com a coloração imunohistoquímico (IHQ) e 20 x quando corado com
14 hematoxilina e eosina (HE). Para a captura e armazenamento das imagens utilizou-
15 se o programa "Image- Pro Plus" (Media Cybernetics). Para a análise das imagens
16 capturadas utilizou-se o programa "ImageJ" (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), conforme
17 Figura 5.

18



1

2 **Figura 5 - Análise morfométrica do pâncreas**

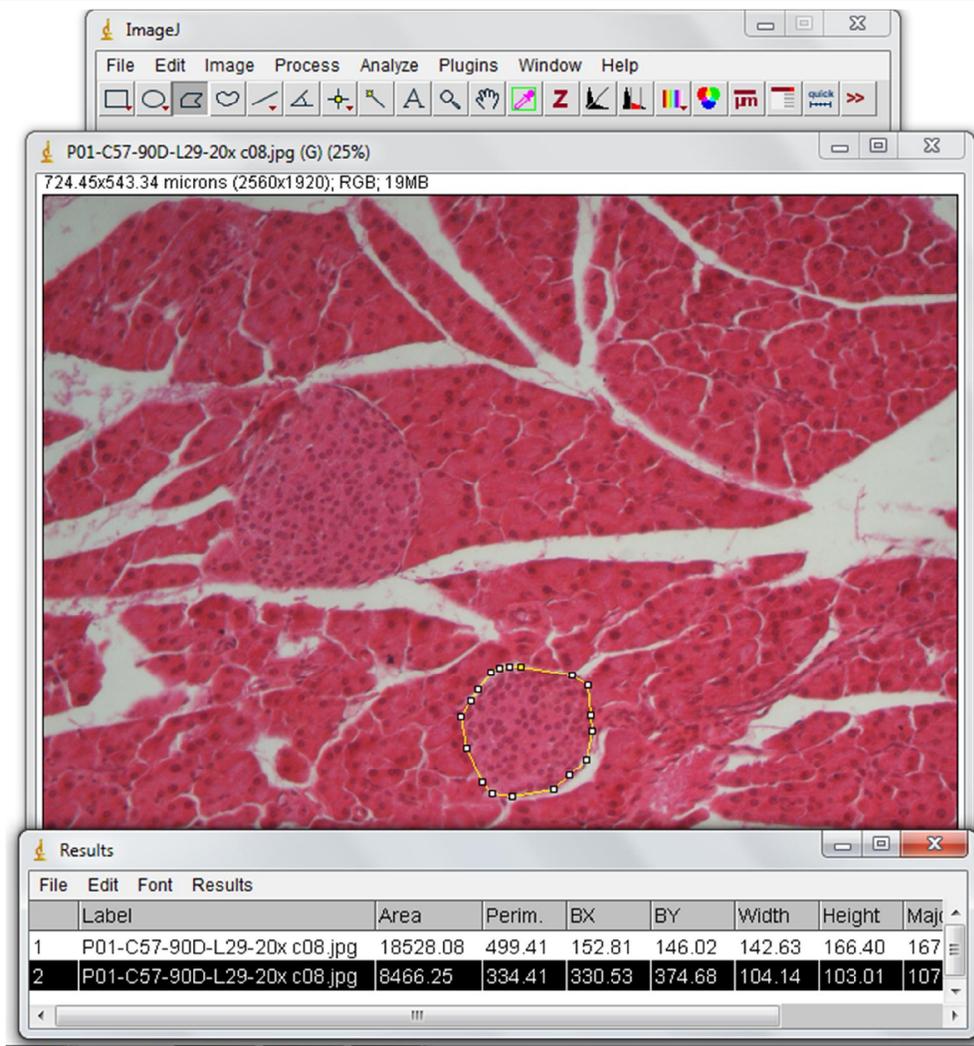
3 Sistema de captura utilizado para imagens obtidas através do uso de uma câmera
4 de vídeo digital (Evolution MP 5.0 - color - Média Cibernetica Inc. USA) acoplada a um
5 microscópio de luz (Nikon - Eclipse 50i) e computador (Pentium dual core) (Biocel/
6 UFTM).

7

8 **4.5.4 Mensurações da área das ilhotas pancreáticas**

9 Foi definido como ilhota pancreática um "conglomerado de células composto
10 por no mínimo quatro células com núcleos esféricos basofílicos e citoplasma claro
11 com características de célula endócrina à coloração pelo HE" (ALMEIDA, 2011). Os
12 valores das áreas foram expressos através das médias em μm^2 , dessa forma foram
13 analisadas em média 70 ilhotas por pâncreas, conforme Figura 6.

14



1

2 **Figura 6 - Estratégia para mensuração da área de ilhotas pancreáticas**

3 Formatação adotada foi pelo programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) na
 4 realização da morfometria de duas ilhotas pancreáticas mensuradas (HE 20x),
 5 sendo uma delas delimitada por uma linha amarela expressando os resultados das
 6 proporções dimensionadas, juntamente com a área no quadro.

7

8 **4.5.5 Quantificação da área de infiltrado inflamatório pancreático**

9 Imagens do parênquima pancreático foram capturadas com aumento de 20 x
 10 HE de uma grade reticulada contendo 25 campos sobreposta, 13 campos
 11 padronizados foram escolhidos e analisados. No total foram analisadas 10 imagens
 12 e 130 campos. Os campos apresentavam uma distância entre eles de 144,32µm no

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

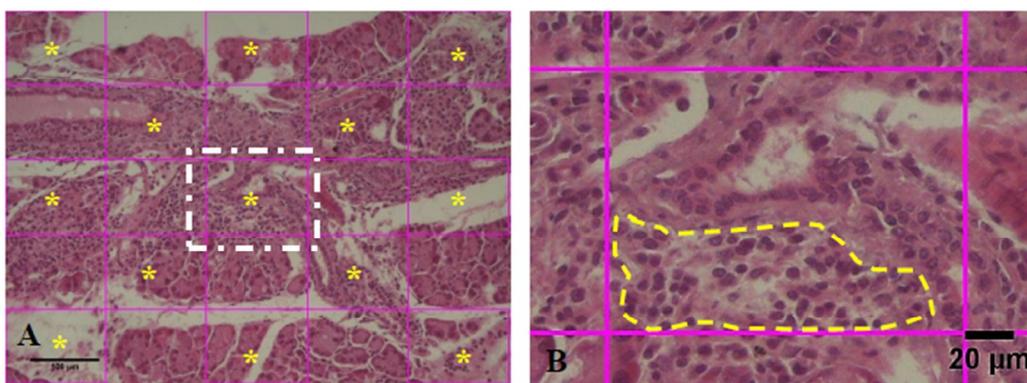
"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Materiais e Métodos

1 eixo X e $107,53\mu\text{m}$ no eixo Y. A área de cada campo correspondia a $15520,15\mu\text{m}^2$.
 2 Os 130 campos correspondem a uma área total de $2017619,5\mu\text{m}^2$, ou seja,
 3 $2,01\text{mm}^2$.

4 O resultado corresponde à somatória das áreas em μm^2 com infiltrado
 5 inflamatório no tecido pancreático, Figura 7 A e B.

6



7

8 **Figura 7 - Morfometria do infiltrado inflamatório pancreático**

9 Morfometria do infiltrado inflamatório pancreático. Os * indicam os 13 campos
 10 padronizados e analisados. Cada área demarcada em linhas quadrangulares
 11 representa tamanho de $144,32\mu\text{m}$ no eixo X e $107,53\mu\text{m}$ no eixo Y. A área
 12 corresponde a $15520,15\mu\text{m}^2$. No total foram analisados 130 campos que
 13 corresponderam a $2017619,5\mu\text{m}^2$ ou $2,01\text{mm}^2$ (HE 20x). **B** - Área do quadro
 14 pontilhada em branco de A mostra o contorno da área delimitada em amarelo de um
 15 infiltrado inflamatório em B.

16

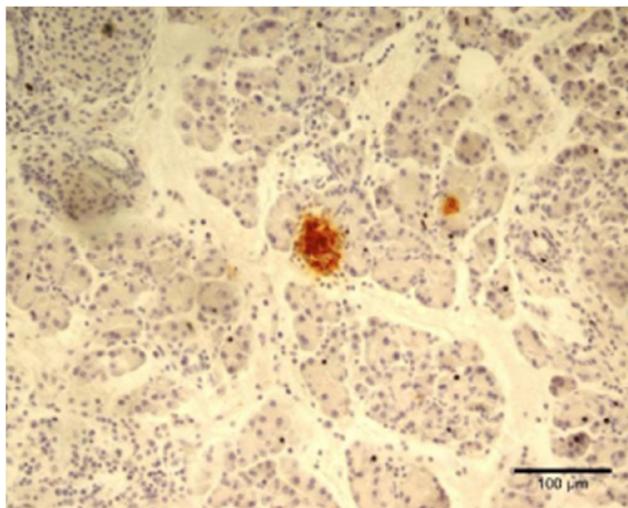
17 **4.5.6 Quantificação de ninhos de *T. cruzi***

18 As imagens do parênquima pancreático foram capturas utilizando as lâminas
 19 de IHQ, com aumento de 10 x. No total foram analisadas 4 imagens por animal,
 20 sendo padronizado como forma de análise o uso de grade reticulada contendo 25
 21 campos sobreposta, 13 campos padronizados e pré determinados, resultando num
 22 total de 52 campos analisados. Os campos apresentavam uma distância entre eles
 23 de $286,48\mu\text{m}$ no eixo X e $212,89\mu\text{m}$ no eixo Y. A área de cada campo correspondia

Materiais e Métodos

1 a 60988,24 μm^2 . Os 52 campos correspondem a uma área total de 3171388,48 μm^2 ,
2 ou seja, 0,003171388 cm^2 . O resultado foi expresso pela relação da somatória dos
3 ninhos de *T. cruzi* nos 52 campos microscópicos pela área total analisada em cm^2 ,
4 Figura 8 e 9.

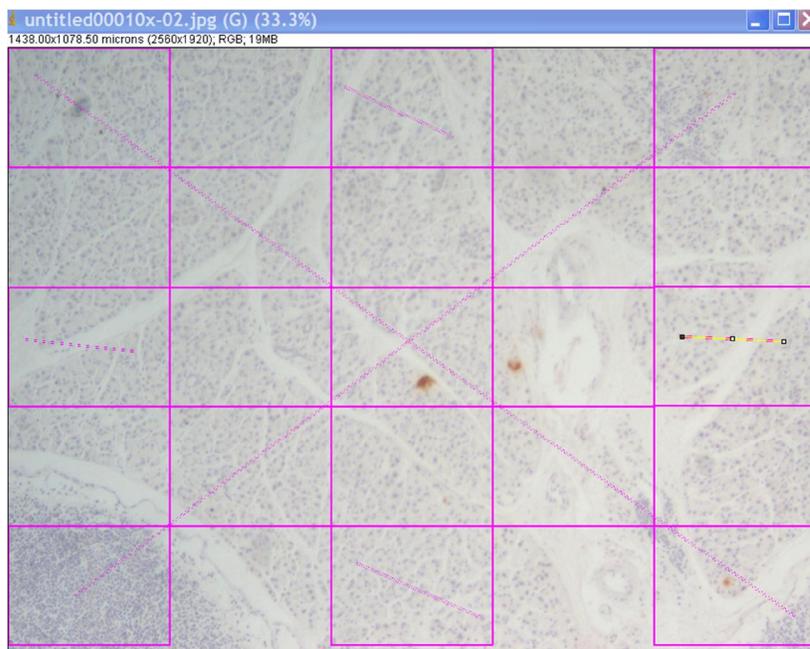
5



6

7 **Figura 8 - Ninho de *T. cruzi* infectando células acinares do pâncreas (IHQ)**

8



9

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

1 Ninho de *T. cruzi* infectando células acinares do pâncreas (IHQ 10x), grade
2 reticulada contendo 25 campos sobreposta, 13 campos aos quais foram quantificados
3 e analisados os quadrantes tracejados e demarcados.
4

5 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

6 O conjunto de dados obtidos dos experimentos com os GC e GI foram
7 submetidos à análise estatística realizada nos programas "Prisma" da Graphpad
8 (<http://www.graphpad.com>) e "Medcalc" da MedCalc Software
9 (<http://www.medcalc.be/>). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal
10 (teste Kolmogorov-Smirnov) e a variância homogênea (teste de Bartlett e/ou teste
11 F). Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea foram
12 utilizados testes paramétricos para dois grupos: Teste t não pareado, e, para mais
13 de 3 grupos: ANOVA com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

14 Nos casos de distribuição não Gaussiana foram utilizados testes não
15 paramétricos (teste de "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's de Comparação
16 Múltipla"). Além disso, foi analisada a diferença estatística significativa da área da
17 curva da glicemia, $p < 0,05$ por ANOVA, sobre dados transformados em logaritmo e o
18 Teste de Student-Newman-Keuls para as comparações entre os grupos. Os
19 resultados foram expressos em médias \pm EPM. Para análise da curva de
20 sobrevivência foi utilizado o Teste "Log-rank (Mantel-Cox)".

21 As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.
22 (DORIA FILHO, 1993; MANDARIN DE-LACERDA, 2003; MATHEWS *et al.*, 1990).

23

1 4.7 ASPECTOS ÉTICOS

2 O presente trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética em
3 Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e registrado
4 com o número de protocolo 255 aprovado em 11/01/2013.

5

6 4.8 NORMAS ADOTADAS

7 Foram adotadas normas da Associação Brasileira de Normas técnicas –
8 ABNT NBR14724. Informação e documentação – trabalhos acadêmicos –
9 apresentação e as recomendações do Curso de Pós-graduação em Ciências da
10 Saúde da UFTM juntamente à Biblioteca Universitária associada ao manual de
11 elaboração de trabalhos acadêmicos baseado nas normas de documentação da
12 ABNT / Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Biblioteca Universitária;
13 organizado por Beatriz Gabellini Alves, Rachel Inês da Silva, Maira Silveira de
14 Almeida. 2. ed. rev. atual, 2013).

