



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA AMÉLIA CARRARO ABRAHÃO

ESTUDO MORFOLÓGICO, MORFOMÉTRICO E ESTEREOLÓGICO DA
PLACENTA E TECIDOS FETAIS, NA TRANSMISSÃO
TRANSPLACENTÁRIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM
CAMUNDONGOS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a)	<p><i>Ana Amélia Carraro Abrahão</i></p> <p>e aprovada pela Comissão Julgadora.</p> <p><i>Ruberval A. Lopes</i></p> <p>13/12/00</p>
--	---

Tese Apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para Obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Ruberval Armando Lopes

CAMPINAS

2000



UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

RECIBO

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	1/ UNICAMP
	Ab82e
V.	Ex.
TOMBO BC/	44184
PROC.	16-392107
C	<input type="checkbox"/>
	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00
DATA	26/04/07
N.º CPD	

CM-00154711-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

~~A682e~~

Ab82e

Abrahão, Ana Amélia Carraro

Estudo morfológico, morfométrico e estereológico da placenta e tecidos fetais, na transmissão transplacentária de *Trypanosoma cruzi* em camundongos / Ana Amélia Carraro Abrahão. --Campinas, SP. [s.n.], 2000.
129f. ilus.

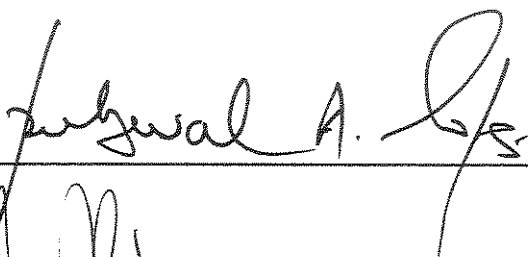
Orientador: Ruberval Armando Lopes
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Placenta. 3. Feto. I. Lopes, Armando Ruberval. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

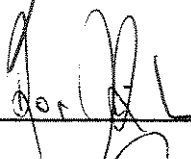
Campinas, 13 de dezembro de 2000.

Banca Examinadora:

Prof.Dr. Ruberval Armando Lopes



Profa.Dra. Rosa Domingues Ribeiro



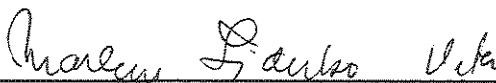
Prof.Dr. Miguel Angel Sala di Matteo



Profa.Dra. Urara Kawazoe



Profa.Dra. Marlene Tiduko Ueta



Prof.Dr. Sérgio de Albuquerque

Prof.Dr. Luiz Augusto Magalhães

A Fernando e Taís,

O amor de vocês dá sentido à
minha vida, tornando-a cada dia
mais feliz.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

A minha família,

Que sempre incentiva e
está presente em todos os
momentos importantes da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ruberval Armando Lopes, que orientou este trabalho e contribuiu de maneira efetiva para a minha formação científica. Agradeço a amizade e atenção.

Ao Prof. Dr. Miguel Angel Sala, docente da Disciplina de Patologia da FORP-USP, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho. Agradeço toda a atenção e colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

À Prof^a Dra. Rosa Domingues Ribeiro, pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Izabel Yoko Ito, chefe do antigo Departamento de Ciências da Saúde da FCFRP-USP, pela amizade, incentivo e apoio constante.

À Prof^a Dra. Ana Maria de Souza, chefe do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, pelo apoio e atenção constante.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo apoio e acolhida que possibilitou uma convivência harmoniosa e a realização de uma etapa importante na minha formação acadêmica.

Aos docentes da Disciplina de Parasitologia, Sérgio e José Clóvis, pela amizade e colaboração.

Aos técnicos da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, Terezinha, Míriam, Georgius e Antonia pelo apoio técnico e ajuda na manutenção dos animais de laboratório.

Aos técnicos Antonio de Campos, Edna Moraes e demais funcionários da Disciplina de Patologia da FORP-USP, pelo auxílio na realização dos cortes histológicos.

Ao colega Antonio Marcos, do Laboratório de Xenodiagnóstico do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese, pelas sugestões e colaboração na correção da tese.

À Amélia Regina, pelo auxílio na confecção dos originais da tese.

À bibliotecária Maria Bernadete, da Biblioteca Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, pela revisão das referências bibliográficas.

A Deus que está presente em todos os momentos de minha vida e que me deu força para enfrentar os momentos difíceis.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Importância da Transmissão Congênita da Doença de Chagas Humana.....	1
1.2. Doença de Chagas Congênita em Humanos	2
1.3. Frequência de Transmissão Congênita	7
1.4. Transmissão Congênita Laboratorial	10
2. PROPOSIÇÃO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3.2. Animais	14
Grupo controle	14
Grupo infectado	14
3.3. Técnica de Dissecção	15
3.4. Técnica Histológica	16
3.5. Técnica Morfométrica (cariometria)	16
3.6. Técnicas Estereológicas	18
3.7. Técnica Estatística	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Resultados Morfológicos	24
4.1.1. Peso e comprimento fetais	24
4.1.2. Peso e diâmetro placentários	25
4.1.3. Comprimento do cordão umbilical	26
4.1.4. Relações peso fetal / peso da placenta e peso fetal / comprimento do cordão umbilical	27
4.1.5. Histopatologia	28

4.1.5.1. Placenta	28
Grupo controle	28
Grupo infectado	34
4.1.5.2. Órgãos Fetais	44
4.1.5.2.1. Fígado	44
4.1.5.2.2. Pâncreas	44
4.1.5.2.3. Coração	45
4.2. Resultados Morfométricos	50
4.2.1. Cariometria dos espongioblastos	50
4.2.2. Cariometria das células gigantes	53
4.2.3. Cariometria dos tecidos fetais	56
4.2.3.1. Fígado	56
4.2.3.2. Pâncreas	58
4.2.3.3. Coração	60
4.3. Resultados Estereológicos	62
4.3.1. Placenta	62
4.3.2. Órgãos fetais	67
4.3.2.1. Fígado	67
4.3.2.2. Pâncreas	68
4.3.2.3. Coração	70
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	89
7. RESUMO	92
8. SUMMARY	94
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. IMPORTÂNCIA DA TRANSMISSÃO CONGÊNITA DA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, descrito por Carlos Chagas em 1909. A transmissão ocorre por insetos hematófagos da subfamília *Triatominae*, por transfusão de sangue e via congênita, sendo que este último representa o terceiro mecanismo mais importante de transmissão da doença de Chagas para o homem. Outros mecanismos de transmissão possíveis são através da via oral, pelo leite materno e coito.

A transmissão congênita da doença de Chagas constitui sério problema de saúde pública em áreas endêmicas e não endêmicas. Nas áreas não endêmicas cresce a importância da transmissão congênita devido à migração das populações rurais para os centros urbanos.

A infecção chagásica congênita pode causar abortamento, prematuridade, retardo de crescimento intra-uterino, nati e neomortalidade. No entanto, já se observou que, quando não há infecção fetal, a doença materna por si só não causa estes problemas obstétricos (BITTENCOURT, 1984).

O recém-nascido infectado apresenta as mesmas manifestações da doença aguda não congênita ou mostra-se assintomático (MOYA *et al.*, 1979; FREILIJ & ALTICHEH, 1995). No entanto, há manifestações peculiares à forma congênita da doença. Têm sido descritas, logo ao nascer ou poucos meses após, manifestações digestivas com megaesôfago, alterações oculares, paralisia cerebral, microcefalia e calcificações cerebrais (BITTENCOURT, 1988).

1.2. DOENÇA DE CHAGAS CONGÊNITA EM HUMANOS

O primeiro caso comprovado de doença de Chagas congênito foi relatado por Chagas em 1911, quando encontrou tripomastigotas em esfregaço de sangue proveniente de uma criança de meses de idade, cuja mãe era chagásica, dois anos após a descrição da doença (CHAGAS, 1909). Posteriormente, CHAGAS (1934) considerou a transmissão congênita como responsável pela maioria dos casos da forma nervosa crônica da doença no homem.

Em 1949, DAO descreveu um caso de transmissão congênita da doença na Venezuela; em 1958, RASSI *et al.* comprovaram pela primeira vez, a infecção de placenta humana pelo *Trypanosoma cruzi*. A partir desta data, outras observações de placentite chagásica foram referidas, particularmente na Bahia (BITTENCOURT, 1963, 1976, 1979; BITTENCOURT *et al.*, 1975; LISBOA, 1960).

GAVALLER (1953) relatou o primeiro estudo anátomo-patológico de dois gêmeos prematuros, os primeiros casos congênitos diagnosticados *pós-mortem*, falecidos após 02 e 81 horas do parto, respectivamente, também na Venezuela. Foram encontrados ninhos de amastigotas no coração, cérebro, músculos esqueléticos e pulmão. JÖRG (1953), observou o primeiro caso de moléstia de Chagas congênita na Argentina. HOWARD *et al.* (1957), relataram os três primeiros casos no Chile, sendo também os primeiros com sobrevivência e dois deles gêmeos. Ambas as mães estavam aparentemente saudáveis, porém com exames de xenodiagnóstico positivos.

REZENDE *et al.* (1959) publicaram um caso provável de transmissão placentária descrevendo as lesões e parasitismo da placenta, sem contudo demonstrarem a evidência morfológica da infecção no feto.

Em 1960, LISBOA apresentou um estudo anátomo-patológico de seis casos entre duzentas e vinte necrópsias de fetos e recém-nascidos, com encontros simultâneos de parasitas de *T. cruzi* em feto e placenta, estabelecendo, de forma inequívoca, a via transplacentária de transmissão da doença de Chagas.

A partir de 1949, muitos casos de transmissão congênita da doença de Chagas humana foram descritos no Chile, Argentina, Venezuela, Bolívia e Brasil (GAVALLER, 1953; JÖRG, 1953; AUCHTER DE MANERO, 1958; REZENDE *et al.*, 1959; ATIAS *et al.*, 1961, 1963; SCHILLING *et al.*, 1961; PIFANO, 1960; BITTENCOURT, 1963, 1967, 1976, 1984; BITTENCOURT *et al.*, 1972, 1974, 1975, 1981, 1984; HOWARD & RUBIO, 1968; SZARFMAN *et al.*, 1968, 1975; RUBIO & DONOSO, 1969; ASSINI *et al.*, 1970; BLANK *et al.*, 1971; SALEME *et al.*, 1971; STAGNO & HURTADO, 1971; APT, 1972; TAFURI *et al.*, 1973; BLANK, 1974; HOWARD, 1975; LAUTREC *et al.*, 1975; LOPES *et al.*, 1977; MACEA *et al.*, 1977; SCHMUÑIS & SZARFMAN, 1977; MOYA *et al.*, 1979; ARAÚJO *et al.*, 1980; DINIS *et al.*, 1981; MUÑOZ *et al.*, 1982; TELLO *et al.*, 1982; MEDINA-LOPES, 1983; VIEIRA *et al.*, 1983; AZOGUE *et al.*, 1985; AGUILERA *et al.*, 1988; SCHENONE *et al.*, 1989; AZOGUE & DARRAS, 1991; MUÑOZ *et al.*, 1992; VALPERGA *et al.*, 1992; BLANCO *et al.*, 1993; ZAIDENBERG & SEGOVIA, 1993; ARCAVI *et al.*, 1993; STREIGER *et al.*, 1995; BLANCO & SEGURA, 1997).

Também foram descritos casos congênitos na Guatemala (MATTA *et al.*, 1991), Honduras (PONCE & PONCE, 1995), Paraguai (ROJAS DE ARIAS, 1990), Uruguai (SARASÚA, 1993; CONTI DIAZ, 1993) e Suécia (PEHRSON *et al.*, 1981).

Em 1969, BITTENCOURT & BARBOSA relataram o primeiro caso de transmissão congênita da doença de Chagas, antes do 5º mês de gestação. Em 1972, esses mesmos autores examinaram 300 conceptos com peso igual a 400g ou menos. Registraram 3 casos de infecção congênita com extensas lesões inflamatórias e com parasitismo intenso das placentas. Identificaram lesões inflamatórias no miocárdio, esôfago, pele e músculo esquelético, ao lado de ninhos de parasitas, nos fetos macerados. Considerando-se apenas os abortos provenientes de mulheres com infecção chagásica, a incidência de transmissão foi de 6,2%; considerando-se o total, a transmissão foi de 1%.

Em 1970, ASSINI *et al.* relataram o caso de uma paciente com doença de Chagas aguda com parasitemia comprovada, que engravidou 20 dias após contrair a doença. Aos cinco meses e meio teve parto espontâneo e o feto viveu quinze minutos. O estudo histopatológico da placenta, cérebro, miocárdio, fígado, baço, músculo esquelético, timo e pulmão fetais mostrou numerosos ninhos de amastigotas.

BITTENCOURT *et al.* (1972) observaram que a incidência de transmissão congênita da doença em 500 partos estudados, na cidade de Salvador (Bahia), era de 2%. Considerando-se apenas as mães chagásicas, a incidência foi de 10,5%. Nos fetos foi possível encontrar infiltrado inflamatório e parasitas no coração, pele, músculo esquelético e esôfago.

Estudando 29 casos de doença de Chagas congênita, BITTENCOURT *et al.* (1975) observaram que os órgãos fetais mais envolvidos eram o coração, cérebro, pele, músculo esquelético, esôfago e intestinos. Observaram também que as placentas apresentaram vilosite e intervilosite de caráter subagudo, crônico e, mais freqüentemente, crônico granulomatoso, além de vilosidades com aspecto imaturo. Havia, além disso, envolvimento da placa corial e das membranas extraplacentárias.

BITTENCOURT (1975) descreveu lesões inflamatórias cutâneas em 18 casos congênitos de doença de Chagas. Observou vasculite dermo-epidérmica intensa, granulomas subepidérmicos e hipodermite com necrose discreta de gordura. Em 15 casos observou formas amastigotas do *T.cruzi* livres no tecido e no interior de histiócitos.

Em 1983, VIEIRA *et al.* observaram um caso de doença de Chagas congênita aguda com envolvimento predominante do sistema nervoso central que evoluiu para um quadro de paralisia cerebral.

TAFURI *et al.* (1984) estudando ao microscópio eletrônico um caso de placentite chagásica, observaram amastigotas numerosos nas células de Hofbauer, proliferação fibroblástica e colágena na parede de pequenas artérias e arteríolas

podendo ocluir a luz, parasitas nas células musculares degeneradas e fibroblastos da parede vascular.

AZOGUE *et al.* (1985) evidenciaram a importância da via de transmissão congênita da doença de Chagas em Santa Cruz - Bolívia. Os autores observaram 4% de infecção chagásica nos recém-nascidos, comprovados pelo exame parasitológico direto (Strout) em sangue do cordão umbilical no momento do nascimento; 1% dos recém-nascidos apresentaram infecção placentária por *T.cruzi* detectada através do exame histopatológico, sem a presença do parasita no sangue do recém-nascido.

No México, o primeiro caso de doença de Chagas congênita foi descrito por GUZMAN-BRACHO *et al.* (1998) em um recém-nascido prematuro com baixo peso, hepatoesplenomegalia e pneumonite. Dois anos após o tratamento, a criança apresentou desenvolvimento normal, com sorologia negativa para *T.cruzi* e eletrocardiograma normal.

Em um estudo com 58 recém-nascidos, de 57 mães com a forma crônica da doença de Chagas, selecionadas em três Instituições de Saúde da cidade de São Paulo, a transmissão congênita foi demonstrada em 5,17% (3/58) dos casos, e um provável caso foi confirmado somente pelo achado de antígenos de *T.cruzi* na placenta e cordão umbilical. Dois casos congênitos, nascidos de mulheres chagásicas com infecção pelo HIV, foram diagnosticados através de testes parasitológicos (microhematócrito, QBC ou xenodiagnóstico artificial) (NISIDA *et al.*, 1999).

A transmissão congênita da doença de Chagas é transplacentária e parece depender de fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro. A transmissão em nível placentário ocorre, quando os tripomastigotas presentes no espaço interviloso atravessam o epitélio trofoblástico, penetram no estroma viloso onde vão parasitar macrófagos sob a forma de amastigotas. Essas formas se multiplicam por divisão binária e após rompimento dos macrófagos liberam tripomastigotas que penetram em outros macrófagos ou ganham a circulação, indo infectar o feto. Já se documentou lesão placentária na doença de Chagas sem infecção fetal. Esses casos podem ser

considerados como de transmissão congênita em nível placentário, levando-se em conta que a placenta é um órgão fetal (BITTENCOURT, 1984).

Há possibilidade de haver transmissão transplacentária de *T.cruzi* sempre que a mãe apresenta parasitemia. Na fase aguda da infecção a parasitemia é persistente e a transmissão pode ocorrer mais facilmente. No entanto, há registros na literatura de apenas oito gestantes com infecção aguda, três das quais não transmitiram a infecção verticalmente (BITTENCOURT, 1988). As mães que transmitem a infecção ao concepto estão freqüentemente na forma indeterminada. No entanto, a transmissão congênita já foi registrada em todas as formas da doença (BITTENCOURT, 1984).

MENEZES *et al.* (1992) mostraram ausência de transmissão congênita da doença de Chagas em gestantes com xenodiagnósticos positivos. Conclui-se que, além da parasitemia, devem existir outros fatores envolvidos na transmissão congênita, provavelmente relacionados ao estado imunológico da placenta, à cepa do parasita e à reativação da infecção materna no curso da gestação. Trabalhos experimentais mostram que diferentes cepas de *T.cruzi* apresentam diferentes tropismos pela placenta, e que a transmissão congênita depende da cepa do parasita e da capacidade fagocítica dos macrófagos vilosos. Têm-se observado também, através da pesquisa de IgM específico e da realização de repetidos xenos durante a gravidez, que algumas pacientes apresentam reativação da infecção devido à imunossupressão na gestação (BITTENCOURT, 1992).

A transmissão congênita da doença de Chagas predomina entre as gestantes mais jovens, pois a parasitemia declina com a idade ao mesmo tempo em que se observa a cronificação da doença (BITTENCOURT, 2000).

Estudos na Bahia, incluindo natimortos, neomortos e nativos mostraram que há maior freqüência de transmissão congênita de *T.cruzi* entre 22 e 26 semanas de gestação (BITTENCOURT, 1992).

Na ausência de estados imunossupressivos, pode ocorrer transmissão da doença de Chagas em mais de uma gestação, de modo sucessivo ou não (BITTENCOURT & GOMES, 1967).

Assim, apresentam maior risco de transmitir a infecção congênita as mães mais jovens, as procedentes de áreas onde a prevalência de transmissão é elevada, as mães na fase aguda pois apresentam parasitemia persistente, e aquelas com história de natimortalidade. Também deve haver maior risco de transmissão nas gestantes chagásicas infectadas pelo HIV ou que usam drogas imunossupressoras, pois a deficiência imunológica é fator de reativação da infecção chagásica.

1.3. FREQUÊNCIA DE TRANSMISSÃO CONGÊNITA

Os trabalhos publicados mostram incidências variáveis de infecção congênita, dependendo de diferentes fatores a saber: métodos de diagnóstico utilizados ao nascer, se o estudo foi realizado em áreas endêmicas ou não, em filhos recém-nascidos de mães chagásicas ou na população de mães chagásicas e não chagásicas, ou se a amostra de recém-nascido estava direcionada para aqueles que nasceram com baixo peso.

Como citado anteriormente, casos de doença de Chagas congênita foram descritos na Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Guatemala, Honduras, Paraguai, Uruguai, México, Venezuela e Suécia.

Em geral, a incidência de recém nascidos contaminados, filhos de mães com sorologia positiva, foi de 2-3%. Na década de 70, na Argentina, houve incidências entre 0,75 e 3,50% (SZARFMAN *et al.*, 1968; BLANK *et al.*, 1971; SCHMUÑIS & SZARFMAN, 1977). Estudos posteriores mostraram uma incidência que variava de 2 a 6,7% em filhos de mães chagásicas (VALPERGA *et al.*, 1992; BLANCO *et al.*, 1993; ZAIDENBERG & SEGOVIA, 1993; ARCAVI *et al.*, 1993;

STREIGER *et al.*, 1995; BLANCO & SEGURA, 1997). No Brasil a incidência foi de 1,6% (BITTENCOURT, 1984).

No Chile, a incidência variou entre 2,1 e 10% segundo a zona estudada. No Uruguai foi de 1,6% nos estudos originais, tendo aumentado posteriormente, para 4 e 11,7%, respectivamente (SCHMUNIS, 2000). Os números na Bolívia variaram de 4 a 8%, tendo aumentado para 18% quando se estudaram filhos de mães chagásicas de baixo peso ao nascer (AZOGUE & DARRAS, 1991; AZOGUE *et al.*, 1985). Por outro lado, a incidência em Honduras foi de 4% (PONCE & PONCE, 1995).

Os números relativos à incidência da doença de Chagas em gestantes variaram, obviamente, de acordo com a região estudada. Testes sorológicos aplicados em ambulatórios de pré-natal mostraram positividade em 4,0% das gestantes provenientes de regiões não-endêmicas (AMATO-NETO *et al.*, 1968); em 33,5% (OLIVEIRA *et al.*, 1966) e em até 51,0% (AZOGUE *et al.*, 1985) em regiões endêmicas. Estudo de prevalência feito na Bahia mostrou índice de infecção de 10,8% nas gestantes nascidas na zona rural e de 1,7% naquelas naturais de Salvador (BITTENCOURT, 1984).

DIAS (1979), trabalhando em uma área previamente endêmica (Bambuí, Minas Gerais), onde a transmissão pelo vetor foi interrompida há alguns anos, não encontrou nenhum caso de infecção chagásica em mais de 300 crianças filhas de mães chagásicas. Parece existir, além disso, diferenças geográficas, como se constata comparando-se a casuística de duas áreas endêmicas. Em Salvador, Bahia, é relatada incidência de 10,5% da infecção congênita em grupo de recém-nascidos e natimortos de mães chagásicas e com peso igual ou inferior a 2.000 gramas (BITTENCOURT *et al.*, 1972).

A metodologia utilizada neste trabalho constou de realização de xenodiagnósticos nos recém-nascidos e exames anatomopatológicos da placenta e dos anexos placentários, e de autópsias dos nati e neomortos. Por outro lado, a frequência de infecção chagásica congênita entre abortos - peso igual ou inferior a 400g - de

pacientes chagásicas é de 6,2% (BITTENCOURT & BARBOSA, 1972). Em Santa Cruz de La Sierra, Bolívia, foi encontrada incidência de 14,8% entre recém-nascidos de mães não selecionadas e com peso de 2.000 gramas ou menos e de 4,0% naqueles com peso superior, não tendo sido incluído natimortos (AZOUGUE *et al.*, 1985).

Há quem atribua as estatísticas discordantes à existência de diferentes cepas de *T. cruzi*, entre outros fatores. De fato, já foi demonstrado, experimentalmente, que as cepas se comportam de modo diverso quanto ao padrão de transmissibilidade intra-uterina (ANDRADE *et al.*, 1973). Por outro lado, estudo realizado no Triângulo Mineiro, área endêmica de doença de Chagas, mostrou que a natimortalidade de filhos de chagásicas não é maior que a de filhos de mães não-chagásicas (LOPES *et al.*, 1967).

Existe atualmente, na América do Sul, vários casos comprovados de doença de Chagas congênita registrados na literatura. No Brasil foram relatados 33 casos na Bahia (BITTENCOURT, 1984) e 28 em Brasília (ARAÚJO *et al.*, 1983), entre outros. No restante do continente, os casos procedem, em sua maior parte, da Argentina, Chile e Bolívia.