15

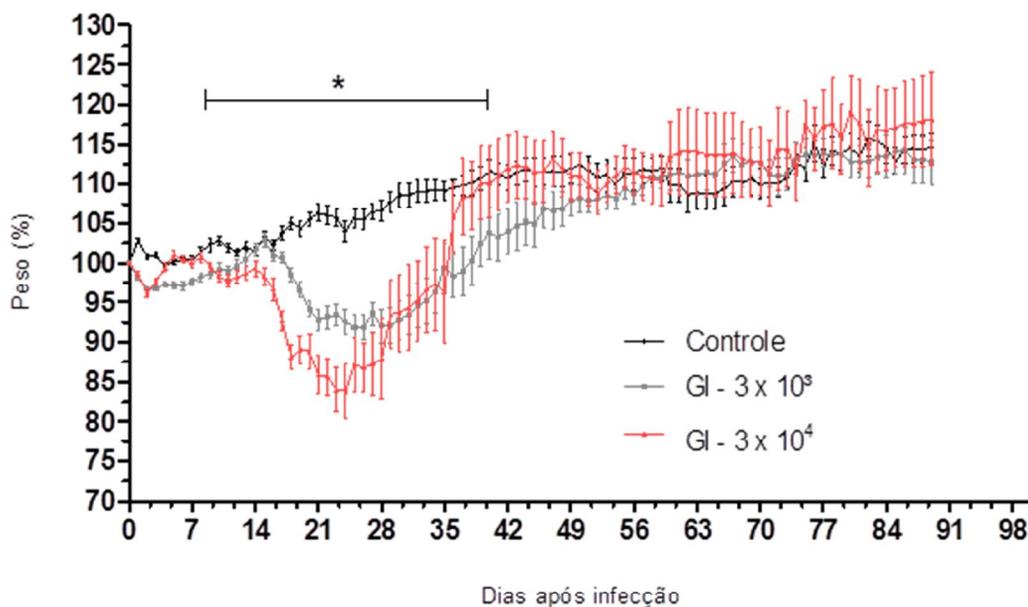
1 5 RESULTADOS

2

3 5.1 CONTROLE E COMPORTAMENTO DA MASSA CORPORAL

4 Efeitos de diferentes concentrações de inóculo de *T. cruzi* em camundongos
 5 C57BL/6 infectados com 3×10^3 e 3×10^4 tripomastigotas (cepa "Y") foram
 6 individualmente monitorados durante os 90 dias de infecção juntamente com o grupo
 7 controle. O comportamento da massa corporal dos animais avaliados foi expresso
 8 em porcentagem de peso (média \pm EPM). Os resultados mostraram que os animais
 9 GI em comparação com controle, sofreram variações de peso estatisticamente
 10 significantes ($p < 0,05$) entre o 7º e 36º dia, conforme Figura 10.

11



12

13 Figura 10 - Variação de peso corporal

14 Valores da média \pm erro padrão da média da porcentagem de ganho e perda de
 15 peso diário entre os grupos controle e infectados com 7, 14, 21, 28 e 90 dias pós-
 16 infecção com *T. cruzi* cepa "Y". No gráfico, (média + EPM) (*) representam valores

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Resultados

1 com significância estatística ($p < 0,05$) entre os grupos. Teste t não pareado
2 (ANOVA).
3

4 5.2 CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA

5 Existiu mortalidade de 52% dos animais no GI – 3×10^4 . Essa mortalidade
6 ocorreu entre o 12º e 36º dia, sendo estatisticamente significativa. Não houve
7 mortalidade no GI – 3×10^3 e no grupo controle, Figura 11.

8 5.3 CURVAS DE PARASITEMIA

9 Houve comportamento ascendente entre o 7º e 8º dia de característica
10 logarítmica das parasitemias acompanhadas, demonstrando que a partir do 4º dia no
11 GI – 3×10^4 e no 5º dia no GI – 3×10^3 comparativamente, já expressaram
12 diferenças entre grupos. Após inoculações, como indicado na metodologia, os
13 grupos apresentaram decréscimo da parasitemia entre o 8º e 9º dia nos grupos
14 analisados e mantiveram diferenças analíticas do 4º até o 21º dia quando
15 comparado entre grupos infectados, Figura 12.

16

17

18

19

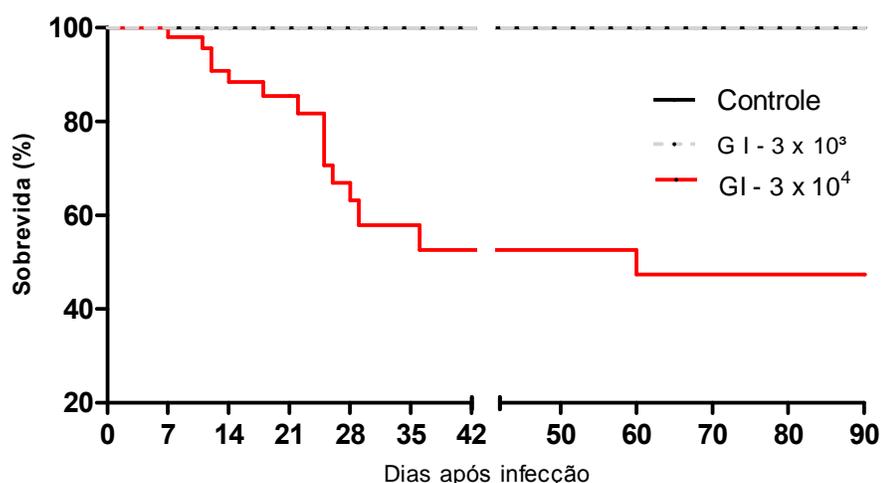
20

21

22

23

24



25 **Figura 11 - Curva de sobrevivência**

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

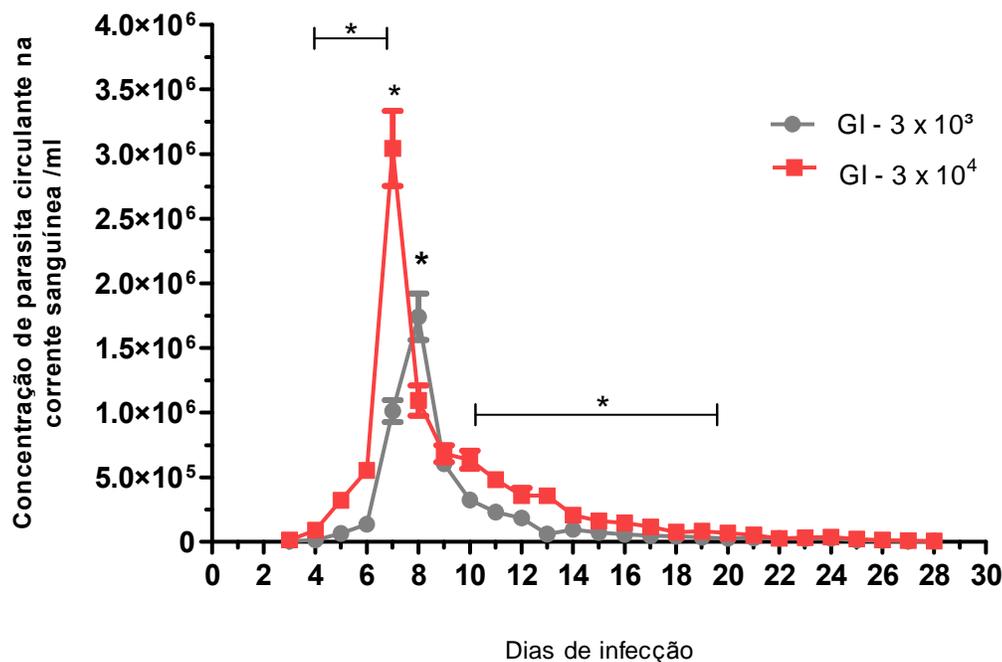
Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Resultados

1 Curva de sobrevivência dos grupos controle e infectados com *T. cruzi* cepa "Y", durante
2 os 90 dias de infecção. Teste Log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,05$.

4 **Curva de parasitemia diária dos camundongos C57BL/6**
5 **infectados com *T. cruzi*.**



16 **Figura 12 - Curva de parasitemia**

17 Curva de parasitemia diária dos camundongos C57BL/6 inoculados com *T. cruzi*.
18 cepa "Y". Dados representativos de 2 experimentos independentes com média de 10
19 animais por grupo. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média dos
20 valores individuais sendo que o (*) no gráfico representam valores com significância
21 estatística ($p < 0,05$).

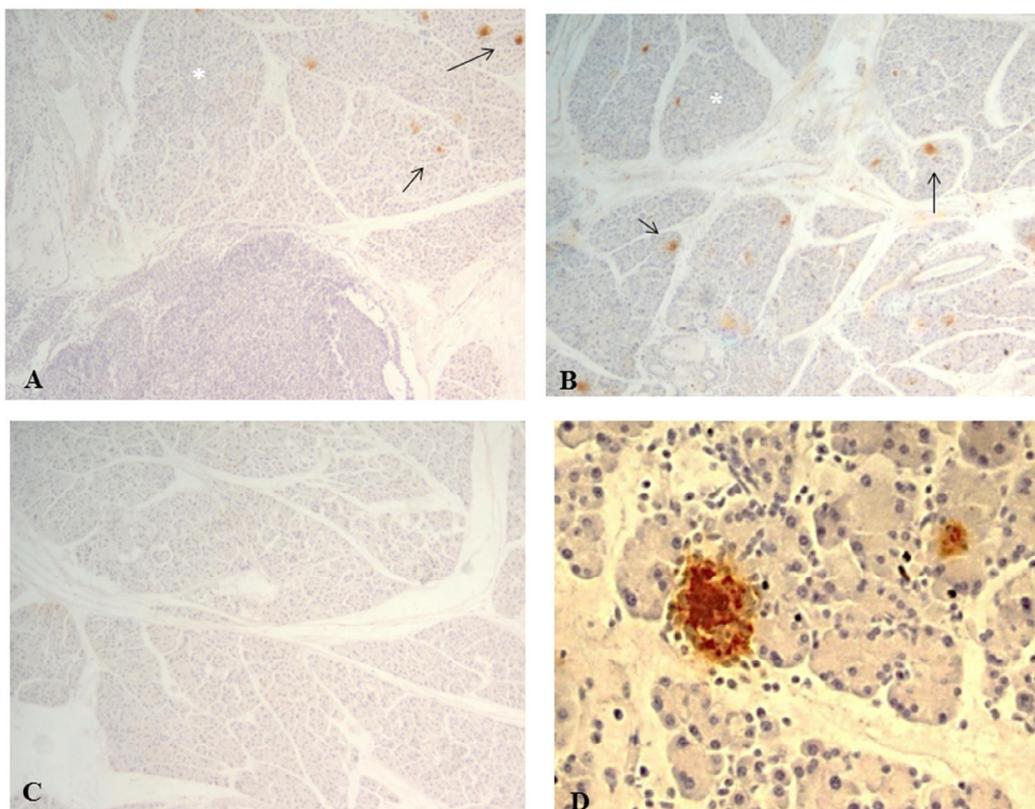
22

24 5.4 DENSIDADE PARASITÁRIA

25 A observação morfológica quanto a positividade ao *T. cruzi* cepa "Y" nos
26 diferentes cortes experimentais infectados e visualização e detecção reativa do
27 antígeno, em microscopia de luz comum, foi realizado com preparo do material
28 histológico por imunohistoquímica (IHQ) e visualizado em uma lente de aumento de

Resultados

- 1 10 x para análise de presença de ninhos do parasita no tecido pancreático, conforme
 2 Figura 13. É importante ressaltar que a maior marcação reativa do antígeno
 3 (positividade) foi no 21º dia de infecção para os diferentes inóculos, Figura 14.
 4



5

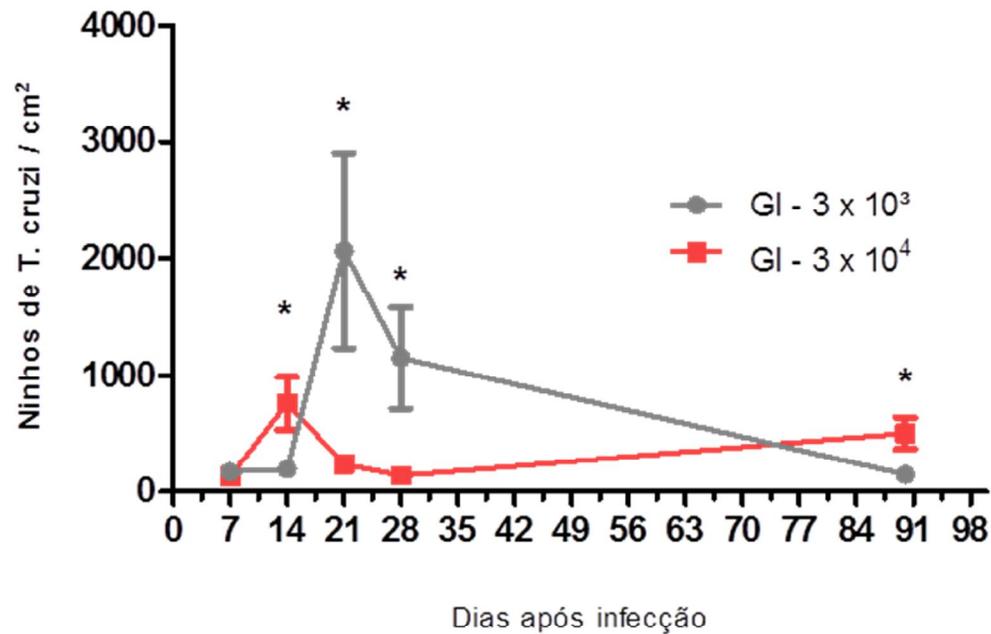
6 **Figura 13 - Parênquima pancreático dos grupos infectados**

- 7 Em **A, B e C** deve ser visualizado de forma comparativa quanto à positividade ao *T.*
 8 *cruzi* cepa “Y” nos diferentes cortes experimentais (**A**-GI- 3×10^3 ; **B-C**, GI- 3×10^4
 9 (IHQ 10x)), sendo expresso nessas figuras, referencia ao 14º dia de infecção nas
 10 diferentes concentrações de infecção parasitária, de forma que há positividade
 11 reacional ao antígeno em **A, B e D** com presença de pontos marrons, Ninho de *T.*
 12 *cruzi* (setas) infectando células acinares (asterisco) do pâncreas (IHQ 10x). Na
 13 figura **C** não houve marcação, expressando negatividade em nossa avaliação. **D**
 14 Ninho de *T. cruzi* infectando células acinares do pâncreas em maior aumento (IHQ
 15 20x). Esses resultados foram quantificados em números absolutos de casos
 16 analisados entre os diferentes grupos quanto à visualização ou detecção reativa do
 17 antígeno, declarando positivo e ou negativo na microscopia de luz comum.
 18

Resultados

1 As imagens do parênquima pancreático foram capturas utilizando as lâminas
2 de IHQ, com aumento de 10 x. A quantificação do número de ninhos de amastigotas
3 de *T. cruzi* cepa "Y" e/ou depósitos granulares mostrou aumento nos grupos
4 infectados analisados, sendo presente uma quantidade baixa no 7º dia para ambos
5 os inóculos utilizados, mantendo se discreta elevação linear no 14º no GI - 3×10^3 e
6 expressivas diferenças entre os valores expressados pelos grupos experimentais no
7 14º, 21º, 28º dia para GI - 3×10^3 e 3×10^4 , respectivamente. Houve declínio no 21º
8 em ambos os grupos infectados. Sendo no GI - 3×10^3 , o 28º até o 90º dia o
9 decréscimo foi contínuo diferente do GI - 3×10^4 que apresentou discreta ascendência
10 linear. O resultado foi expresso pela relação da somatória dos ninhos de *T. cruzi* nos
11 52 campos microscópicos pela área total analisada em cm^2 , houve diferença
12 expressiva entre os grupos no 14º, 21º, 28º e 90º dias, Figura 14.

13



1

2 **Figura 14 - Densidade parasitária referente à área (cm²) e a presença de ninhos**
 3 **de *T. cruzi***

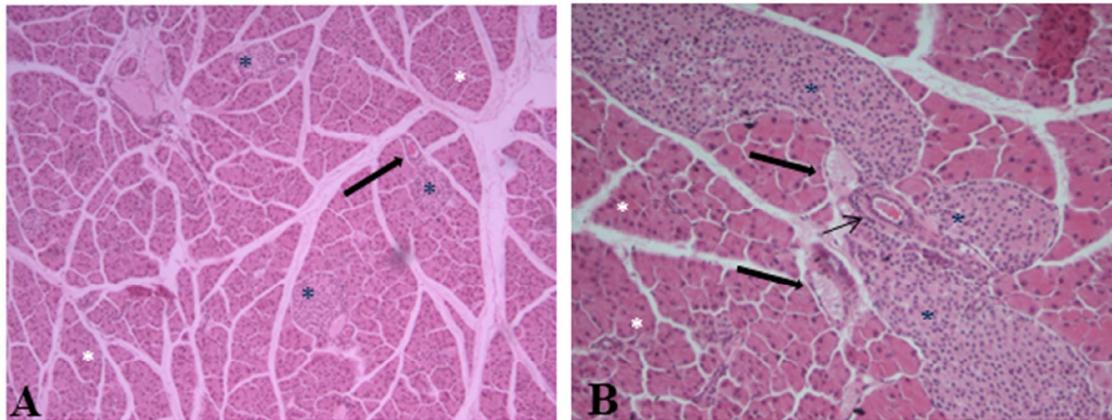
4 Densidade parasitária referente à área (cm²) e a presença de ninhos de *T. cruzi*
 5 cepa "Y" no tecido pancreático entre os diferentes grupos infectados com 7, 14,
 6 28 e 90 dias pós-infecção. (*) indica diferença significativa com 14, 21, 28 e 90 dias
 7 de infecção, $p < 0,05$. Teste Mann Whitney.

8

9 5.5 QUANTIFICAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

10 Ao exame histopatológico dos pâncreas não foram observadas alterações
 11 em 100% dos animais do grupo controle, Figura 15. Nos grupos infectados
 12 observou-se infiltrado inflamatório a partir do 7º dia da infecção. Houve diferença
 13 estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$) no 7º e 28º dia de
 14 infecção, Figuras 16 e 17.

1



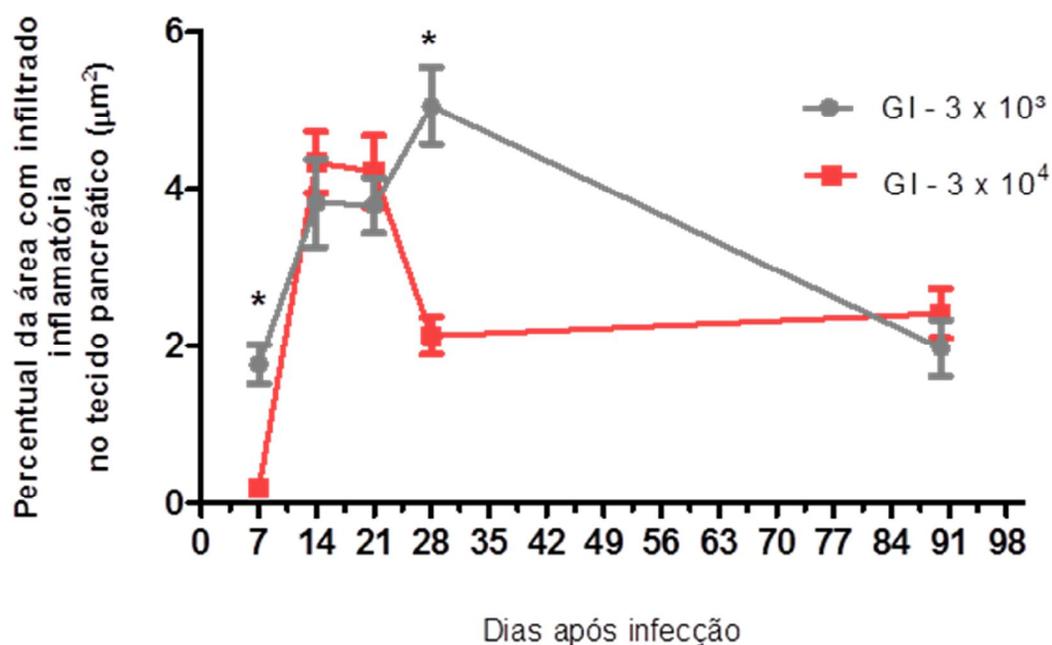
2

3

4 **Figura 15 - Parênquima pancreático do grupo controle**

5 Em **A e B** presença de ácinos pancreáticos (asterisco branco), vasos sanguíneos
 6 (seta espessa), ductos (setas) e ilhotas pancreáticas (asterisco azul) com
 7 características morfológicas dentro da normalidade. Em **A** o aumento é de (HE 10x)
 8 e em **B** o aumento é de (HE 20x).

9



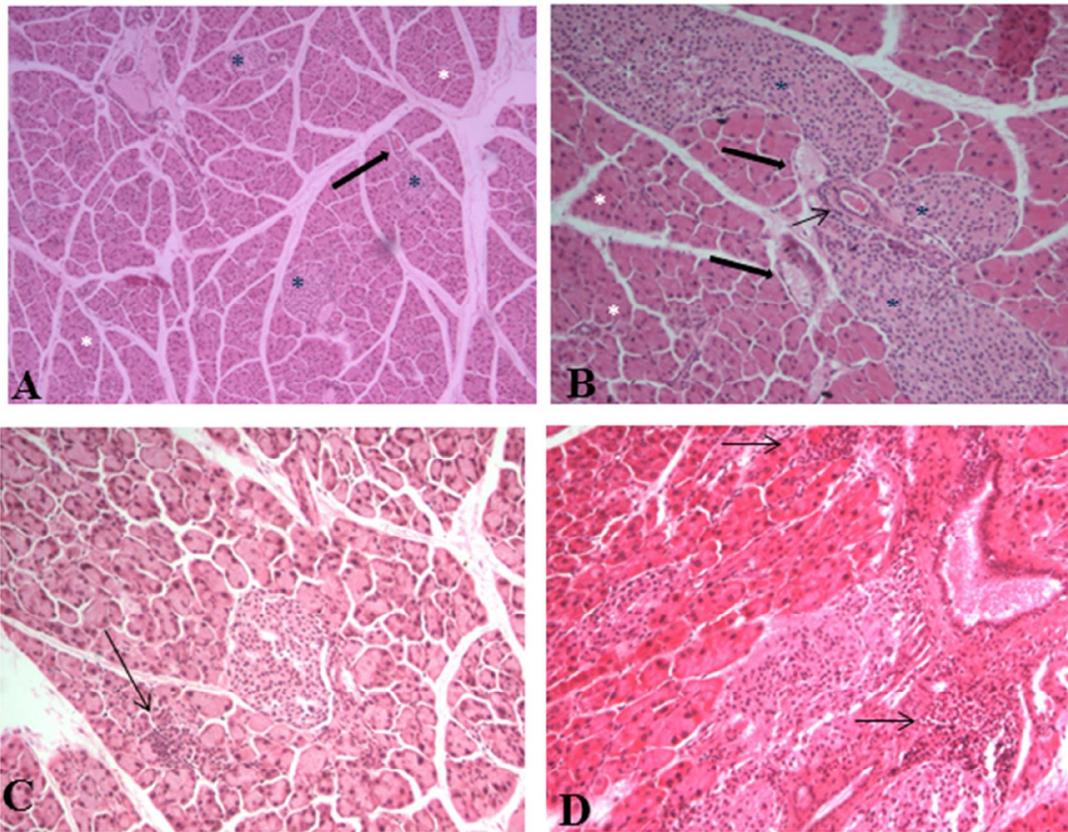
1

2 **Figura 16 - Percentual de infiltrado inflamatório pancreático**

3 Percentual da área comprometida com exsudato inflamatório do tecido pancreático
 4 de camundongos dos grupos infectados com 7, 14, 21, 28 e 90 dias pós-infecção
 5 com *T. cruzi* cepa "Y". No gráfico o (*) indica diferença significativa entre os grupos,
 6 $p < 0,05$. Teste Mann Whitney.

7

8



1

2

3 **Figura 17 - Morfometria do infiltrado inflamatório pancreático**

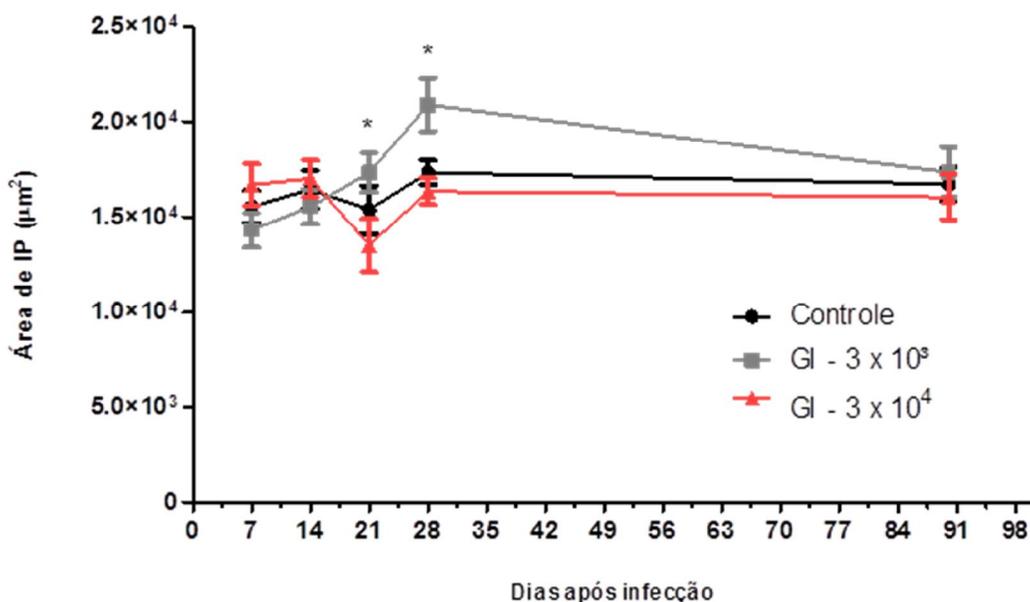
4 Em **A e B** presença de ácinos pancreáticos (asterisco branco), vasos sanguíneos
 5 (seta espessa), ductos (setas) e ilhotas pancreáticas (asterisco azul) com
 6 características morfológicas dentro da normalidade. Em **A** o aumento é de (HE 10x)
 7 e em **B** o aumento é de (HE 20x). **C** - Aspecto histológico de processo inflamatório
 8 do parênquima pancreático, presença infiltrado inflamatório (seta) (GI- 3×10^3 21
 9 dias) (grupo de menor inóculo) (HE 20x). **D** – Presença de infiltrado inflamatório
 10 mononuclear permeando tecido pancreático (ilhota ,ducto e parênquima) (GI- 3×10^4
 11 21 dias) (grupo de maior inóculo) (HE 20x).

12

13 5.6 MENSURAÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

14 A análise morfométrica das médias das áreas das ilhotas pancreáticas em
 15 (μm^2) foi significativa entre os grupos infectados ao 21º dia. No 28º dia houve
 16 diferença entre o grupo controle e GI 3×10^3 e entre os grupos infectados, Figura 18.

17



1

2 **Figura 18 - Área das ilhotas pancreáticas**

3 Área das ilhotas pancreáticas dos camundongos dos grupos controle e grupo
 4 infectado com 7, 14, 21, 28 e 90 dias pós-infecção com *T. cruzi* cepa "Y". Teste
 5 Kruskal- Wallis com pós-teste Dunn's de Comparação Múltipla. No gráfico, (*)
 6 representam valores com significância estatística ($p < 0,05$) entre os grupos e dias de
 7 infecção avaliados.