Considerando em sua totalidade, o número de casos parece relativamente baixo, tendo-se em conta que a doença, na sua forma adquirida, atinge milhões de indivíduos nos países latino-americanos.

No entanto, pode-se observar que a importância do problema parece se modificar em função da existência ou não da busca e acompanhamento sistematizado dos casos, bem como do próprio emprego dos meios de diagnóstico, inclusive o exame anatomopatológico e a necrópsia. A pesquisa sorológica em gestantes que residem em zona rural é importante para detecção da patologia. Do mesmo modo, é de vital importância a pesquisa sorológica de mães portadoras da forma crônica, pela relação entre o quadro clínico do filho em relação ao da mãe, a medida em que as demais formas de transmissão adquirida estão sendo controladas (FERNANDEZ *et al.*, 1987; SARASÚA, 1993).

Foi realizada uma estimativa da incidência anual de Chagas congênito em diferentes países das Américas. Os cálculos foram efetuados levando-se em conta o número de recém-nascidos vivos por país, supondo que a prevalência de infecção por *T.cruzi* nas grávidas foi semelhante à da população geral e que a incidência da infecção por *T.cruzi* nos recém-nascidos vivos dos diferentes países foi de 3%. Assim, é possível estimar que, nas Américas, em 1985, produziram-se 15.903 casos de contaminação congênita. No Brasil, para uma prevalência da infecção na população estimada em 5,22% para os anos 1980-1985, o número estimado de recém nascidos infectados foi de 8.357. Em 1995, para uma prevalência de 1,21% de infecção na população, a estimativa foi de 1.261 recém-nascidos infectados (SCHMUÑIS, 2000).

1.4. TRANSMISSÃO CONGÊNITA LABORATORIAL

As primeiras tentativas de produzir transmissão congênita experimental por NATTAN-LARRIER (1912) e por NÄGLER (1913) foram infrutíferas. Em 1914, MAYER & ROCHA-LIMA observaram ninhos de amastigotas de *T.cruzi* na placenta de camundongos, sem encontrar, entretanto, parasitas nos fetos. Ausência de parasitas nos fetos do animal inoculado também foi observado por WERNER (1954).

NATTAN-LARRIER (1921, 1928) trabalhando com cobaias adultas, obteve infecção experimental após inoculação do líquido amniótico proveniente de cobaias no período agudo da enfermidade. Da mesma maneira, conseguiu infecção, após inocular sangue extraído do coração de fetos, cujas mães encontravam-se na fase aguda da infecção. Em 1928, este mesmo autor observou ninhos de amastigotas na placenta.

Em 1923, VILLELA observou ninhos de amastigotas no miocárdio de cães, nascidos de mães chagásicas agudas. Notou também parasitas nas vilosidades coriais.

Posteriormente, CAMPOS (1928, 1930 e 1932) demonstrou a passagem transplacentária do *T.cruzi* em cadelas com infecção experimental aguda ou crônica. Observou tripomastigotas no sangue circulante e encontrou ninhos de amastigotas em diferentes órgãos de algumas crias.

Por outro lado, APT *et al.* (1968a e b) trabalhando com ratos e camundongos observaram infecção materna, porém não nas crias. Da mesma maneira, WERNER & EGGER (1971) inoculando camundongos com as cepas Y e P de *T.cruzi*, em diferentes momentos do desenvolvimento ontogenético, observaram pseudocistos no endométrio e trofoblasto, porém nunca nos tecidos embrionários ou fetais.

Em camundongos C3H/5 com infecção aguda, CUNIO *et al.* (1977) observaram passagem transplacentária de *T.cruzi* (cepa Tulahuén). Utilizando a cepa Maria Cristina, DELGADO & SANTOS-BUSH (1978) observaram transmissão congênita no camundongo.

Em 1980, CUNIO *et al.* observaram no camundongo C3H/5 inoculados com formas sangüícolas da cepa Tulahuén de *T.cruzi*, placentas com parasitas, acompanhadas ou não de infiltrado inflamatório; os fetos mostraram amastigotas no músculo estriado e também no pulmão, fígado, músculo esquelético e coração.

Trabalhando com *Calomys callosus* infectados com três cepas de *T.cruzi* isoladas do marsupial *Didelphis albiventris*, MELLO & BORGES (1981) admitiram que é possível a transmissão do *T.cruzi* da mãe para o filhote.

Estudando a influência de diferentes cepas do *T.cruzi* nas infecções chagásicas na placenta do camundongo, ANDRADE (1982) observou que a incidência do parasitismo placentário atingiu 98% para a cepa Colombiana, 18,4% para a Peruana, 17% para a Y e 13,2% para a Honorinia. A presença dos parasitas na porção vascular da placenta era proeminente com a cepa Colombiana e rara nas demais. Comprovou assim, que as cepas do parasita desempenham um papel importante na infecção congênita por *T.cruzi*.

Trabalhando com camundongos na fase crônica da infecção chagásica, CARLIER *et al.* (1987) observaram que *T.cruzi* (cepa Tehuantepec) provocava retardo no crescimento intrauterino. O parasita não foi encontrado no sangue fetal, indicando uma frequência muito baixa, senão ausente, de transmissão transplacentária do parasita durante a fase crônica da infecção.

Em estudo mais recente, MENEGUETTE (1997) utilizou quatro cepas de *T.cruzi* (Colombiana, Y, Bolívia e RC) onde estudou histometricamente as alterações presentes nas placentas de camundongos, verificando um comportamento sistematizado aos pares em função da decídua basal, região esponjosa e região labiríntica (Colombiana - RC e Bolívia - Y), que afetava principalmente a camada esponjosa (espongioblastos); além disso, as alterações das células gigantes e o comportamento sistematizado permitiram agrupar os pares de cepas Colombiana - Y e Bolívia - RC.

2. PROPOSIÇÃO

Tendo em vista a importância da doença de Chagas transplacentária e o diferente comportamento mostrado pelas cepas de *T.cruzi*, como visto por ANDRADE (1982), este trabalho tem como objetivos:

- Estudar as placentas e os fetos de camundongos *Mus musculus* infectados pela cepa RAL de *T.cruzi*, durante a prenhez.
 - Avaliar as alterações morfológicas das placentas e dos fetos através de métodos morfométricos e estereológicos, estabelecendo um perfil quantitativo das lesões produzidas pelo parasita.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Foi utilizada a cepa RAL de *Trypanosoma cruzi* descrita por RIBEIRO *et al.* (1993). Trata-se de uma cepa isolada das fezes de um exemplar de *Triatoma infestans* capturado em domicílio rural do Sítio Águas Claras, município de Santa Rosa do Viterbo - SP. As formas tripomastigotas do parasita são predominantemente intermediárias e largas. O citoplasma é pouco corado, o núcleo é denso e bem corado, localizado aproximadamente a 6µm da extremidade posterior. O cinetoplasto é terminal e o flagelo é relativamente curto. Trata-se de uma cepa virulenta; quando inoculada em camundongos albinos apresenta curva de parasitemia com pico no 12º dia após o inóculo.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), da linhagem swiss, fêmeas prenhas, com 60 dias de idade, pesando aproximadamente 30-35 gramas, as quais foram divididas em dois grupos:

- I - **Grupo controle:** 10 animais inoculados com solução fisiológica e mantidos nas mesmas condições ambientais dos infectados com *T.cruzi*.
 - II - **Grupo infectado:** 10 animais inoculados intraperitonealmente com 2×10^5 formas tripomastigotas sangüícolas da cepa RAL de *T.cruzi*, no 7º dia de prenhez.
-

Os animais foram mantidos em caixas individuais, receberam ração comercial e água *ad libitum*, e foram sacrificados no 19º dia de prenhez, que corresponde ao pico da parasitemia nos animais infectados e final da gestação.

Para a determinação do primeiro dia da prenhez, os camundongos fêmeas foram colocados para acasalamento com os machos durante a noite, na proporção de duas fêmeas para cada macho e, na manhã seguinte foram realizados esfregaços vaginais, com a finalidade de verificar a presença do tampão vaginal. Quando os espermatozoides estavam presentes, considerava-se este dia como o primeiro dia da prenhez.

3.3. TÉCNICA DE DISSECÇÃO

No 19º dia da prenhez, os animais foram anestesiados mediante inalação de éter etílico e, após abertura ampla do abdômen, foram colhidos o útero com os fetos, as placentas e os cordões umbilicais. Estas estruturas e os fetos foram imersos em solução fixadora contendo álcool 80% - 85 ml, formalina - 10 ml e ácido acético - 5 ml (ALFAC), permanecendo nessa solução durante 24 horas.

Foram colhidos aleatoriamente, 5 fetos de cada grupo experimental, com as respectivas placentas e cordões.

Os animais e seus anexos foram secados em papel de filtro e pesados em balança analítica de precisão (Mettler). Assim, foram determinados os pesos dos fetos e das placentas.

A relação feto/placenta foi obtida dividindo-se o peso fetal pelo peso da placenta (ambos em g).

O comprimento dos fetos (em cm), do cordão umbilical (em cm) e o diâmetro da placenta (em mm) foram medidos empregando-se papel milimetrado transparente.

Também foi avaliada a relação peso fetal (em g)/comprimento do cordão umbilical (em cm); o índice ponderal ou pondo estatural de Rohrer foi calculado através da equação:

$$\frac{\text{Peso do feto (g)}}{[\text{Comprimento feto (cm)}]^3} \times 100$$

O volume da placenta foi detectado pela regra de Simpson (AHERNE & DUNNILL, 1982) onde se utiliza o deslocamento de líquido e o peso. Foi feita a determinação do volume empregando-se o conjunto de placentas de cada grupo. O peso específico de cada grupo foi determinado dividindo-se o peso destas placentas pelo volume.

3.4. TÉCNICA HISTOLÓGICA

Após fixação de 24 horas, as placentas e os fetos foram cortados longitudinalmente e posteriormente desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Os cortes seriados de 6µm de espessura foram preparados colhendo-se o primeiro corte, desprezando-se 8 e assim, sucessivamente, até o corte 82. Desta forma, foram obtidos 10 cortes de cada placenta que foram corados pela hematoxilina e eosina.

3.5. TÉCNICA MORFOMÉTRICA (CARIOMETRIA)

A placenta de roedores apresenta as seguintes regiões: decídua basal (de origem exclusivamente materna), camada esponjosa ou reticular e camada labiríntica (DAVIES & GLASSER, 1968).

A cariometria da placenta foi realizada nos elementos citotrofoblásticos. As células do citotrofoblasto se concentram, predominantemente, na camada esponjosa, reconhecendo-se dois tipos: as células principais ou espongioblastos e as células gigantes (SCHIEBLER & KNOOP, 1959). Assim, foram determinados os parâmetros nucleares dos espongioblastos e das células gigantes da camada esponjosa das placentas dos animais controles e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi*.

Com a finalidade de se avaliar morfometricamente os núcleos dos espongioblastos e das células gigantes da placenta dos animais de ambos os grupos estudados, foram determinados os diâmetros maior (D) e menor (d) destes núcleos. Os cortes foram focalizados em microscópio Jenamed, munido de câmara clara Jena. Os núcleos, em número de 50 por animal, foram projetados sobre papel, com aumento final de 1000 vezes, e contornados com lápis número 2.

Da mesma maneira foram avaliados os diâmetros maior (D) e menor (d) dos núcleos das células do fígado (hepatócitos), das fibras do músculo estriado cardíaco, e dos ácinos pancreáticos dos fetos.