8

9 **5.7 TESTES INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TITG)**

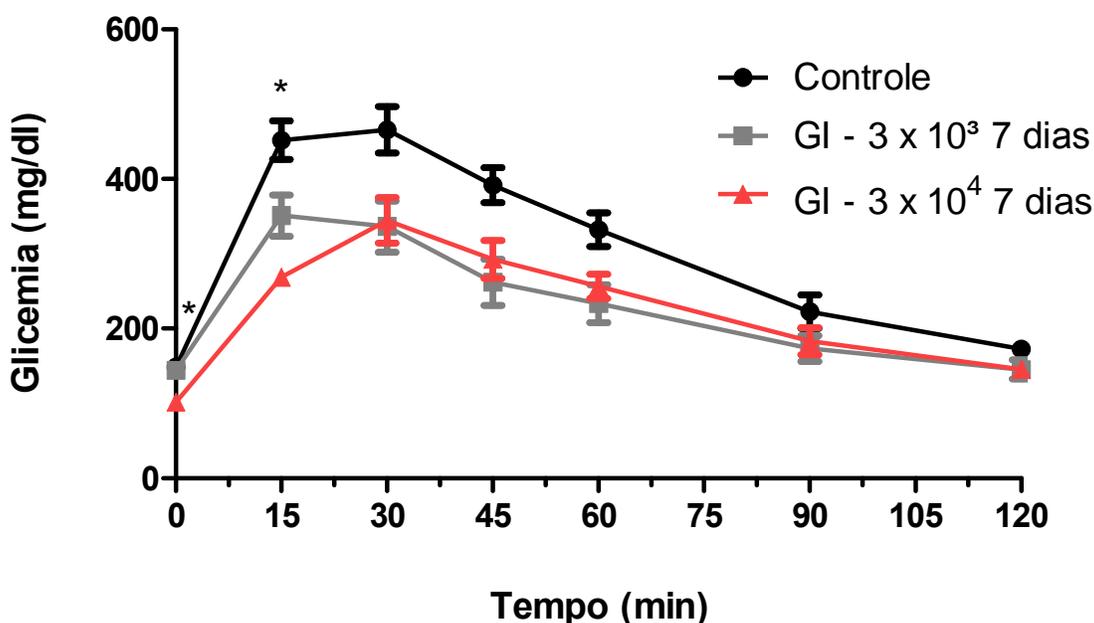
10 Os valores da glicemia apresentaram diferenças em diversos momentos das
 11 aferições, sendo que, a glicemia basal (jejum) estava discretamente diminuída nos
 12 GIs de 7, 14, 21 e 28 dias de infecção em ambos grupos com resultados
 13 estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

14 Foi constatada uma tendência aos níveis glicêmicos estarem diminuídos nos
 15 tempos 15', 30', 45', 60', 90' e 120' nos diferentes grupos infectados em relação ao
 16 GC. Sendo estatisticamente significativo no tempo 15 minutos tanto para GI 3×10^3
 17 com 3×10^4 . Nos gráficos os símbolos (*) (#) (¢) indicam diferença estatisticamente
 18 significantes entre os grupos, $p < 0,05$. Foram analisados os resultados

Resultados

1 comparativamente entre os grupos, tempo e a área referente ao comportamento do
2 traçado gráfico, nas Figuras 19, 20, 21 e 22.

3 No 7º dia de infecção, houve diferença estatisticamente significativa entre o
4 GC e o GI – 3×10^4 . A diferença ocorreu no tempo zero (jejum) (* GC x GI 3×10^4) e
5 aos 15 minutos (* GC x GI 3×10^4) após a adição da solução glicosada. Para
6 comparação gráfica em seu comportamento logarítmico foi usado o Teste de
7 Student-Newman-Keuls para as comparações entre os grupos ($p < 0,05$) confirmando
8 diferença entre o GC em relação aos GIs ao longo de todo o tempo avaliado, Figura
9 19.

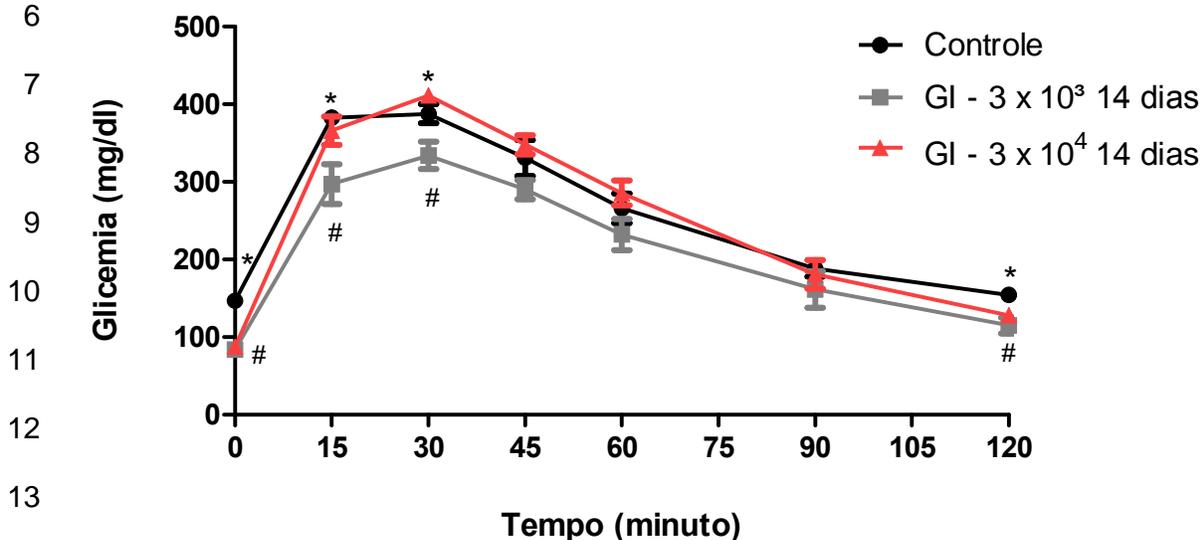


21 **Figura 19 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 7 pós-infecção**

22 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose nos animais do GC e GIs no 7º dia de
23 infecção. Valores médios da glicemia em mg/dl em relação ao tempo de aferição.
24 ANOVA foi aplicado sobre dados transformados em logaritmo, utilizamos o Teste de
25 Student-Newman-Keuls para as comparações entre os grupos ($p < 0,05$).
26

Resultados

1 Referente ao 14º dia de infecção é importante ressaltar um mesmo
 2 comportamento gráfico, porém, a diferença estatisticamente significativa ocorreu (*
 3 GC x GIs $3 \times 10^3 / 3 \times 10^4$) entre o (# GC x GI - 3×10^3), no tempo zero, 15, 30 e 120
 4 minutos. E entre os grupos infectados no minuto 30, Figura 20.



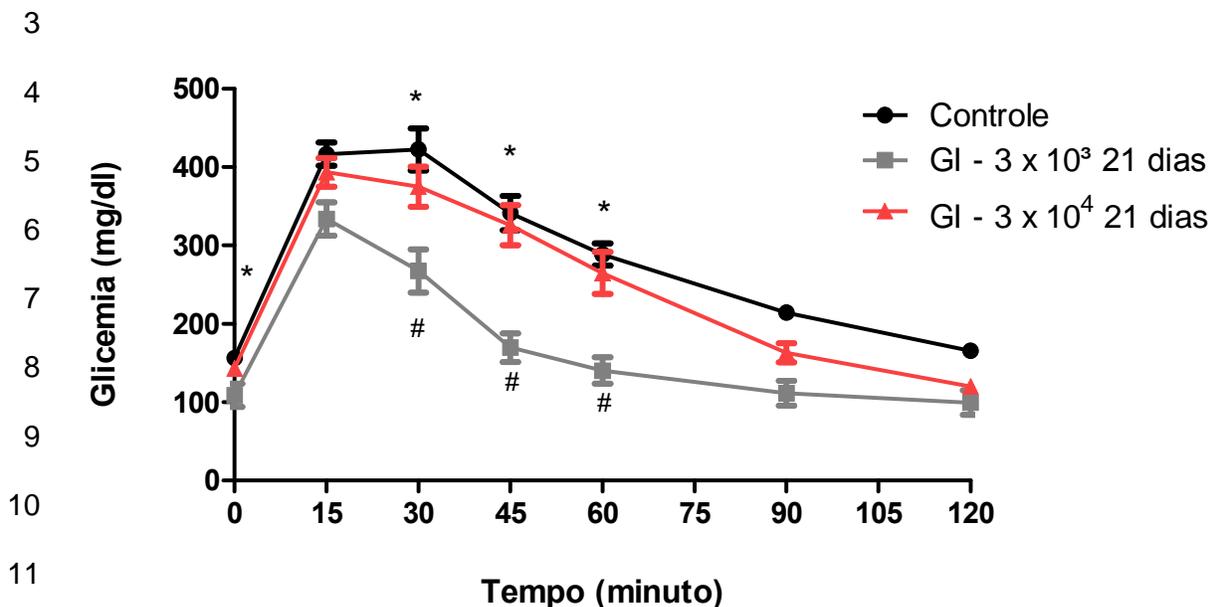
15 **Figura 20 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 14 pós-infecção**

16 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose nos animais do GC e GIs no 14º dia de
 17 infecção. Valores médios da glicemia em mg/dl em relação ao tempo de aferição.
 18 ANOVA foi aplicado sobre dados transformados em logaritmo, utilizamos o Teste de
 19 Student-Newman-Keuls para as comparações entre os grupos. Teste ANOVA com
 20 teste de comparação múltipla de Tukey's para os diferentes tempos e grupos
 21 ($p < 0,05$).
 22

23 No 21º dia de infecção, o gráfico apresentou um traçado com menores valores
 24 do GI - 3×10^3 (* GC x GI 3×10^3) em relação aos grupos analisados o que é
 25 confirmado no teste de Student-Newman-Keuls para as comparações entre os
 26 grupos em relação as suas áreas expressa no gráfico. A diferença encontrada
 27 ocorreu durante todo o tempo experimental entre GC e GI - 3×10^3 e entre os

Resultados

1 infectados ($p < 0,05$). Analisando os grupos GIs foram pontados suas diferenças (# GI
2 3×10^3 x GI 3×10^4) nos tempos 30, 45, 60 minutos, Figura 21.



13 **Figura 21 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 21 pós-infecção**

14 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose nos animais do GC e GIs no 21º dia de
15 infecção. Valores médios da glicemia em mg/dl em relação ao tempo de aferição.
16 ANOVA foi aplicado sobre dados transformados em logaritmo, utilizamos o Teste de
17 Student-Newman-Keuls para as comparações entre os grupos. Teste ANOVA com
18 teste de comparação múltipla de Tukey's para os diferentes tempos e grupos
19 ($p < 0,05$).
20

21 No 28º dia de infecção, encontramos diferenças entre os GC e GIs ao longo
22 de toda análise. O GI 3×10^3 (* GI 3×10^3 x GC x GI 3×10^4) (\neq GC x GI 3×10^4)
23 mostrou valores menores em relação aos outros grupos durante as duas horas de
24 aferição analisados, o que é confirmado no teste de Student-Newman-Keuls para as
25 comparações entre os grupos em relação às suas áreas expressa no gráfico.
26 Existem diferenças marcantes entre os GIs nos diferentes momentos: 15 e 30
27 minutos (# GI 3×10^4 x GI 3×10^3) ($p < 0,05$), Figura 22.
28

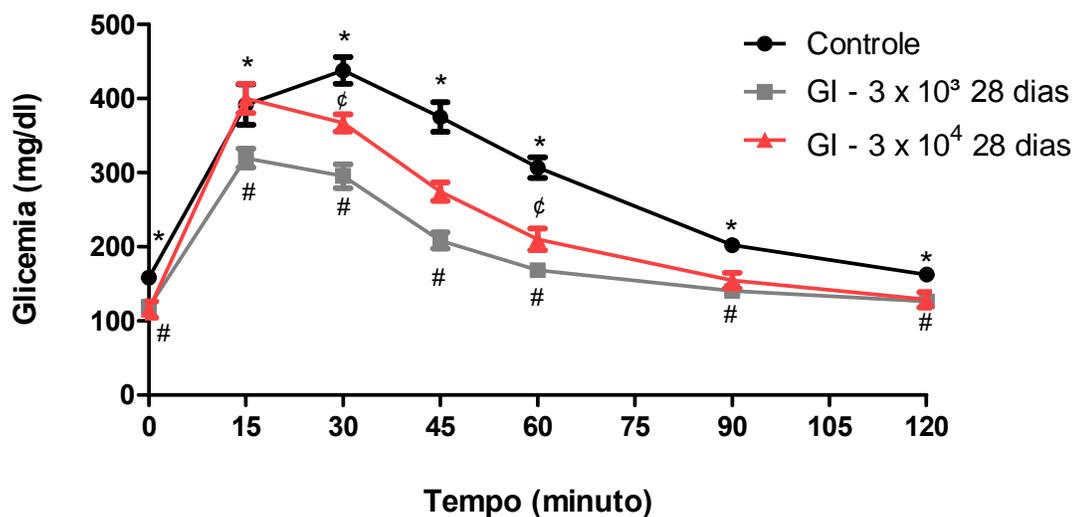


Figura 22 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 28 pós-infecção

Teste intraperitoneal de tolerância à glicose nos animais do GC e GIs no 28º dia de infecção. Valores médios da glicemia em mg/dl em relação ao tempo de aferição. ANOVA foi aplicado sobre dados transformados em logaritmo, utilizamos o Teste de Student-Newman-Keuls para as comparações entre os grupos. Teste ANOVA com teste de comparação multiple de Tukey's para os diferentes tempos e grupos ($p < 0,05$).

Nos grupos do 90º dia de infecção os valores se aproximaram. Não houve diferença estatística ao longo do tempo analisado, sendo que os grupos apresentaram um comportamento gráfico semelhante, dando destaque ao GI - 3 x 10³ que manteve valores mais baixos, Figura 23.

Resultados

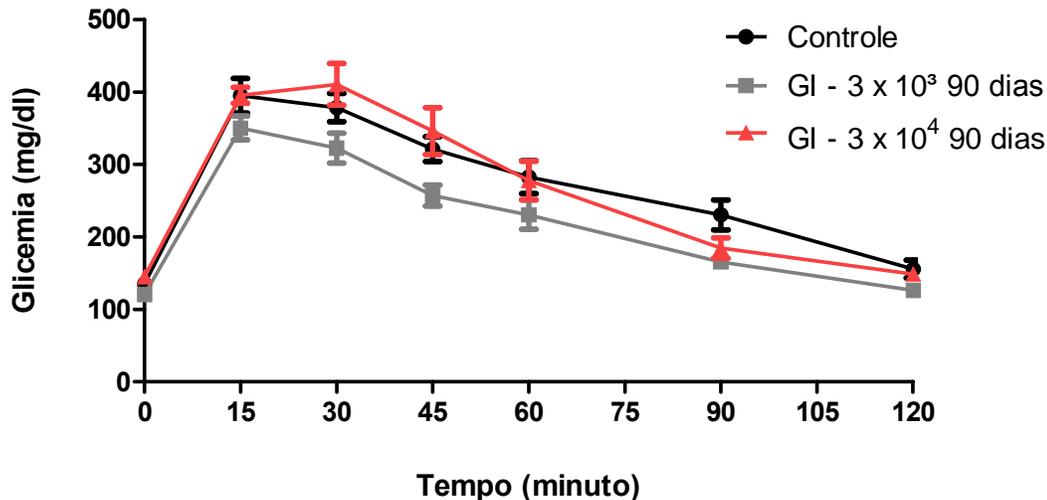


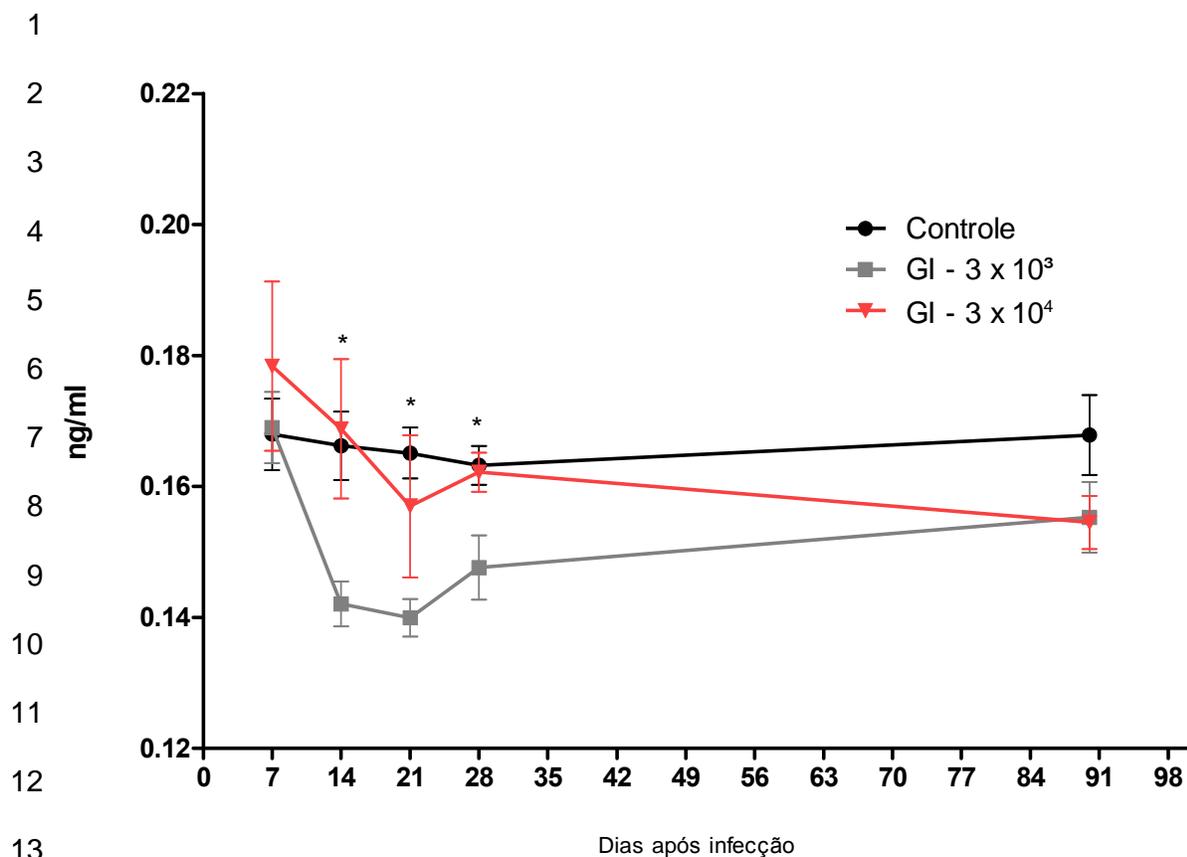
Figura 23 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose – dia 90 pós-infecção

Teste intraperitoneal de tolerância à glicose nos animais do GC e GIs no 90º dia de infecção. Valores médios da glicemia em mg/dl em relação ao tempo de aferição. ANOVA foi aplicado sobre dados transformados em logaritmo, utilizamos o Teste de Student-Newman-Keuls para as comparações entre os grupos. Teste ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey's para os diferentes tempos e grupos ($p < 0,05$).

5.8 TESTE DE INSULINA PLASMÁTICA

De acordo com o resultado expressado, os valores da insulina plasmática dos animais do GC apresentaram discreta variação de declínio gráfico entre o 7º e o 28º dia. Do 28º ao 90º dia manteve uma inclinação branda e constante. Diferente dos valores dos animais dos GIs que sinalizaram uma diminuição de valores nos primeiros 21 dias e logo após um aumento no 28º dia. No GI – 3×10^3 houve um aumento discreto até o 90º dia de infecção, enquanto que os valores dos animais do GI - 3×10^4 houve uma diminuição. Ocorreram diferenças significativas entre o GC e GI – 3×10^3 (* GC x GI 3×10^3) nos diferentes dias de infecção: 14, 21 e 28, não sendo significativo entre os GIs ($p < 0,05$), Figura 24.

Resultados



15 **Figura 24 - Dosagem de insulina plasmática**

16 Teste de insulina plasmática pelo método de Elisa. Foi analisado por ANOVA para
 17 avaliação analítica entre os grupos, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's de
 18 Comparação Múltipla entre os grupos. No gráfico o (*) indica diferença significativa
 19 entre os grupos GC e GI - 3×10^3 , não sendo significativo entre os GIs ($p < 0,05$).
 20

1 6 DISCUSSÃO

2 O estudo da doença de Chagas, seja em humanos, triatomíneos,
3 reservatórios vertebrados ou modelos experimentais tem enfatizado, ao longo de
4 décadas, a complexidade da interação do *T. cruzi* com as células destes
5 hospedeiros, demonstrando claramente seu sucesso adaptativo em se estabelecer
6 nos mais diversos ambientes, sobreviver à situações de estresse, especialmente
7 aqueles derivados de mecanismos imunológicos, espalhando-se por virtualmente
8 todos os tecidos dos hospedeiros vertebrados (Rassi *et al.*, 2010).

9 Neste sentido, ainda que a infecção destes sítios, passada a fase aguda, seja
10 largamente caracterizada por baixa densidade parasitária, a resposta inflamatória
11 associada, reduzida se comparada ao início da infecção, porém constante, leva à
12 disfunção progressiva de órgãos de forma bem caracterizada para o coração e para
13 o sistema nervoso autônomo do trato gastrointestinal (Rassi *et al.*, 2010).

14 Nos últimos anos o papel deste parasitismo em sítios menos “clássicos” tem
15 recebido atenção especial, como rins, supra-renal e, aqui e em outros estudos, o
16 pâncreas. Embora a descoberta da infecção pancreática por *T. cruzi* não seja
17 recente, os mecanismos pelos quais ocorrem e a repercussão dela no
18 funcionamento do pâncreas, em especial no controle da glicemia, são ainda
19 escassos (Vieira e Hadler, 1961; Rassi *et al.*, 2010).

20 Baseados nesta importância utilizamos um modelo de infecção murina com
21 *T. cruzi*, utilizando uma linhagem de animais classicamente descrita como resistente
22 à infecção, exibindo uma fase aguda com alta parasitemia, com infiltrado inflamatório
23 em diversos tecidos, que é seguida pelo controle da infecção na maioria dos animais
24 e estabelecimento de uma fase crônica, com baixo parasitismo tecidual e fibrose.

Discussão

1 Aliamos à essa abordagem uma comparação de diferentes cargas parasitárias no
2 momento da infecção a fim de avaliar sua influência no desfecho da infecção.

3 Demonstramos que a infecção murina com cepa Y de *T. cruzi* leva ao
4 parasitismo pancreático nas fases aguda e crônica da infecção. Ainda, validamos
5 que apesar deste parasitismo ser comum a diferentes concentrações de inóculos (1
6 log₁₀ de diferença – 3x10³ vs 3x10⁴ formas tripomastigotas), o comportamento da
7 infecção e a repercussão morfológica e funcional no pâncreas apresenta importantes
8 diferenças: enquanto o maior inóculo desencadeou uma parasitemia patente mais
9 precoce, maior pico de parasitemia e culminou com maior taxa de mortalidade,
10 animais com inóculo menor (3x10³ formas tripomastigotas) apresentam maiores e
11 mais prolongados parasitismo tecidual e infiltrado inflamatório pancreático. Além
12 disso, a carga parasitária menor levou ao aumento das ilhotas pancreáticas, menor
13 glicemia média no teste de tolerância à glicose intraperitoneal e concentração
14 plasmática de insulina sistematicamente reduzida durante a fase aguda da infecção,
15 com o início de sua redução claramente relacionada com a primícia da parasitemia
16 patente.

17 Em relação ao comportamento das curvas de parasitemia, mortalidade e
18 parasitismo tecidual, estudos prévios utilizando diferentes concentrações de inóculos
19 e concentrações de inóculos semelhantes ao nosso modelo experimental,
20 demonstraram comportamentos semelhantes aos que observamos, com parasitemia
21 precoce, maior pico de parasitemia com maior inóculo (Lemos *et al.*, 2013; Vazquez
22 *et al.*, 2015).

23 Este efeito do diferente inóculo na parasitemia e mortalidade foi sugerido em
24 estudos anteriores, utilizando cepa Colombiana (Borges *et al.*, 2013) e,
25 diferentemente do observado em nosso estudo, Borges e colaboradores observaram

Discussão

1 uma associação entre maior inóculo, maior parasitismo tecidual e inflamação (3×10^4
2 vs 3×10^3 vs 3×10^2), embora se deva levar em conta que foram avaliados apenas no
3 tecido cardíaco e com cepa caracteristicamente cardiotrópica (Borges *et al.*, 2013) e
4 que diferentes cepas de *T. cruzi* estão associadas com diferentes tropismos e
5 intensidades de manifestações agudas e crônicas, inclusive com comportamentos
6 diferenciais em sucessivas reinfecções (Melo e Brener, 1978; Andrade, 1990; Reis
7 Machado *et al.*, 2014).

8 Diferente do observado no tecido pancreático, camundongos infectados com
9 os mesmos inóculos (cepa Y) apresentaram infiltrado inflamatório e parasitismo
10 intestinal positivamente correlacionado com a carga parasitária (Vazquez *et al.*,
11 2015), resultado também observado nos rins (Lemos *et al.*, 2013). Nossos
12 resultados de maior parasitismo tecidual pancreático associado com menor
13 parasitemia e menor mortalidade podem ser relacionados a dois eventos não
14 necessariamente excludentes: altas concentrações de inóculo pode desencadear
15 uma resposta inflamatória intensa, culminando com alterações sistêmicas e
16 mortalidade elevada dos animais. Já um inóculo menor desencadearia uma resposta
17 imune inicialmente mais branda, ainda capaz de controlar a parasitemia sem levar a
18 morte do hospedeiro, contudo permitindo o estabelecimento parasitário nos tecidos,
19 aqui representados pela infecção pancreática.

20 Um importante fator que não pode ser desconsiderado neste contexto é, o já
21 mencionado, tropismo tecidual diferencial das cepas de *T. cruzi* que pode impactar
22 no estabelecimento da infecção no pâncreas de forma diversa entre diferentes
23 cepas. Estudos anteriores relacionaram a capacidade de diferentes cepas
24 infectarem o tecido pancreático e desencadarem inflamação, embora em graus
25 diferentes (Calabrese *et al.*, 1994; Lenzi *et al.*, 1996; Corbett *et al.*, 2002b; Dos

Discussão

1 Santos *et al.*, 2004; Nagajyothi *et al.*, 2013). Outro importante aspecto a ser
2 considerado é a redução observada no peso dos animais, provavelmente secundário
3 a fenômenos sistêmicos da inflamação na fase aguda da doença, já atribuído
4 anteriormente ao eixo neuro-imunoendócrino em infecções e ao custo energético
5 elevado da ativação maciça do sistema imune (Moret e Schmid-Hempel, 2000;
6 Bonneaud *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2009). Manarin e colaboradores associaram a
7 redução de peso observada na infecção murina com 1000 tripomastigotas viáveis da
8 cepa Tulahuen de *T. cruzi* com desregulação do sistema de leptina (Manarin *et al.*,
9 2013).

10 Países tropicais têm experimentado um aumento na incidência de diabetes
11 tipo II e a coincidência com zonas endêmicas de diversas doenças infecciosas levam
12 à suposição que, em graus variados, possa haver relação causal entre essas
13 condições. Especificamente na doença de Chagas, estudos já apontam uma
14 possível relação do desenvolvimento da doença com distúrbios metabólicos
15 associados (Geraix *et al.*, 2007; Tanowitz *et al.*, 2011).

16 De fato, diversos estudos apontam que a relação entre infecção e distúrbios
17 no metabolismo, em especial homeostase da glicose no hospedeiro e etiologia do
18 diabetes, não é exclusividade da doença de Chagas, tal fato também foi descrito em
19 modelo murino de malária (Elased e Playfair, 1994; Elased e Playfair), infecções
20 virais diversas, como Influenza, Rotavirus e Coxsackievirus (Jun e Yoon, 2003;
21 Graham *et al.*, 2008; Richer e Horwitz, 2009; Capua *et al.*, 2013) e sepse bacteriana
22 (George *et al.*, 1974; Rattanataweeboon *et al.*, 2009).

23 Apesar da infecção chagásica ser em grande escala relacionada com
24 distúrbios cardíacos e circulatórios ou alterações digestivas principalmente
25 relacionadas com os megas (Rassi e Marin-Neto, 2010), seus efeitos nas funções

Discussão

1 exócrina e endócrina pancreática foram previamente relatados (Long, R. *et al.*, 1980;
2 Mott *et al.*, 1989; Nagajyothi *et al.*, 2013), embora seus mecanismos ainda sejam
3 obscuros. Estudos clássicos na doença de Chagas estabeleceram distúrbios
4 metabólicos relacionados à função pancreática, com repercussões funcionais no
5 metabolismo de carboidratos na forma crônica da doença, especialmente curvas
6 glicêmicas, dosagem de insulina plasmática e glucagon anormais, mesmo quando o
7 comprometimento digestivo não é evidente (Vieira e Hadler, 1961).