Posteriormente, foram medidos os diâmetros maior (D) e menor (d) dos núcleos com auxílio de papel milimetrado. Estes dados foram introduzidos em um programa para microcomputador desenvolvido no Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Foram analisados os seguintes parâmetros nucleares (SALA *et al.*, 1994):

$$\text{Diâmetro médio: } M = (D \cdot d)^{1/2}$$

$$\text{Perímetro: } P = (\pi/2) \cdot [1,5 \cdot (D + d) - M]$$

$$\text{Relação entre diâmetros: } D/d$$

$$\text{Volume: } V = 6^{-1} \cdot \pi \cdot M^3$$

$$\text{Área: } A = \pi \cdot M^2/4$$

$$\text{Relação: } A/V = 3/2 \cdot M$$

Coeficiente de forma: $F = 4 \cdot \pi \cdot A / P^2$

Índice de contorno: $I = P / (A)^{1/2}$

Excentricidade: $E = (D + d)^{1/2} \cdot (D - d)^{1/2} / D$

3.6. TÉCNICAS ESTEREOLÓGICAS

Neste trabalho, utilizou-se uma grade idealizada por MERZ (1968) impressa sobre papel, que consiste de um quadrado, que limita uma área teste, contendo um sistema de pontos marcados sobre linhas sinuosas formadas por uma sucessão de semicírculos encadeados, conforme mostra a Figura 1.

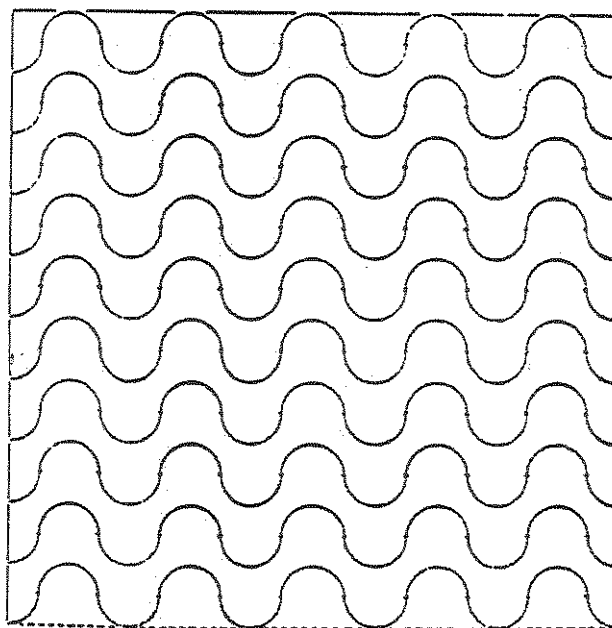


Figura 1. Representação gráfica da grade idealizada por MERZ (1968).

Os cortes foram focalizados ao microscópio óptico JENAMED, com objetiva de aumento 100X, munido de câmara clara JENA. As imagens obtidas foram desenhadas sobre a grade.

A grade de MERZ pode ser usada tanto para contar pontos sobre uma determinada estrutura histológica como para contar intersecções entre duas estruturas contíguas, bastando para isso considerar o número de pontos que caem sobre a estrutura em estudo, no primeiro caso, ou o número de vezes em que as superfícies vizinhas cortam a linha curva, no segundo caso.

a) Volume relativo

Com a finalidade de se avaliar percentualmente as estruturas do fígado, coração e pâncreas fetais, as estruturas placentárias e o núcleo e citoplasma das células gigantes, empregou-se neste trabalho a técnica de CHALKLEY (1943), cuja fórmula é:

$$V_v = (P_n + P_{ct}) / P_t$$

onde P_n são os pontos contados sobre o núcleo da estrutura, P_{ct} são os pontos sobre o citoplasma e P_t são os pontos totais.

b) Volume absoluto

A fórmula do volume absoluto é:

$$V = \frac{V_v \cdot P}{P_v}$$

onde V_v é o volume relativo da estrutura, P é o peso da placenta e P_v é o peso específico do tecido placentário.

c) Volume relativo nuclear

O volume relativo nuclear é dado pela fórmula:

$$V_{vn} = P_n / (P_n + P_{ct}) \cdot [2M / (2M + 3t)]$$

onde P_n e P_{ct} são, respectivamente, o número de pontos que coincidiram sobre o núcleo e o citoplasma das células das estruturas estudadas; M é o diâmetro nuclear médio e t é a espessura do corte histológico.

d) Volume relativo citoplasmático

É dado pela fórmula:

$$V_{vct} = 1 - V_{vn}$$

onde V_{vn} é o volume relativo nuclear.

e) Relação núcleo / citoplasma

A relação núcleo/citoplasma (N/C) é dada pela relação entre os volumes relativos do núcleo e do citoplasma, expressa pela equação:

$$N/C = \frac{V_{vn}}{V_{vct}}$$

Os volumes relativos foram determinados pelo número de pontos que incidiu sobre as estruturas consideradas em relação ao número total de pontos da área teste (DELESSE, 1848; CHALKLEY, 1943; WEIBEL, 1969).

Na verdade, o valor obtido assim é uma sobreestimação do valor real, devido ao chamado "efeito HOLMES" (WEIBEL, 1969), o qual decorre do uso de cortes histológicos de espessura finita. Esta estimação pode ser corrigida, levando-se em consideração o tamanho da estrutura envolvida e a espessura do corte histológico. Assim HENNIG (1957) propôs a seguinte equação para a correção do efeito Holmes, considerando os núcleos como esferas de diâmetro médio D e sendo t a espessura do corte:

$$V_{vc} = \frac{V_{vn}}{1 + 3t/2D}$$

onde V_{vc} é a fração volumétrica dos núcleos corrigida e V_{vn} é a fração volumétrica observada. O diâmetro médio foi determinado previamente, com o emprego da cariometria.

A relação núcleo citoplasma corrigida será então:

$$N/C \text{ corrigida} = \frac{V_{vc}}{1 - V_{vc}}$$

sendo $1 - V_{vc}$ a fração volumétrica citoplasmática corrigida (V_{vcit}).

f) Volume citoplasmático e volume celular médios

O volume citoplasmático (V_{ct}) foi estimado a partir do volume nuclear e da relação núcleo/citoplasma corrigida. Por sua vez, a soma dos volumes nuclear e citoplasmático forneceu o valor estimado para a célula "média" (SALA *et al.*, 1992).

$$V_{ct} = \frac{V_n}{N/C \text{ corrigida}}$$

O volume da célula média é dado pela relação:

$$V_{cel} = V_n + V_{ct}$$

g) Densidade numérica

A densidade numérica foi determinada através da equação:

$$N_v = (V_v/V_{cel}) \cdot 10^9$$

onde V_v é o volume relativo e V_{cel} é o volume celular médio.

h) Número de células por placenta

O número de células por placenta é dado pela fórmula:

$$N_p = (N_v \cdot P / P_v)$$

onde N_v é a densidade numérica, P é o peso da placenta e P_v é o peso específico do tecido placentário.

3.7. TÉCNICA ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados, assim como para os diversos cálculos matemáticos envolvidos nos estudos morfométricos dos dados, foram utilizados diversos programas para computador do tipo IBM-PC, em linguagem BASIC AVANÇADO (BÁSICA) desenvolvidos no Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, visando ao processamento dos dados experimentais. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (SIEGEL, 1975).

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS MORFOLÓGICOS

4.1.1. Peso e comprimento fetais

O peso corporal dos fetos controles foi significativamente maior (1,654g) que o dos fetos de mães infectadas com a cepa RAL de *T.cruzi* (0,723g) (Tabela 1, $p < 0,01$).

Da mesma maneira, o feto do grupo controle apresentou comprimento significativamente maior (2,68cm) que o do infectado (1,86cm) (Tabela 1, $p < 0,01$).

Tabela 1. Valores do peso (g) e do comprimento (cm) e índice pômdero-estatural (g/cm^3) dos fetos de camundongos controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Peso corporal		Comprimento fetal		Índice pômdero-estatural	
C	I	C	I	C	I
1,676	0,909	2,7	2,0	8,51	11,36
1,627	0,655	2,7	1,8	8,27	11,23
1,745	0,564	2,8	1,7	7,95	11,48
1,570	0,577	2,5	1,8	10,05	9,89
1,650	0,910	2,7	2,0	8,38	11,38
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
1,654	0,723	2,68	1,86	8,63	11,07
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 1*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,008	

* Estatisticamente significante para $\alpha = 0,01$

4.1.2. Peso e diâmetro placentários

Observando-se a Tabela 2, verifica-se que o peso da placenta do feto do grupo infectado com a cepa RAL de *T.cruzi* era menor (0,0732g) que o do feto controle (0,1410g), e tal diferença era significativa ($p < 0,01$). O diâmetro placentário mostrou-se também diminuído no feto de mães infectadas (6,4mm) quando comparado ao do controle (7,8mm) ($p < 0,01$), bem como o volume placentário (66,62mm³ para o infectado e 128,28mm³ para o controle) ($p < 0,01$).

Tabela 2. Valores do peso (g), diâmetro (mm) e volume (mm³) das placentas dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Peso		Diâmetro		Volume	
C	I	C	I	C	I
0,133	0,089	8	7	121,0	81,0
0,157	0,059	8	6	142,8	53,7
0,142	0,052	8	6	129,2	47,3
0,130	0,077	7	6	118,3	70,1
0,143	0,089	8	7	130,1	81,0
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,1410	0,0732	7,8	6,4	128,28	66,62
U calc. = 0*		U calc. = 1*		U calc. = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,008		p U = 0,004	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

4.1.3. Comprimento do cordão umbilical

O cordão umbilical dos fetos do grupo infectado apresentou-se mais curto (0,6cm) que o do feto controle (0,9cm). Tal diferença foi significativa para $\alpha = 0,01$ (Tabela 3). A relação comprimento do feto/comprimento do cordão umbilical não apresentou diferença significativa entre o grupo infectado e o controle.

Tabela 3. Valores do comprimento do cordão umbilical (cm) e da relação comprimento do feto/comprimento do cordão umbilical (cm/cm) dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Cordão umbilical		Comprimento feto/comprimento cordão	
C	I	C	I
0,9	0,6	3,00	3,33
0,9	0,6	3,00	3,00
1,0	0,6	2,80	2,83
0,7	0,6	3,57	3,00
1,0	0,6	2,70	3,33
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,9	0,6	3,014	3,098
U calc. = 0*		U calc. = 9 ^{ns}	
p U = 0,004		p U = 0,274	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

^{ns} não significativa

4.1.4. Relações peso fetal / peso da placenta e peso fetal / comprimento do cordão umbilical

A relação peso fetal/peso da placenta mostrou-se menor (9,97) no feto do grupo infectado, quando comparado ao controle (11,76). O teste de Mann-Whitney mostrou ser a diferença significativa para $\alpha = 0,01$ (Tabela 4).

Da mesma maneira, a relação peso fetal/comprimento do cordão umbilical mostrou-se diminuída (1,21) nos fetos do grupo infectado, quando comparado aos do grupo controle (1,86), e tal diferença era significativa para $\alpha = 0,01$ (Tabela 4).

Tabela 4. Valores das relações peso do feto / peso da placenta (g/g) e peso de feto / comprimento do cordão umbilical (g/cm) dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Peso feto / peso placenta		Peso feto / comprimento cordão	
C	I	C	I
12,60	10,21	1,86	1,52
10,36	11,10	1,81	1,09
12,29	10,85	1,75	0,94
12,08	7,49	2,24	0,96
11,54	10,22	1,65	1,52
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
11,77	9,97	1,86	1,21
U calc. = 2*		U calc. = 0*	
p U = 0,016		p U = 0,004	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

4.1.5. Histopatologia

4.1.5.1. Placenta

a) Grupo controle

Decídua

A camada decídua apresenta limites marcados por células largas (gigantes), nos cortes examinados. Os vasos levemente ectásicos e congestos, mostram marginação de leucócitos (neutrófilos), escasso material proteináceo, eosinofílico e homogêneo, marcando a silhueta vascular e infiltrado inflamatório paucicelular; constituído na sua intimidade por predomínio de neutrófilos (polimorfonucleares) e linfócitos (mononucleares). O edema intersticial é discreto e não se observa edema intracelular digno de nota. Nos limites entre as camadas decídua e esponjosa os vasos apresentam-se mais dilatados (Figura 1).

Esponjosa

A camada esponjosa apresenta espongioblastos regulares, poligonais, de citoplasma mais basofílico, de limites esmaecidos. Os núcleos destas células são regulares, a cromatina do núcleo bem distribuída, homogênea e levemente grumosa. Observa-se presença de raras figuras de mitoses típicas na parte mais distal das trabéculas de sua camada que invaginam para a intimidade da labiríntica. Observa-se discreto edema intercelular com os espongioblastos apresentando pouco ou nenhum vacúolo citoplasmático. Os capilares são regulares e as células endoteliais de tamanho uniforme. Os seus vasos são mais calibrosos e congestos ao longo do limite com a decídua. As células gigantes apresentam núcleo alongado, ligeiramente fusiforme, com cromatina uniforme, levemente grumosa, com nucléolo excêntrico, e citoplasma eosinofílico de limites pouco precisos (Figuras 1 e 2).

Labiríntica

A camada labiríntica é constituída por miríades de capilares que parecem obedecer uma disposição estratigráfica, com calibres uniformes e congestos. De permeio, observa-se delgadas traves de tecido conjuntivo frouxo. Na sua parte mais basal, nota-se o epitélio do saco vitelínico com células epiteliais cuboidais, por vezes cilíndricas, com disposição em paliçada. Nesta área limítrofe, observa-se vasos dilatados à figura de diminutos lagos sangüíneos pela sua fina e delicada parede. Na sua área mais periférica, a labiríntica mostra sua celularidade com disposição a formar lacunas e cordões celulares; e, na sua área central apresenta a capilaridade já descrita. Esta camada constitui dois terços da espessura da placenta (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Sinóptico

As células da placenta, em toda a sua extensão, desde a camada decídua até os limites externos da labiríntica, exibem regularidade no tamanho, disposição e inter-relação. O edema apresentado é escasso e mais intercelular, principalmente na decídua. O infiltrado inflamatório é paucicelular constituído por neutrófilos e linfócitos restritos à camada decídua, que não evidencia áreas de degeneração, necrose e calcificação distrófica digna de nota. Os vasos das camadas esponjosa e labiríntica têm paredes delgadas, de silhuetas esmaecidas e não há parasitismo. As células gigantes encontradas nos limites da camada decídua, mostram núcleos regulares, elípticos ou ovalares, com nucléolos conspícuos e citoplasma algo eosinofílico de limites pouco precisos.

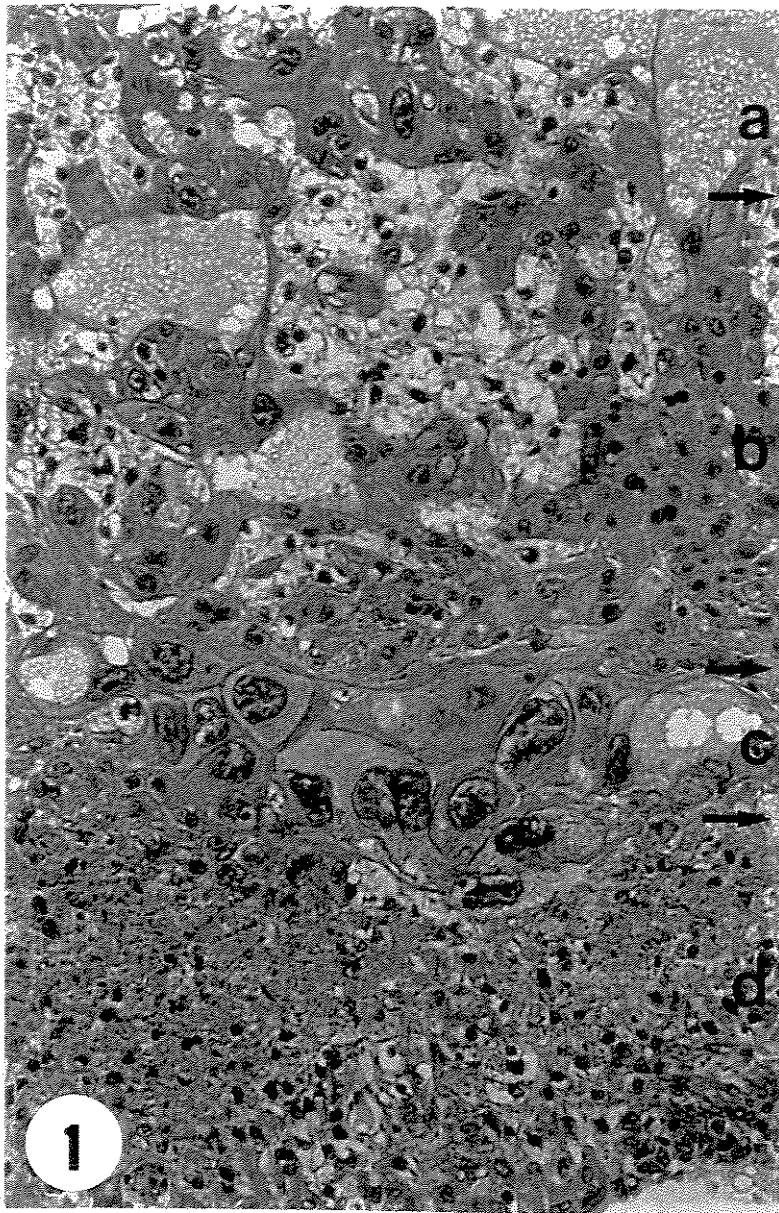


Figura 1. Fotomicrografia da placenta do animal controle. Notar de cima para baixo a camada labiríntica (a), a esponjosa (b), a camada de células gigantes (c) e a decídua basal ou materna (d). Hematoxilina e eosina (250X).

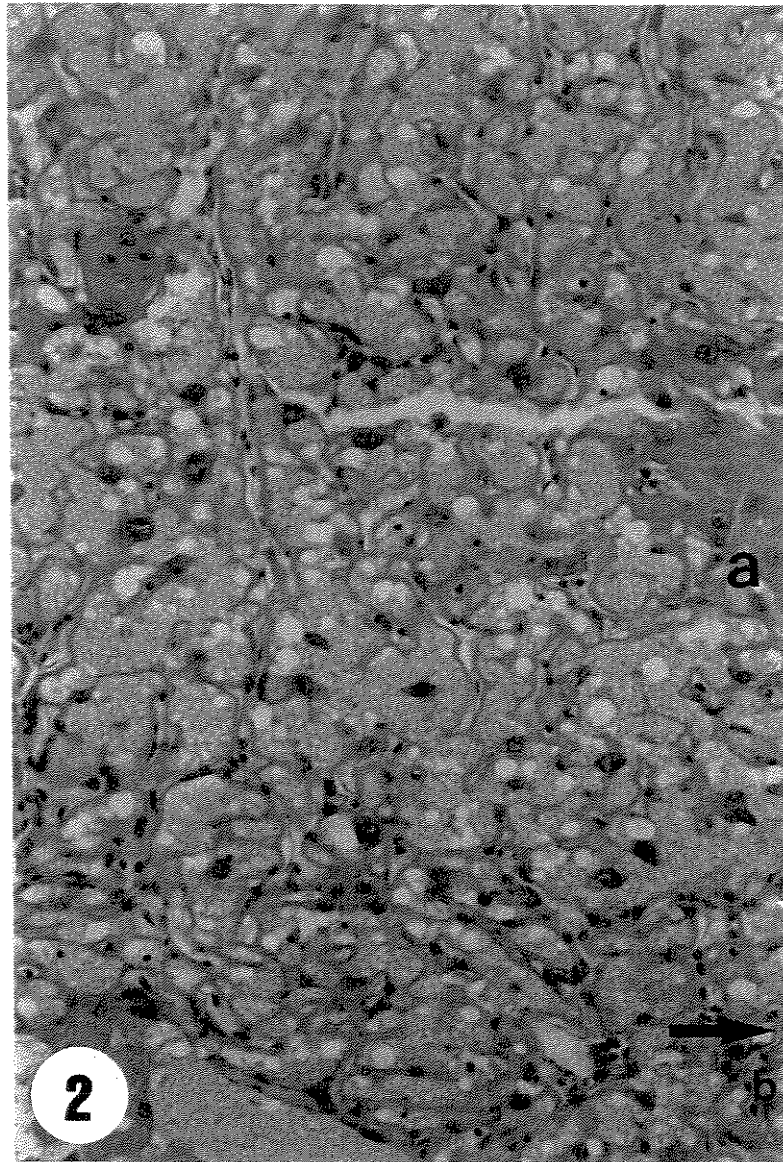


Figura 2. Fotomicrografia da placenta do animal controle. Notar as camadas labiríntica (a) e esponjosa (b). Hematoxilina e eosina (250X).



Figura 3. Aspecto histológico da placenta do animal controle. Notar a área das membranas (a) e a camada labiríntica (b). Hematoxilina e eosina (250X).

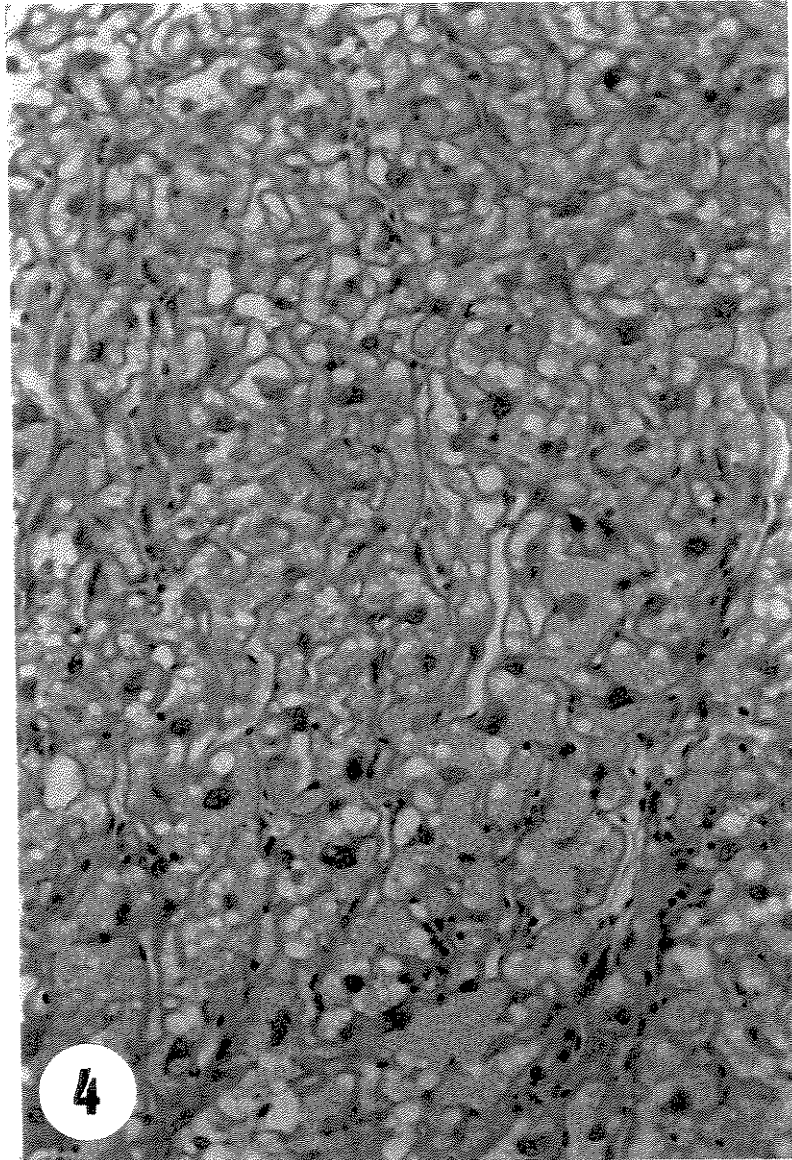


Figura 4. Aspecto histológico da camada labiríntica da placenta do animal controle. Hematoxilina e eosina (250X).

b) Grupo infectado

Decídua

A camada decídua mostra-se intensamente parasitada, compreendendo inclusive as células endoteliais. Observa-se presença de infiltrado inflamatório escasso, constituído por plasmócitos e raros linfócitos; de permeio, áreas escassas de degeneração e necrose de coagulação. Os vasos apresentam células endoteliais aumentadas de volume com núcleos mostrando nucléolos proeminentes, e material hialino, proteináceo, homogêneo, espessando e marcando a silhueta de suas paredes. Estes vasos apresentam-se pouco ectásicos e congestos. Nas áreas de degeneração e necrose observa-se presença de calcificação distrófica escassa (Figuras 6, 7, 9, 14 e 15).