8 Estes estudos sugerem que lesões da inervação intrínseca pancreática
9 poderiam explicar, ao menos em parte, distúrbios metabólicos relacionados à função
10 pancreática (Campos e Cançado, 1962; Reis *et al.*, 1965; Vieira *et al.*, 1970; Vieira e
11 Meneghelli, 1970; Oliveira *et al.*, 1993). Distúrbios no metabolismo de carboidratos,
12 como alterações no metabolismo da glicose e resposta à insulina estão associadas
13 com doença de Chagas crônica, tendo sido associadas com diversos mecanismos,
14 como: parasitismo local, inflamação crônica ou denervação parcial das ilhotas
15 pancreáticas (IP) (Vieira *et al.*, 1970; Rocha *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999).

16 Saldanha e colaboradores demonstraram alterações na resposta insulínica e
17 glicêmica após testes de tolerância oral à glicose em pacientes com doença de
18 Chagas. Os pacientes com mega-síndromes tinham aumento do tamanho das
19 ilhotas pancreáticas e houve inflamação nos gânglios pancreáticos e possivelmente
20 o funcionamento das IP (ilhota pancreática) são modulados por estímulos da
21 infecção por *T. cruzi* (Saldanha *et al.*, 2001).

22 De fato, estudo em pacientes chagásicos demonstrou aumento das ilhotas
23 pancreáticas (Teixeira *et al.*, 1989). Obviamente, embora neste estudo não haja
24 dados acerca da carga parasitária, levando em conta a cronicidade da infecção e as
25 capacidades de estabelecimento da mesma em humanos com baixos inóculos

Discussão

1 podem estabelecer um paralelo com nossos dados, cujo menor inóculo levou à
2 maior parasitismo tecidual e redução da área das ilhotas pancreáticas. Neste
3 sentido, estudos prévios relacionam o tamanho das ilhotas pancreáticas com maior
4 capacidade de secreção tanto de insulina quanto de glucagon (Hayek e Woodside,
5 1979; Reaven e Reaven, 1981).

6 Os efeitos da infecção por *T. cruzi* na morfologia e, especialmente, na função
7 pancreática em humanos e modelos animais apresentam dados conflitantes, embora
8 possamos estabelecer que os efeitos neste órgão são repetidamente observados,
9 mesmo variando a espécie hospedeira, carga parasitária e cepa infectante. A
10 infecção aguda de camundongos CD-1 com *T. cruzi*, cepa Brasil desencadeou
11 severa hipoglicemia com mortalidade associada (Combs *et al.*, 2005).

12 Dos Santos e colaboradores também encontraram níveis de glicemia e
13 insulina plasmática reduzida em hamsters infectados com *T. cruzi* (Dos Santos *et al.*,
14 2004). Ratos infectados (3×10^5 tripomastigotas de cepa Y) apresentam alterações
15 no metabolismo da glicose, com hiperglicemia após o teste oral de tolerância à
16 glicose (OGTT) e teste de tolerância à insulina (ITT), mas sem alterações na
17 arquitetura pancreática apesar da pancreatite concomitante (Novaes *et al.*, 2012).
18 Além disso, relatos anteriores apontam que os camundongos CD-1 infectados com
19 5×10^4 tripomastigotas da cepa Brasil de *T. cruzi* apresentam glicemia reduzida após
20 o teste de tolerância ao piruvato e níveis reduzidos de insulina tanto em fase aguda
21 (30 dpi – dias pós-infecção) quanto crônica (130 dpi). Apesar da diferença nos
22 inóculos, essas alterações coincidem com o pico de parasitemia (30-35 dpi) e são
23 subsequentes ao parasitismo pancreático e infiltrado inflamatório acentuado (15 dpi)
24 (Nagajyothi *et al.*, 2012).

Discussão

1 Embora sem avaliar alterações morfológicas e parasitismo pancreático um
2 estudo recente com camundongos C57BL/6J também infectados, 1×10^2
3 tripomastigotas sanguíneas de cepa Tulahuén demonstrou redução de peso e
4 aumento da resistência insulínica (Onofrio *et al.*, 2015). Interessantemente, a
5 infecção de camundongos com *T. cruzi* em modelo de indução de diabetes leva a
6 maiores parasitemias e mortalidade elevada, efeitos revertidos com a administração
7 de insulina e recuperação dos níveis normais de glicemia (Tanowitz *et al.*, 1988),
8 sugerindo, ainda que parcialmente, o efeito da alteração do eixo insulina-glicemia
9 como fator predisponente à mortalidade.

10 A hipoglicemia observada em nosso e em outros estudos também pode estar
11 fortemente associada com aumento da captação de glicose pelo parasita (Cannata e
12 Cazzulo, 1984). Embora a hipoglicemia seja um achado amplamente descrito para a
13 doença de Chagas está, de certa forma, no caminho inverso de um grande número
14 de quadros infecciosos, cuja hiperglicemia e resistência insulínica é um achado mais
15 comum (Mcguinness, 2005).

16

1 7 CONCLUSÕES

2

3 I. O comportamento da massa corporal dos animais avaliados apresentaram,
4 nos animais GI, variações de diminuição de peso na fase aguda e início da
5 fase crônica sendo expressivos seus valores ($p < 0,05$) entre o 7º e 36º dia,
6 seguindo uma tendência à normalização e sobre peso comparado com GC no
7 final da fase crônica de nosso modelo experimental.

8 II. Existiu mortalidade de 52%, entre o 12º e 36º dia, dos animais infectados com
9 maior inóculo (GI – 3×10^4) diferentemente do grupo infectado de menor
10 inóculo que não houve mortalidade (GI – 3×10^3) juntamente no grupo
11 controle.

12 III. Houve comportamento ascendente de característica logarítmica das
13 parasitemias acompanhadas nos diferentes grupos infectados. Após
14 inoculações, os grupos apresentaram decréscimo da parasitemia até o 28º dia
15 o que ampara o término da fase aguda da doença.

16 IV. Na análise morfológica de positividade ao *T. cruzi* cepa “Y” nos diferentes
17 cortes experimentais por imunohistoquímica (IHQ) foi factual para detecção
18 reativa do antígeno, em microscopia ótica, quanto à presença de ninhos de
19 amastigotas no tecido pancreático.

20 V. A quantificação do número de ninhos de amastigotas de *T. cruzi* cepa “Y”
21 e/ou depósitos granulares mostraram aumento nos grupos analisados, sendo
22 o GI de menor inóculo apresentou maior densidade parasitária.

23

Conclusões

- 1 VI. No exame histopatológico dos pâncreas não foram observadas alterações em
2 100% dos animais do grupo controle. Nos grupos infectados é legítimo a
3 presença infiltrado inflamatório a partir do 7° dia da infecção e os animais com
4 inóculo menor (3×10^3 formas tripomastigotas) apresentaram mais infiltrado
5 inflamatório pancreático.
- 6 VII. Animais com inóculo menor (3×10^3 formas tripomastigotas) apresentaram na
7 morfometria maior média das áreas das ilhotas pancreáticas.
- 8 VIII. Níveis de glicemia foram encontradas de forma reduzida em camundongos
9 infectados com *T. cruzi* tanto na fase aguda como crônica da doença, estando
10 evidente na fase aguda.
- 11 IX. Níveis de concentração do hormônio insulina plasmática reduziram nos
12 camundongos infectados com *T. cruzi*.

13

14 Conclusão geral

15 Tomados em conjunto nossos dados apontam que a infecção por *Trypanosoma*
16 *cruzi* conduz ao parasitismo e conseqüente alteração morfológica e funcional no
17 pâncreas de forma inóculo dependente. Enquanto que a alta carga parasitária induz
18 a uma infecção aguda agressiva, com alta parasitemia, mortalidade e menor
19 parasitismo tecidual, com ligeiras alterações pancreáticas (estruturais e funcionais),
20 uma menor carga parasitária arrasta um acentuado parasitismo pancreático, com
21 intenso infiltrado inflamatório associado, diminuição da área das ilhotas pancreáticas
22 associado com menor insulina plasmática e menor glicemia. De forma interessante,
23 na fase crônica da infecção, camundongos com diferentes inóculos comportaram de
24 maneira semelhante, com manutenção de parasitismo e inflamação pancreática e
25 menor insulina plasmática. Essas diferentes alterações pancreáticas frente às

Tese de Doutorado - César Augusto Franco Abrahão

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Conclusões

- 1 diferentes cargas parasitárias podem ser importantes peças no quebra-cabeça da
- 2 ampla variação de alterações clínicas e metabólicas associadas com a doença de
- 3 Chagas.

1 8 REFERÊNCIAS

2

3

4 ABEL, L. C.; KALIL, J.; CUNHA NETO, E. Molecular mimicry between cardiac
5 myosin and Trypanosoma cruzi antigen B13: identification of a B13-driven human T
6 cell clone that recognizes cardiac myosin. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 11, p.
7 1305-8, Nov 1997. ISSN 0100-879X (Print)

8 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9532238>
9 >.

10

11 ALBUQUERQUE, S. et al. Doença de chagas experimental em ratos. Histopatologia
12 do pâncreas e estudo de alguns constituintes metabólicos e fisiológicos. **Ver. Ciênc.**
13 **Farm.**, v. 13, p. 201, 1991.

14

15 ALMEIDA, I. C. et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from
16 Trypanosoma cruzi are potent proinflammatory agents. **EMBO J**, v. 19, n. 7, p. 1476-
17 85, Apr 03 2000. ISSN 0261-4189 (Print)

18 0261-4189 (Linking). Disponível em: <
19 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747016> >.

20

21 ALMEIDA, I. C. et al. Trypanosoma cruzi mucins: potential functions of a complex
22 structure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 173-6, 1999. ISSN 0074-0276
23 (Print)

Referências

- 1 0074-0276 (Linking). Disponível em: <
 2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677709> >.
 3
- 4 ANDRADE, S. G. Influence of Trypanosoma cruzi strain on the pathogenesis of
 5 chronic myocardopathy in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 17-27, Jan-
 6 Mar 1990. ISSN 0074-0276 (Print)
- 7 0074-0276 (Linking). Disponível em: <
 8 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2215229)
 9 [tion&list_uids=2215229](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2215229) >.
 10
- 11 ANDRADE, S. G. et al. Interstitial dendritic cells of the heart harbor Trypanosoma
 12 cruzi antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of
 13 chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 63, n. 1-2, p. 64-70, Jul-Aug 2000.
 14 ISSN 0002-9637 (Print)
- 15 0002-9637 (Linking). Disponível em: <
 16 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11357998)
 17 [tion&list_uids=11357998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11357998) >.
 18
- 19 ANDRADE, S. G. et al. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected
 20 with Trypanosoma cruzi, under specific chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.
 21 86, n. 2, p. 187-200, Apr-Jun 1991. ISSN 0074-0276 (Print)

Referências

- 1 0074-0276 (Linking). Disponível em: <
 2 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1842413)
 3 [tion&list_uids=1842413](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1842413) >.
 4
- 5 BERN, C. et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a
 6 systematic review. **Jama**, v. 298, n. 18, p. 2171-81, Nov 14 2007. ISSN 1538-3598
 7 (Electronic). Disponível em: <
 8 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18000201)
 9 [tion&list_uids=18000201](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18000201) >.
 10
- 11 BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts
 12 of an old disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 2, p. 67-74, Mar-Apr
 13 2008. ISSN 0036-4665 (Print)
 14 0036-4665 (Linking). Disponível em: <
 15 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18488083> >.
 16
- 17 BONNEAUD, C. et al. Assessing the cost of mounting an immune response. **The**
 18 **American Naturalist**, v. 161, n. 3, p. 367-379, 2003. ISSN 0003-0147.
 19
- 20 BORGES, D. C. et al. Different parasite inocula determine the modulation of the
 21 immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.
 22 **Immunology**, v. 138, n. 2, p. 145-156, 2013. ISSN 1365-2567.
 23

Referências

- 1 BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, v. 27, p. 347-82,
2 1973. ISSN 0066-4227 (Print)
3 0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4201691>
4 >.
5
- 6 BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanossoma cruzi e Doença**
7 **de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431.
8
- 9 BUEKENS, P. et al. Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North
10 America: why don't we do more? **Matern Child Health J**, v. 12, n. 3, p. 283-6, May
11 2008. ISSN 1092-7875 (Print). Disponível em: <
12 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17602289)
13 [tion&list_uids=17602289](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17602289) >.
14
- 15 BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi*
16 invasion of mammalian cells. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 175-200, 1995. ISSN
17 0066-4227 (Print)
18 0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561458>
19 >.
20
- 21 CALABRESE, K.; LAGRANGE, P.; DA COSTA, S. *Trypanosoma cruzi*:
22 histopathology of endocrine system in immunocompromised mice. **International**
23 **journal of experimental pathology**, v. 75, n. 6, p. 453, 1994.

Referências

- 1
- 2 CAMPOS, J.; CANÇADO, J. Curvas glicêmicas anormais observadas em pacientes
3 com a forma crônica da moléstia da Chagas. **O Hospital**, v. 62, p. 275-278, 1962.
- 4
- 5 CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T. Trypanosoma cruzi and its components as
6 exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors.
7 **Mediators Inflamm**, v. 13, n. 3, p. 139-43, Jun 2004. ISSN 0962-9351 (Print).
8 Disponível em: <
9 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15223603)
10 [tion&list_uids=15223603](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15223603) >.
- 11
- 12 CANNATA, J. J.; CAZZULO, J. J. The aerobic fermentation of glucose by
13 Trypanosoma cruzi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B:**
14 **Comparative Biochemistry**, v. 79, n. 3, p. 297-308, 1984. ISSN 0305-0491.
- 15
- 16 CAPUA, I. et al. Influenza A viruses grow in human pancreatic cells and cause
17 pancreatitis and diabetes in an animal model. **J Virol**, v. 87, n. 1, p. 597-610, Jan
18 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic)
19 0022-538X (Linking). Disponível em: <
20 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097451> >.
- 21

Referências

- 1 CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo
 2 evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade
 3 morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218,
 4 1909. ISSN 0074-0276.
 5
- 6 COMBS, T. P. et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi*
 7 infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 24085-24094, 2005.
 8 ISSN 0021-9258.
 9
- 10 CORBETT, C. E. P. et al. Pancreatic lesions in acute experimental Chagas' disease.
 11 **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 57, p. 63-66, 2002a. ISSN 0041-8781.
 12 Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0041-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0041-87812002000200003&nrm=iso)
 13 [87812002000200003&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0041-87812002000200003&nrm=iso) >.
 14
- 15 _____. Pancreatic lesions in acute experimental Chagas' disease. **Revista do**
 16 **Hospital das Clínicas**, v. 57, n. 2, p. 63-66, 2002b. ISSN 0041-8781.
 17
- 18 CORREA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development
 19 of severe clinical forms of human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94
 20 Suppl 1, p. 253-5, 1999. ISSN 0074-0276 (Print)
 21 0074-0276 (Linking). Disponível em: <
 22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677728> >.
 23

Referências

1 COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed-A background
2 article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007. ISSN
3 0074-0276.

4

5 COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas
6 disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p.
7 31-40, Jul 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic)

8 0074-0276 (Linking). Disponível em: <

9 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19753455)
10 [tion&list_uids=19753455](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19753455) >.

11

12 COURA, J. R.; VINAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. Ecoepidemiology, short history and
13 control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-
14 endemic countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856-62, Nov 2014.
15 ISSN 1678-8060 (Electronic)

16 0074-0276 (Linking). Disponível em: <

17 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410988> >.

18

19 DA SILVA, T. A. et al. Data on morphometric analysis of the pancreatic islets from
20 C57BL/6 and BALB/c mice. **Data Brief**, v. 8, p. 1094-8, Sep 2016. ISSN 2352-3409
21 (Print)

22 2352-3409 (Linking). Disponível em: <

23 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27508270> >.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Referências

- 1
- 2 DE SCORZA, C.; HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. Trypanosoma
3 (Schizotrypanum) cruzi: histopathology in mice infected with strains isolated from
4 Didelphis marsupialis from the valley of Caracas (Venezuela). **Acta científica**
5 **venezolana**, v. 47, n. 4, p. 244-247, 1995. ISSN 0001-5504.
- 6
- 7 DIAS, J. C.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas
8 disease control: in search of a realistic analysis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n.
9 2, p. 193-6, Mar-Apr 2008. ISSN 0037-8682 (Print). Disponível em: <
10 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18545843)
11 [tion&list_uids=18545843](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18545843) >.
- 12
- 13 DIAS, J. C. et al. 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Rev Soc**
14 **Bras Med Trop**, v. 49Suppl 1, n. Suppl 1, p. 3-60, Dec 2016. ISSN 1678-9849
15 (Electronic)
16 0037-8682 (Linking). Disponível em: <
17 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27982292> >.
- 18
- 19 DOS SANTOS, V. M. et al. [Frequency of precordialgia in chagasic and non-
20 chagasic women]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 1, p. 59-64, Jan-Feb 1998.
21 ISSN 0037-8682 (Print)
22 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9477699>
23 >.

Referências

- 1
- 2 DOS SANTOS, V. M. et al. Functional and histopathological study of the pancreas in
3 hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*.
4 **Parasitology research**, v. 94, n. 2, p. 125-133, 2004. ISSN 0932-0113.
5
- 6 DUTRA, W. O. et al. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential
7 expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively.
8 **Scand J Immunol**, v. 51, n. 1, p. 91-7, Jan 2000. ISSN 0300-9475 (Print)
9 0300-9475 (Linking). Disponível em: <
10 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10632982> >.
11
- 12 DUTRA, W. O. et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their
13 circulating T lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 43, n. 1, p. 88-93, Jan 1996. ISSN
14 0300-9475 (Print)
15 0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8560201>
16 >.
17
- 18 DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human
19 Chagas disease. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 12, p. 581-7, Dec 2005. ISSN 1471-
20 4922 (Print). Disponível em: <
21 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita
22 tion&list_uids=16236550](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16236550) >.
23

Referências

- 1 ELASED, K.; PLAYFAIR, J. H. Hypoglycemia and hyperinsulinemia in rodent models
 2 of severe malaria infection. **Infect Immun**, v. 62, n. 11, p. 5157-60, Nov 1994. ISSN
 3 0019-9567 (Print)
 4 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927799>
 5 >.
 6
- 7 ELASED, K. M.; PLAYFAIR, J. H. Reversal of hypoglycaemia in murine malaria by
 8 drugs that inhibit insulin secretion. **Parasitology**, v. 112 (Pt 6), p. 515-21, Jun 1996.
 9 ISSN 0031-1820 (Print)
 10 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8684825>
 11 >.
 12
- 13 FERREIRA, L. F. et al. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected
 14 tissues from Chilean mummies. **Acta Trop**, v. 75, n. 1, p. 79-84, Feb 25 2000. ISSN
 15 0001-706X (Print). Disponível em: <
 16 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10708009)
 17 [tion&list_uids=10708009](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10708009) >.
 18
- 19 FRAGATA FILHO, A. A.; DA SILVA, M. A.; BOAINAIN, E. Etiologic treatment of
 20 acute and chronic Chagas' Disease [corrected]. **Sao Paulo Med J**, v. 113, n. 2, p.
 21 867-72, Mar-Apr 1995. ISSN 1516-3180 (Print)
 22 1516-3180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650489>
 23 >.

Referências

1

2 FREIRE-DE-LIMA, C. G. et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a
3 pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, n. 6766, p. 199-203, Jan
4 13 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

5 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
6 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10646605> >.

7

8 GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States
9 and other non-endemic countries. **Acta tropica**, v. 115, n. 1, p. 22-27, 2010. ISSN
10 0001-706X.

11

12 GEORGE, D. T.; RAYFIELD, E. J.; WANNEMACHER, R. W., JR. Altered
13 glucoregulatory hormones during acute pneumococcal sepsis in the rhesus monkey.
14 **Diabetes**, v. 23, n. 6, p. 544-9, Jun 1974. ISSN 0012-1797 (Print)

15 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4152019>
16 >.

17

18 GERAIX, J. et al. Clinical and nutritional profile of individuals with Chagas disease.
19 **Braz J Infect Dis**, v. 11, n. 4, p. 411-4, Aug 2007. ISSN 1413-8670 (Print)

20 1413-8670 (Linking). Disponível em: <
21 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17873995> >.

22

Referências

- 1 GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity,
 2 parasite persistence, or both? **Trends Parasitol**, v. 19, n. 1, p. 19-22, Jan 2003.
 3 ISSN 1471-4922 (Print)
 4 1471-4922 (Linking). Disponível em: <
 5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488221> >.
 6
- 7 GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the
 8 pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, n. 5, p. 399-409, Aug 2004.
 9 ISSN 0891-6934 (Print)
 10 0891-6934 (Linking). Disponível em: <
 11 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15621564> >.
 12
- 13 GRAHAM, K. L. et al. Rotavirus infection accelerates type 1 diabetes in mice with
 14 established insulinitis. **J Virol**, v. 82, n. 13, p. 6139-49, Jul 2008. ISSN 1098-5514
 15 (Electronic)
 16 0022-538X (Linking). Disponível em: <
 17 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417562> >.
 18
- 19 GUARIENTO, M. E. et al. Heterogenous insulin response to an oral glucose load by
 20 patients with the indeterminate clinical form of Chagas' disease. **Braz J Med Biol**
 21 **Res**, v. 26, n. 5, p. 491-5, May 1993. ISSN 0100-879X (Print)
 22 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257938>
 23 >.

Referências

1

2 GUTIERREZ, F. R. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas
3 heart disease. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 11, p. 673-85, Nov 2009. ISSN 1365-
4 3024 (Electronic)

5 0141-9838 (Linking). Disponível em: <

6 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19825107> >.

7

8 HATCHER, F. M. et al. Increased natural killer cell activity in experimental American
9 trypanosomiasis. **J Immunol**, v. 127, n. 3, p. 1126-30, Sep 1981. ISSN 0022-1767
10 (Print)

11 0022-1767 (Linking). Disponível em: <

12 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita
13 tion&list_uids=6790614](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6790614) >.

14

15 HAYEK, A.; WOODSIDE, W. Correlation between morphology and function in
16 isolated islets of the Zucker rat. **Diabetes**, v. 28, n. 6, p. 565-569, 1979. ISSN 0012-
17 1797.

18

19 HUANG, H. et al. Activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in murine
20 Chagasic myocarditis. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2859-67, May 2003. ISSN 0019-
21 9567 (Print)

22 0019-9567 (Linking). Disponível em: <

23 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704159> >.

pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Get yours now!

"Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's" A.Sarras - USA

Referências

1

2 HUANG, H. et al. Trypanosoma cruzi infection (Chagas' disease) of mice causes
3 activation of the mitogen-activated protein kinase cascade and expression of
4 endothelin-1 in the myocardium. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p.
5 S148-50, Nov 2000. ISSN 0160-2446 (Print)

6 0160-2446 (Linking). Disponível em: <
7 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078362> >.

8

9 HUNTER, C. A. et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during
10 infection with Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v. 158, n. 7, p. 3311-6, Apr 01 1997.
11 ISSN 0022-1767 (Print)

12 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9120288>
13 >.

14

15 JU, H.; DIXON, I. M. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. **Can J**
16 **Cardiol**, v. 12, n. 12, p. 1259-67, Dec 1996. ISSN 0828-282X (Print)

17 0828-282X (Linking). Disponível em: <
18 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8987966)
19 [tion&list_uids=8987966](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8987966) >.

20

21 JUN, H. S.; YOON, J. W. A new look at viruses in type 1 diabetes. **Diabetes Metab**
22 **Res Rev**, v. 19, n. 1, p. 8-31, Jan-Feb 2003. ISSN 1520-7552 (Print)

Referências

- 1 1520-7552 (Linking). Disponível em: <
2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12592641> >.
3
- 4 KIERSZENBAUM, F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease
5 pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 1-11, Jun 10 2003.
6 ISSN 0928-8244 (Print). Disponível em: <
7 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12770754)
8 [tion&list_uids=12770754](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12770754) >.
9
- 10 KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in
11 triatominae. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 381-7, Sep 2000. ISSN 0169-4758
12 (Print)
13 0169-4758 (Linking). Disponível em: <
14 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951597> >.
15
- 16 LANA, M. D.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L. Experimental Chagas' disease in dogs.
17 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 59-71, 1992. ISSN 0074-0276.
18 Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761992000100011&nrm=iso)
19 [02761992000100011&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761992000100011&nrm=iso) >.
20
- 21 LAURIA-PIRES, L. et al. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after
22 treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. **The American journal of**

Referências

-
- 1 **tropical medicine and hygiene**, v. 63, n. 3-4, p. 111-118, 2000. ISSN 0002-9637.
2 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11388500> >.
3
- 4 LEMOS, J. R. D. et al. Influence of parasite load on renal function in mice acutely
5 infected with *Trypanosoma cruzi*. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71772, 2013. ISSN 1932-
6 6203.
7
- 8 LENZI, H. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine
9 acute infection. 1996. ISSN 0014-4894.
10
- 11 LEVITUS, G. et al. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic
12 Chagas heart disease. **Clin Exp Immunol**, v. 85, n. 3, p. 413-7, Sep 1991. ISSN
13 0009-9104 (Print)
14 0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1893622>
15 >.
16
- 17 LONG, R. et al. Response of plasma pancreatic and gastrointestinal hormones and
18 growth hormone to oral and intravenous glucose and insulin hypoglycaemia in
19 Chagas's disease. **Gut**, v. 21, n. 9, p. 772-777, 1980. ISSN 1468-3288.
20

Referências

- 1 LONG, R. G. et al. Neural and hormonal peptides in rectal biopsy specimens from
2 patients with Chagas' disease and chronic autonomic failure. **Lancet**, v. 1, n. 8168 Pt
3 1, p. 559-62, Mar 15 1980. ISSN 0140-6736 (Print)
4 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6153742>
5 >.
6
- 7 LOPES, M. F. et al. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in
8 experimental Chagas' disease. **J Immunol**, v. 154, n. 2, p. 744-52, Jan 15 1995.
9 ISSN 0022-1767 (Print)
10 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814881>
11 >.
12
- 13 LOPES, M. F.; DOSREIS, G. A. Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in
14 experimental Chagas' disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 28, n. 8, p. 913-8, Aug 1995.
15 ISSN 0100-879X (Print)
16 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555995>
17 >.
18
- 19 MANARIN, R. et al. Reciprocal influences between leptin and glucocorticoids during
20 acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Medical microbiology and immunology**, v.
21 202, n. 5, p. 339-352, 2013. ISSN 0300-8584.
22

Referências

- 1 MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage
2 activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004.
3 ISSN 1471-4906 (Print)
4 1471-4906 (Linking). Disponível em: <
5 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839> >.
6
- 7 MARINHO, C. R. et al. Influence of acute-phase parasite load on pathology,
8 parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas'
9 disease. **Infect Immun**, v. 67, n. 1, p. 308-18, Jan 1999. ISSN 0019-9567 (Print)
10 0019-9567 (Linking). Disponível em: <
11 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9864231)
12 [tion&list_uids=9864231](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9864231) >.
13
- 14 MCGUINNESS, O. P. Defective glucose homeostasis during infection. **Annu. Rev.**
15 **Nutr.**, v. 25, p. 9-35, 2005. ISSN 0199-9885.
16
- 17 MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J**
18 **Parasitol**, v. 64, n. 3, p. 475-82, Jun 1978. ISSN 0022-3395 (Print)
19 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/96243> >.
20
- 21 MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. An update on Chagas disease (human American
22 trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 8, p.
23 663-677, 2006. ISSN 0003-4983.

Referências

1

2 MORET, Y.; SCHMID-HEMPEL, P. Survival for immunity: the price of immune
3 system activation for bumblebee workers. **Science**, v. 290, n. 5494, p. 1166-1168,
4 2000. ISSN 0036-8075.

5

6 MOTT, C. D. B. et al. Hormônios gastro-êntero-pancreáticos em portadores de
7 doença de Chagas crônica. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo**, v. 44, n.
8 2, p. 63-72, 1989. ISSN 0041-8781.

9

10 NAGAJYOTHI, F. et al. Alterations in glucose homeostasis in a murine model of
11 Chagas disease. **Am J Pathol**, v. 182, n. 3, p. 886-94, Mar 2013. ISSN 1525-2191
12 (Electronic)

13 0002-9440 (Linking). Disponível em: <
14 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23321322> >.