Esponjosa

A camada esponjosa apresenta edema intracelular intenso e mais discreto intercelular. Os espongioblastos mostram núcleos hipercromáticos e citoplasma mais eosinófilico, principalmente na área mais central da camada (degeneração). Os vasos apresentam células endoteliais aumentadas de volume com nucléolos aparentes, espessamento das silhuetas dos vasos por material hialino, proteináceo, homogêneo e congestão de suas luzes. O parasitismo é escasso, representado por ninhos pequenos, mostrando ninhos mais proeminentes e maiores nos espongioblastos das trabéculas que se invaginam na camada labiríntica, contendo por vezes grandes ninhos. Nesta camada são vistas as células gigantes, que exibem núcleos hipercromáticos e citoplasma eosinófilico (Figuras 6, 8 e 13).

Labiríntica

A camada labiríntica apresenta intenso parasitismo com grandes ninhos de amastigotas (>100) tomando as células endoteliais, sem reação inflamatória. Os capilares mostram-se ectásicos e congestos; por vezes, distorcidos, perdendo sua estratificação normal. A silhueta dos capilares, espessada por material hialino, proteináceo, homogêneo, é bem marcada. O epitélio do saco vitelínico mostra edema intracelular, vasos ectásicos e congestos (Figuras 5, 6, 10, 11, 12 e 13).

Sinóptico

O grupo de animais infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* apresentou parasitismo com ninhos grandes nas camadas decídua, esponjosa e labiríntica, porém, com escassa reação inflamatória na decídua, constituída por plasmócitos e linfócitos; áreas de degeneração e necrose escassas, com exígua calcificação distrófica nesta camada. Nas camadas esponjosa e labiríntica, embora apresentando parasitismo, não havia evidência de resposta inflamatória. Os vasos das três camadas (decídua, esponjosa e labiríntica), apresentaram-se com suas silhuetas bem marcadas pela presença de material proteináceo, hialino e homogêneo (estravasamento - aumento de permeabilidade vascular a material proteico).

Nas Tabelas 5 e 6 estão expressos resumidamente os quadros inflamatório e parasitário presentes nas placentas dos animais de ambos os grupos estudados.

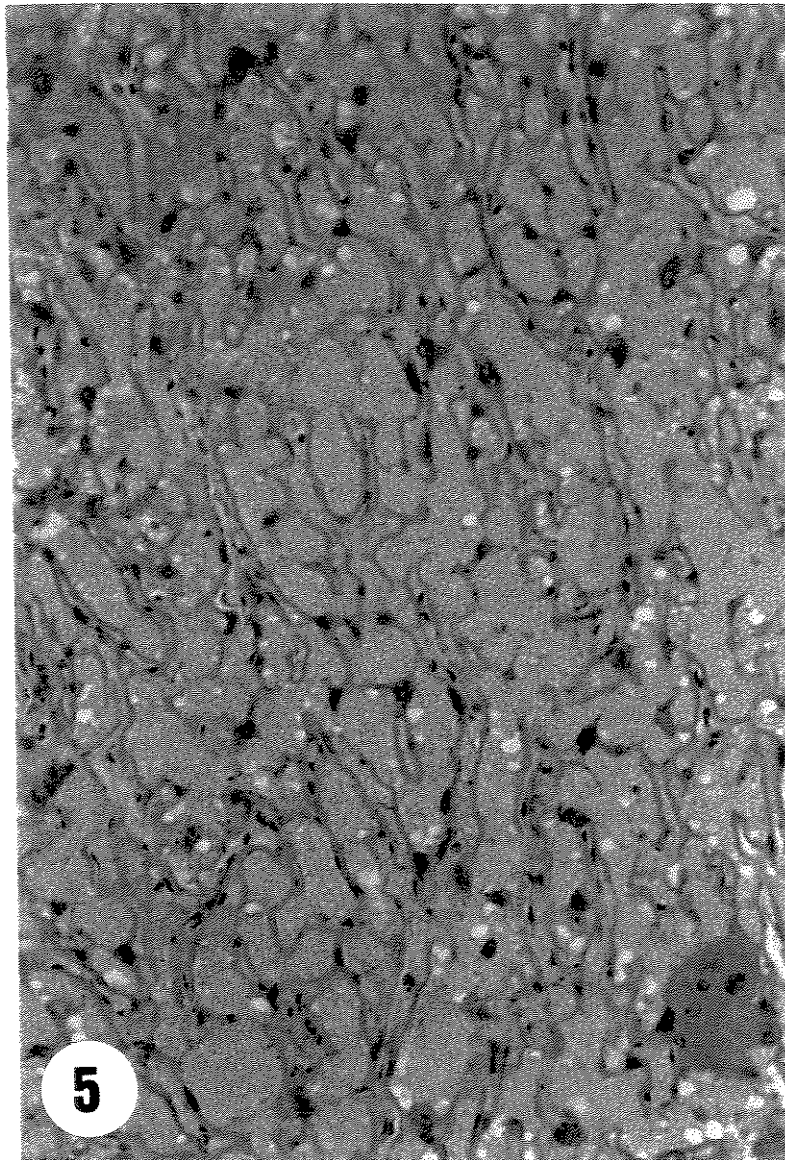


Figura 5. Aspecto histológico da camada labiríntica da placenta do animal infectado com a cepa RAL de *T.cruzi*. Notar os trofoblastos mais delgados. Hematoxilina e eosina (250X).

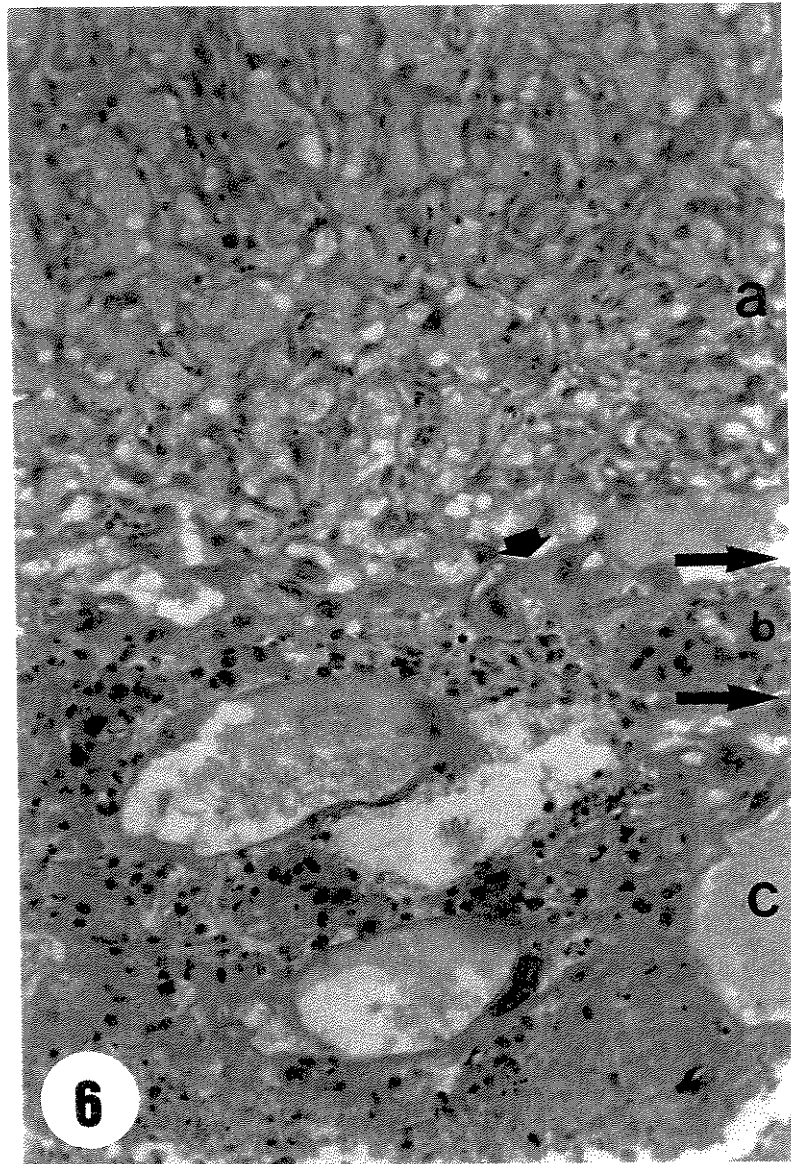


Figura 6. Fotomicrografia da placenta do animal infectado com a cepa RAL de *T. cruzi*. Notar de cima para baixo a camada labiríntica (a), a esponjosa bem reduzida (b), a decídua com vasos dilatados e áreas de necrose (c); as células gigantes são escassas e menos volumosas (seta cheia). Hematoxilina e eosina (210 X).

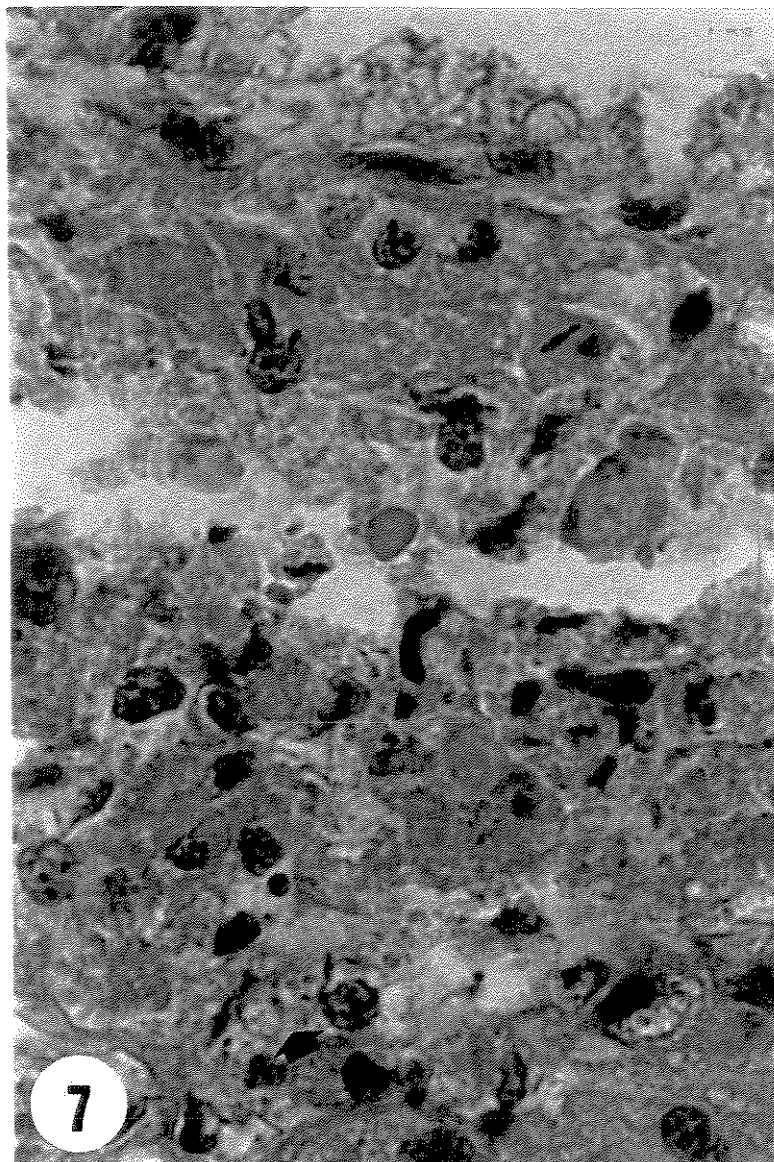


Figura 7. Fotomicrografia da camada decídua da placenta do animal infectado com a cepa RAL de *T.cruzi*. Notar áreas de necrose e ninhos do parasita (seta). Hematoxilina e eosina (950X).