15

16 NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas
17 disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 634-43, May 2012. ISSN 1462-5822
18 (Electronic)

19 1462-5814 (Linking). Disponível em: <
20 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309180> >.

21

Referências

- 1 NARDY, A. F.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A. Immune Evasion Strategies of
2 Trypanosoma cruzi. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015. ISSN 2314-
3 8861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2015/178947> >.
4
- 5 NOVAES, R. D. et al. Trypanosoma cruzi infection alters glucose metabolism at rest
6 and during exercise without modifying the morphology of pancreatic islets in rats.
7 **Pathol Res Pract**, v. 208, n. 8, p. 480-8, Aug 15 2012. ISSN 1618-0631 (Electronic)
8 0344-0338 (Linking). Disponível em: <
9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749578> >.
10
- 11 OLIVEIRA, L. et al. Blood glucose and insulin response to intravenous glucose by
12 patients with chronic Chagas' disease and alcoholism. **Brazilian journal of medical
13 and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e
14 biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]**, v. 26, n. 11, p. 1187-1190,
15 1993. ISSN 0100-879X.
16
- 17 ONOFRIO, L. I. et al. Trypanosoma cruzi infection is a potent risk factor for non-
18 alcoholic steatohepatitis enhancing local and systemic inflammation associated with
19 strong oxidative stress and metabolic disorders. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p.
20 e0003464, Feb 2015. ISSN 1935-2735 (Electronic)
21 1935-2727 (Linking). Disponível em: <
22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25668433> >.
23

Referências

- 1 ORTIZ-ORTIZ, L. et al. Enhanced mononuclear phagocytic activity during
 2 Trypanosoma cruzi infection in mice. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 50, n. 2, p.
 3 232-42, 1976. ISSN 0020-5915 (Print)
 4 0020-5915 (Linking). Disponível em: <
 5 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=812831)
 6 [tion&list_uids=812831](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=812831) >.
 7
- 8 PEREIRA, J. B.; COURA, J. R. [Morbidity of Chagas disease. Cross sectional study
 9 in an endemic area, Virgem da Lapa, Minas Gerais]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 19,
 10 n. 3, p. 139-48, Jul-Sep 1986. ISSN 0037-8682 (Print)
 11 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3120255>
 12 >.
 13
- 14 PÉREZ, A. R.; BOTTASSO, O.; SAVINO, W. The impact of infectious diseases upon
 15 neuroendocrine circuits. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 96-105, 2009.
 16 ISSN 1423-0216.
 17
- 18 PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for interleukin-1 beta in Trypanosoma
 19 cruzi-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infect Immun**, v. 71, n. 8, p. 4441-7, Aug
 20 2003. ISSN 0019-9567 (Print)
 21 0019-9567 (Linking). Disponível em: <
 22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874323> >.
 23

Referências

- 1 PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins
 2 mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute
 3 Trypanosoma cruzi infection. **Cell Immunol**, v. 193, n. 1, p. 90-8, Apr 10 1999. ISSN
 4 0008-8749 (Print)
 5 0008-8749 (Linking). Disponível em: <
 6 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10202116)
 7 [tion&list_uids=10202116](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10202116) >.
 8
- 9 PINTO DIAS, J. C. Human chagas disease and migration in the context of
 10 globalization: some particular aspects. **J Trop Med**, v. 2013, p. 789758, 2013. ISSN
 11 1687-9686 (Print)
 12 1687-9686 (Linking). Disponível em: <
 13 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23606862> >.
 14
- 15 PROCOPIO, D. O. et al. Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF-
 16 alpha and IL-12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli. **Br J**
 17 **Pharmacol**, v. 127, n. 5, p. 1195-205, Jul 1999. ISSN 0007-1188 (Print)
 18 0007-1188 (Linking). Disponível em: <
 19 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10455266> >.
 20
- 21 RAMIREZ, L. E. et al. The hamster (mesocricetus auratus) as experimental model in
 22 chagas' disease: parasitological and histopathological studies in acute and chronic
 23 phases of Trypanosoma cruzi infection. **Revista da Sociedade Brasileira de**

Referências

- 1 **Medicina Tropical**, v. 27, p. 157-162, 1994. ISSN 0037-8682. Disponível em: <
 2 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821994000300007&nrm=iso)
 3 [86821994000300007&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821994000300007&nrm=iso) >.
 4
- 5 RASSI, A., JR.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol**, v.
 6 23, n. 12, p. 883-9, Dec 2000. ISSN 0160-9289 (Print)
 7 0160-9289 (Linking). Disponível em: <
 8 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129673> >.
 9
- 10 RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n.
 11 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)
 12 0140-6736 (Linking). Disponível em: <
 13 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.
 14
- 15 RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p.
 16 1388-1402, 2010. ISSN 0140-6736.
 17
- 18 RATTANATAWEEBOON, P.; VILAICHONE, W.; VANNASAENG, S. Stress
 19 hyperglycemia in patients with sepsis. **J Med Assoc Thai**, v. 92 Suppl 2, p. S88-94,
 20 Mar 2009. ISSN 0125-2208 (Print)
 21 0125-2208 (Linking). Disponível em: <
 22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19562991> >.
 23

Referências

- 1 REAVEN, E.; REAVEN, G. Structure and function changes in the endocrine
2 pancreas of aging rats with reference to the modulating effects of exercise and
3 caloric restriction. **Journal of Clinical Investigation**, v. 68, n. 1, p. 75, 1981.
4
- 5 REED, S. G. Immunology of Trypanosoma cruzi infections. **Chem Immunol**, v. 70, p.
6 124-43, 1998. ISSN 1015-0145 (Print)
7 0079-6034 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9509673>
8 >.
9
- 10 REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic
11 myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of
12 granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May
13 1993. ISSN 0002-9637 (Print)
14 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8517482>
15 >.
16
- 17 REIS, L.; VICHI, F.; PRETO, R. ESTUDOS S OBRE O METABOLISMO DOS
18 HIDRATOS DE CARBONO NA MOL'ESTIA DE CHAGAS. II. A PROVA DE
19 GLUCAGON. **Rev Assoc Med Bras**, v. 11, p. 61-65, 1965. ISSN 0004-5241.
20
- 21 REIS MACHADO, J. et al. Immunopathological aspects of experimental
22 Trypanosoma cruzi reinfections. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 648715, 2014. ISSN

Referências

- 1 2314-6141 (Electronic). Disponível em: <
 2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050370> >.
 3
- 4 RICHER, M. J.; HORWITZ, M. S. Coxsackievirus infection as an environmental factor
 5 in the etiology of type 1 diabetes. **Autoimmun Rev**, v. 8, n. 7, p. 611-5, Jun 2009.
 6 ISSN 1873-0183 (Electronic)
 7 1568-9972 (Linking). Disponível em: <
 8 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393207> >.
 9
- 10 RIERA, C. et al. Congenital transmission of Trypanosoma cruzi in Europe (Spain): a
 11 case report. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 6, p. 1078-81, Dec 2006. ISSN 0002-
 12 9637 (Print). Disponível em: <
 13 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17172369)
 14 [tion&list_uids=17172369](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17172369) >.
 15
- 16 ROCHA, A. et al. Despopulação neuronal pancreática em chagásicos crônicos.
 17 **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 43-49, 1998.
 18 ISSN 0037-8682. Disponível em: <
 19 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821998000100006&nrm=iso)
 20 [86821998000100006&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821998000100006&nrm=iso) >.
 21
- 22 ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening
 23 and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.

Referências

- 1 105, p. 233-238, 2010. ISSN 0074-0276. Disponível em: <
 2 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000200022&nrm=iso)
 3 [02762010000200022&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000200022&nrm=iso) >.
 4
- 5 ROPERT, C. et al. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B
 6 phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by
 7 macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by
 8 glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial
 9 lipopolysaccharide. **J Immunol**, v. 166, n. 5, p. 3423-31, Mar 01 2001. ISSN 0022-
 10 1767 (Print)
 11 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
 12 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207300> >.
 13
- 14 ROPERT, C. et al. Inhibition of a p38/stress-activated protein kinase-2-dependent
 15 phosphatase restores function of IL-1 receptor-associate kinase-1 and reverses Toll-
 16 like receptor 2- and 4-dependent tolerance of macrophages. **J Immunol**, v. 171, n. 3,
 17 p. 1456-65, Aug 01 2003. ISSN 0022-1767 (Print)
 18 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
 19 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874238> >.
 20
- 21 SALDANHA, J. C. et al. Morphologic and morphometric evaluation of pancreatic
 22 islets in chronic Chagas' disease. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v. 56, n. 5, p.
 23 131-8, Sep-Oct 2001. ISSN 0041-8781 (Print)

Referências

- 1 0041-8781 (Linking). Disponível em: <
2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781592> >.
3
- 4 SÁNCHEZ-GUILLÉN, M. et al. High prevalence anti-Trypanosoma cruzi antibodies,
5 among blood donors in the State of Puebla, a non-endemic area of Mexico.
6 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 947-952, 2002. ISSN 0074-
7 0276.
8
- 9 SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. The immunology of experimental Chagas'
10 disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. **J Exp Med**, v. 140, n. 1, p. 38-
11 53, Jul 1 1974. ISSN 0022-1007 (Print)
12 0022-1007 (Linking). Disponível em: <
13 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4209357)
14 [tion&list_uids=4209357](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4209357) >.
15
- 16 SANTOS, V. M. D. et al. Alterações anatomopatológicas do pâncreas em
17 chagásicas crônicas: dados preliminares. **Arq. gastroenterol**, v. 36, n. 3, p. 127-32,
18 1999. ISSN 0004-2803.
19
- 20 SAÚDE, M. D. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013.
21 **Bol Epidemiol.** 2015. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 46, n. 21, p. 1-9, 2015.
22

Referências

- 1 SCHNARE, M. et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune
 2 responses. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 947-50, Oct 2001. ISSN 1529-2908 (Print)
 3 1529-2908 (Linking). Disponível em: <
 4 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11547333> >.
 5
- 6 SILVA, A. C. et al. Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal
 7 stem cells from human adipose tissue. **Transplant Proc**, v. 44, n. 8, p. 2495-6, Oct
 8 2012. ISSN 1873-2623 (Electronic)
 9 0041-1345 (Linking). Disponível em: <
 10 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026628> >.
 11
- 12 SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the
 13 pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci**, v. 8, p. s314-25, May 01 2003. ISSN
 14 1093-9946 (Print)
 15 1093-4715 (Linking). Disponível em: <
 16 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12877141> >.
 17
- 18 SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental
 19 Trypanosoma cruzi infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169-74, Jan 1 1992. ISSN
 20 0022-1007 (Print). Disponível em: <
 21 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1730915)
 22 [tion&list_uids=1730915](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1730915) >.
 23

Referências

- 1 SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of Trypanosoma cruzi
 2 infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp**
 3 **Med**, v. 174, n. 3, p. 539-45, Sep 1 1991. ISSN 0022-1007 (Print)
 4 0022-1007 (Linking). Disponível em: <
 5 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1908509)
 6 [tion&list_uids=1908509](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1908509) >.
 7
- 8 TANOWITZ, H. B. et al. Trypanosoma cruzi infection in diabetic mice. **Trans R Soc**
 9 **Trop Med Hyg**, v. 82, n. 1, p. 90-3, 1988. ISSN 0035-9203 (Print)
 10 0035-9203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3140447>
 11 >.
 12
- 13 TANOWITZ, H. B. et al. Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. **Adv**
 14 **Parasitol**, v. 76, p. 235-50, 2011. ISSN 2163-6079 (Electronic)
 15 0065-308X (Linking). Disponível em: <
 16 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884894> >.
 17
- 18 TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in
 19 chagas disease--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-91, Aug
 20 2006. ISSN 0074-0276 (Print). Disponível em: <
 21 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17072450)
 22 [tion&list_uids=17072450](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17072450) >.
 23

Referências

- 1 TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and
2 Trypanosoma cruzi infection. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 6, p. 262-5, Jun 2002. ISSN
3 1471-4922 (Print). Disponível em: <
4 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12036740)
5 [tion&list_uids=12036740](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12036740) >.
6
- 7 TEIXEIRA, V. et al. Avaliação morfométrica das ilhotas pancreáticas em chagásicos
8 crônicos. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 22, p. 80, 1989.
9
- 10 VAZQUEZ, B. P. et al. Inflammatory responses and intestinal injury development
11 during acute Trypanosoma cruzi infection are associated with the parasite load.
12 **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 206, 2015. ISSN 1756-3305.
13
- 14 VIANA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica na moléstia de
15 Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 276, 1911.
16
- 17 VIEIRA, C.; HADLER, W. Histological study of the parotid gland and of the pancreas
18 in megaesophagus. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 7, p. 89, 1961.
19 ISSN 0004-5241.
20
- 21 VIEIRA, C.; SOUBIHE, N.; FERRIOLLI FILHO, F. Peculiaridade da hipoglicemia
22 insulínica na forma crônica da moléstia de Chagas. II.-Estudo experimental em cães

Referências

- 1 e ratos infetados pelo Trypanosoma cruzi. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 12, p.
2 179-184, 1970.
- 3
- 4 VIEIRA, C. B.; MENEGHELLI, U. G. Peculiaridades da hipoglicemia insulínica na
5 forma crônica da moléstia de Chagas. I. Estudo clínico. **Revista do Instituto de**
6 **Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, p. 175-178, 1970.
- 7
- 8 WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010
9 estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, n. 6, p. 33-43, Feb 06 2015. ISSN 0049-8114
10 (Print)
11 0049-8114 (Linking). Disponível em: <
12 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671846> >.
- 13
- 14 WHO, W. H. O. **Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical**
15 **Diseases: Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases 2015.** World
16 Health Organization, 2015. ISBN 9241564865.
- 17
- 18 ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity
19 and localization in chronic Chagas' disease. **J Infect Dis**, v. 180, n. 2, p. 480-6, Aug
20 1999. ISSN 0022-1899 (Print)
21 0022-1899 (Linking). Disponível em: <
22 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10395865)
23 [tion&list_uids=10395865](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10395865) >.

Referências

1

2 ZUNIGA, E. et al. Trypanosoma cruzi infection selectively renders parasite-specific
3 IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. **J Immunol**, v.
4 168, n. 8, p. 3965-73, Apr 15 2002. ISSN 0022-1767 (Print)
5 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
6 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937553> >.

7

8