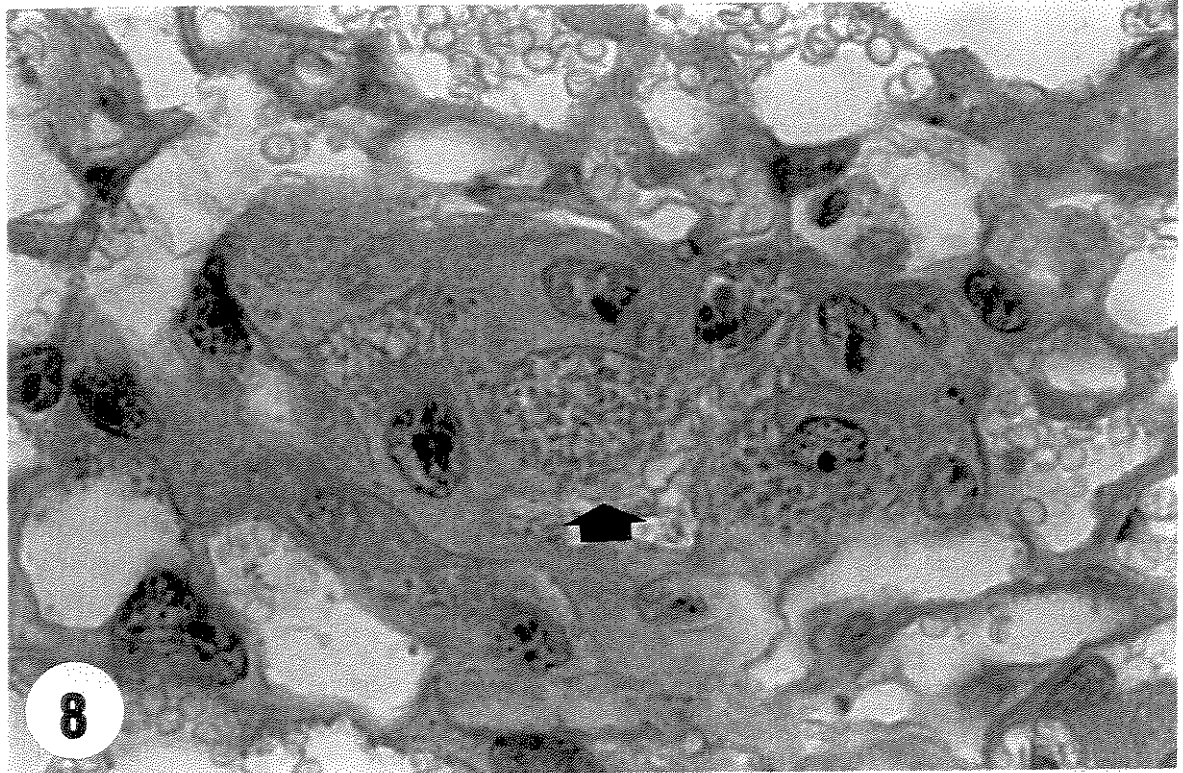


Figura 8. Aspecto histológico da placenta do animal infectado com a cepa RAL de *T.cruzi*.
Notar as células gigantes com ninhos de amastigotas. HE (950X).

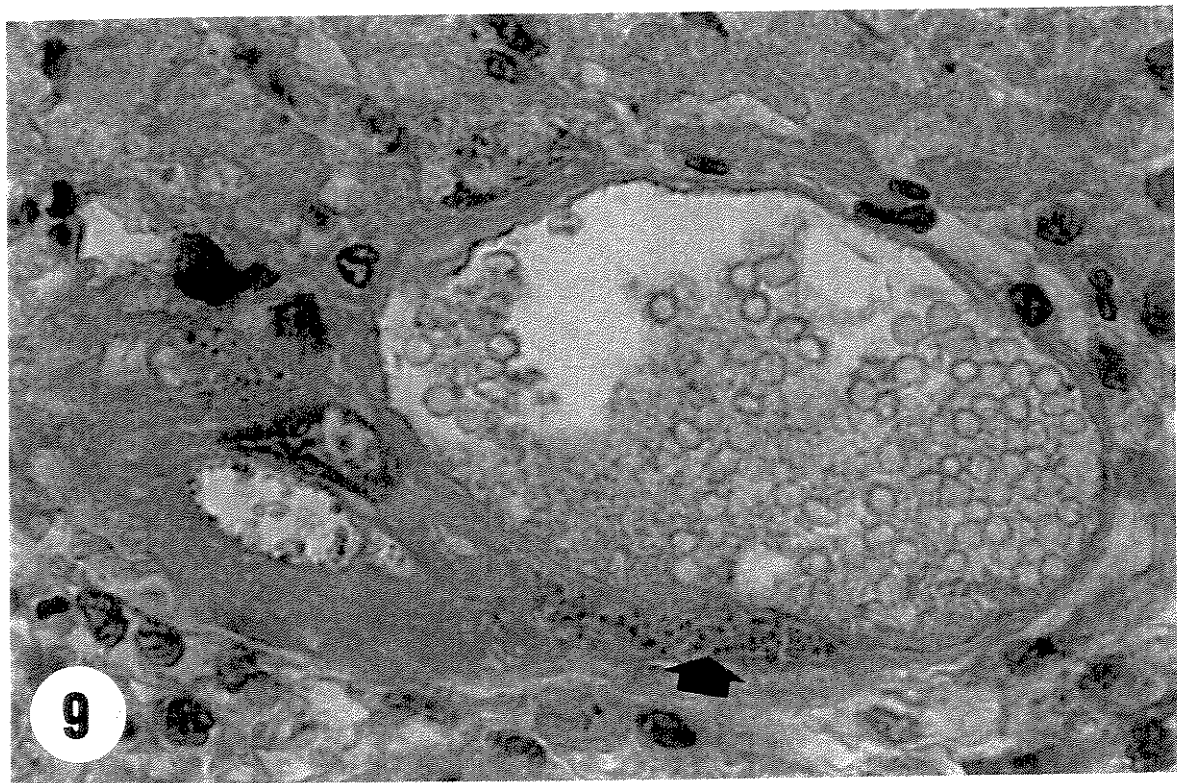


Figura 9. Placenta do animal infectado com a cepa RAL de *T.cruzi*. Notar capilar dilatado
com ninhos de amastigotas (seta) na camada decídua materna. HE (950X).

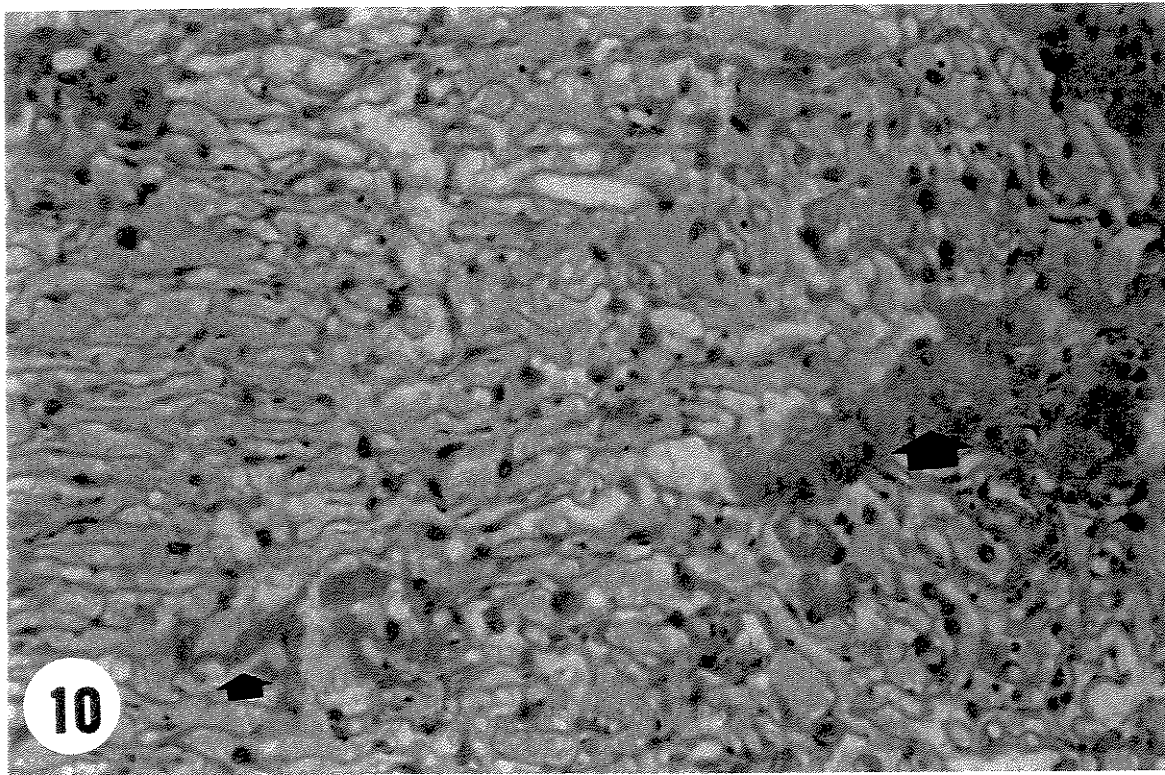


Figura 10. Placenta do animal infectado com a cepa RAL de *T.cruzi*. Notar a camada labiríntica com ninhos de amastigotas nos trofoblastos (setas). HE (250X).

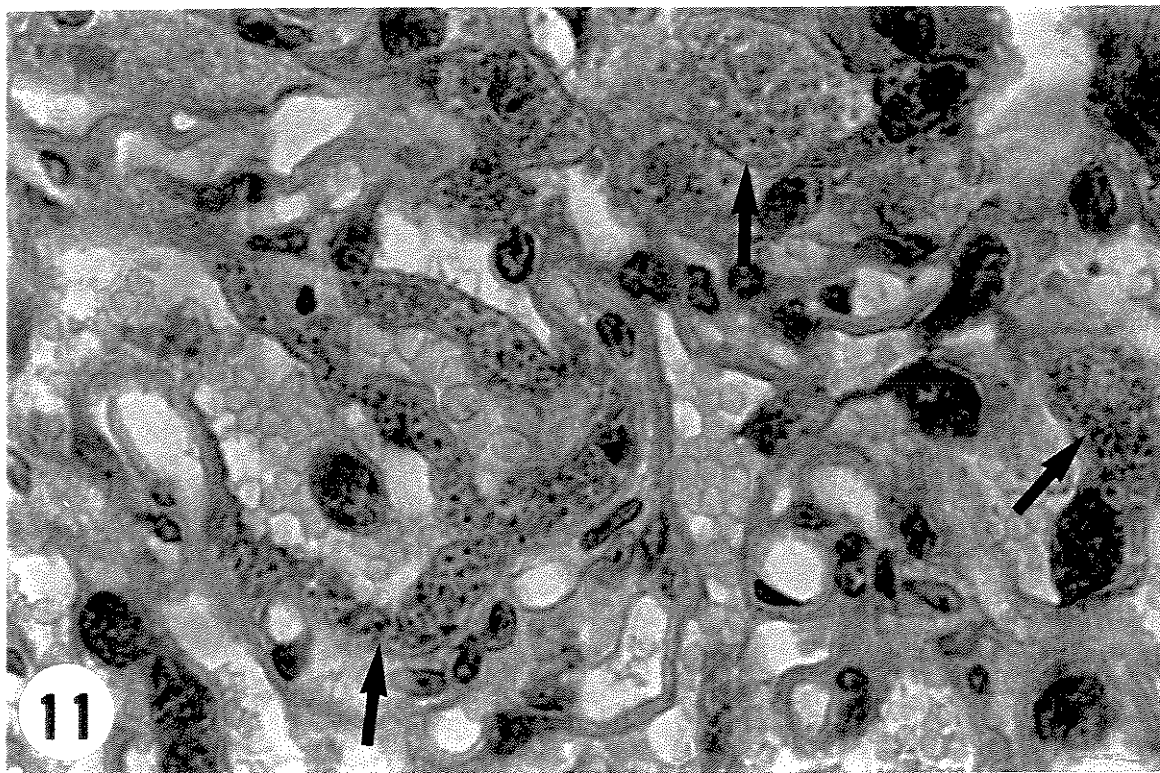


Figura 11. Placenta do animal infectado pela cepa RAL de *T.cruzi*. Notar a camada esponjosa em maior aumento com ninhos de amastigotas nos trofoblastos (setas). HE (950X).

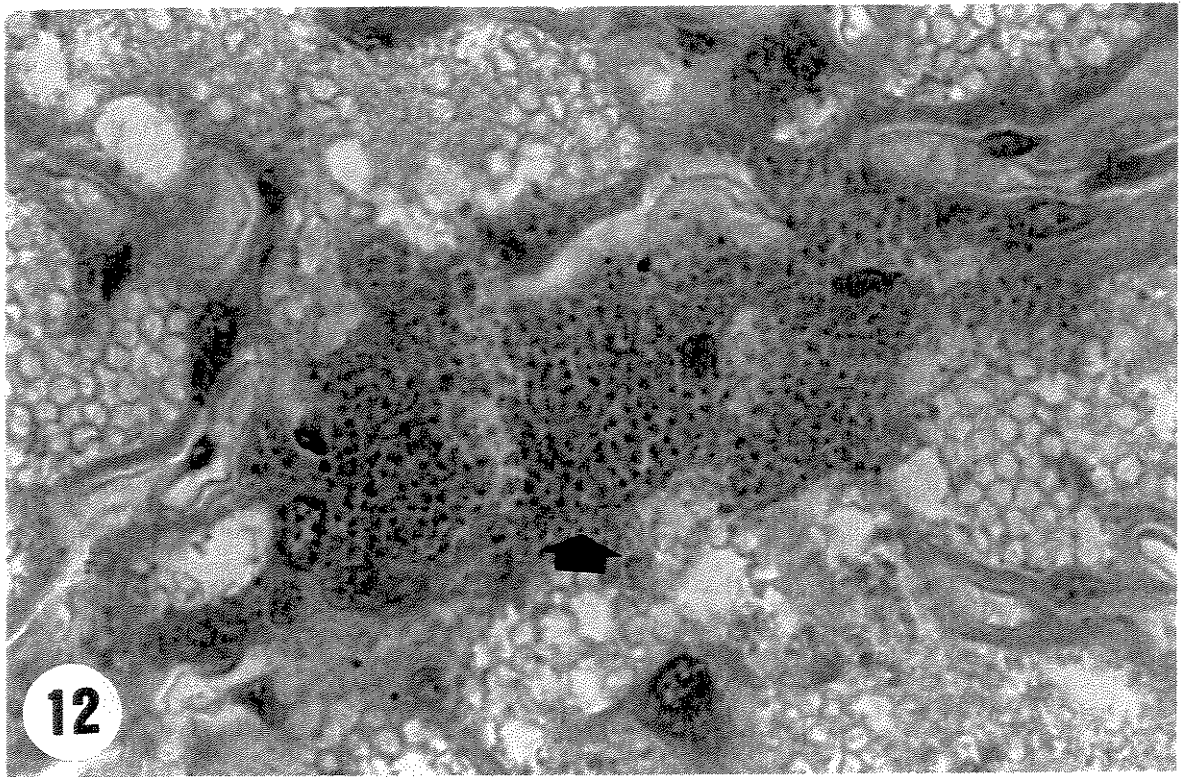


Figura 12. Camada labiríntica do animal infectado em maior aumento. Notar o ninho de amastigotas nos trofoblastos (seta). HE (950X).



Figura 13. Placenta do animal infectado, mostrando a labiríntica (a) e a esponjosa (b) com ninhos de amastigotas dentro do vaso. HE (950X).

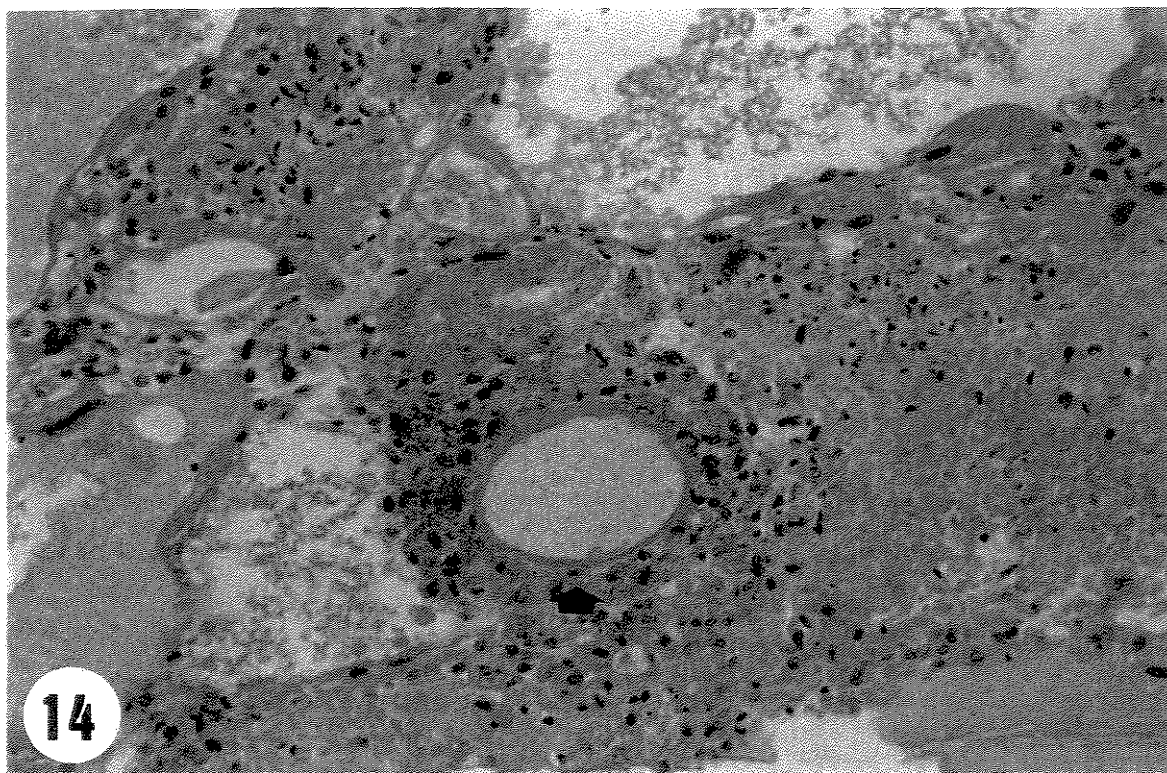


Figura 14. Decídua da placenta do animal parasitado por *T. cruzi*. Notar vaso materno com fibrinóide na parede e parasitas ao redor (seta), além de áreas de necrose. HE (250X).

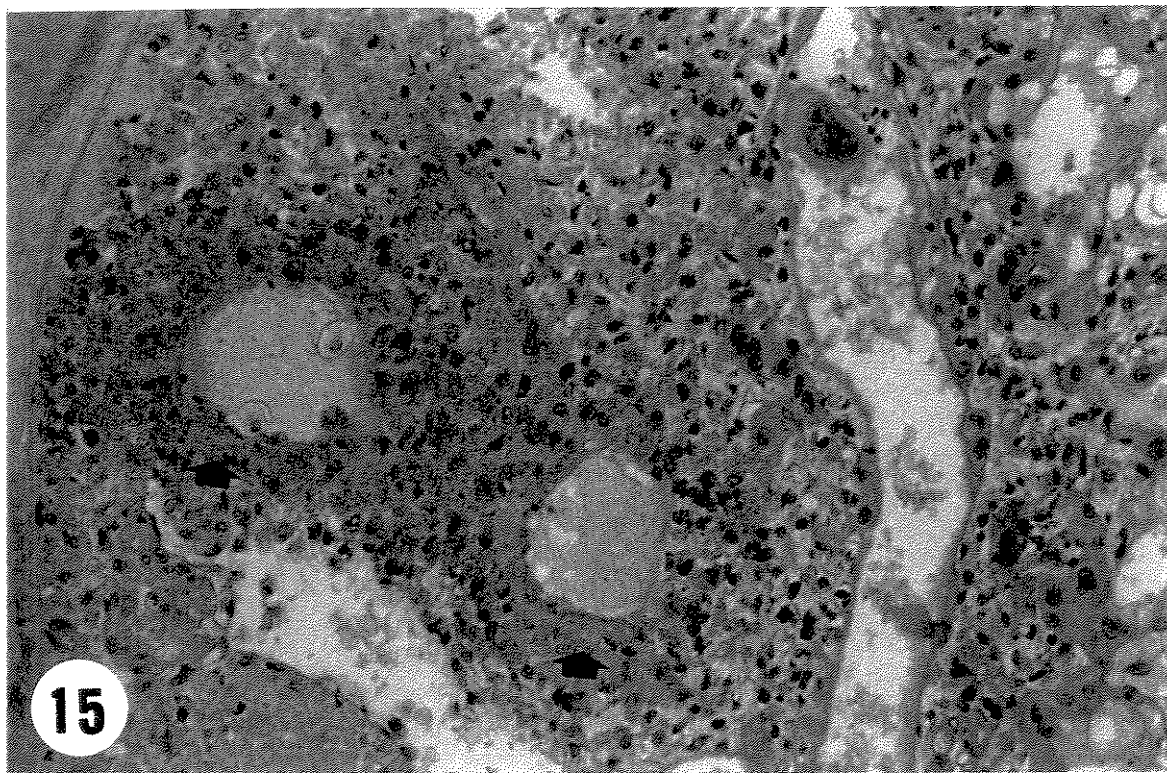


Figura 15. Decídua com áreas de invasão parasitária ao redor dos vasos (setas). HE (250X).

Tabela 5. Quadro geral do processo inflamatório nas placentas de camundongos controles e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi*.

Estruturas	Grupo Controle	Grupo Infectado pela cepa RAL
Camadas envolvidas	Decídua	Decídua
Infiltrado inflamatório	Neutrófilos, linfócitos	Plasmócitos, linfócitos
Edema nas camadas	(Ausente a exíguo) Decídua	Decídua, Esponjosa e Labiríntica
Degeneração, necrose, calcificação	(Ausentes a exíguas) Decídua	Decídua
Célula gigante	Preservada	Pouco degenerada

Tabela 6. Quadro geral do processo infeccioso (parasitário) nas placentas de camundongos controles e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi*.

Estrutura	Grupo Controle	Grupo Infectado pela cepa RAL
Camadas parasitadas	Ausente	Decídua, Esponjosa e Labiríntica
Tamanho dos ninhos	Ausente	Grande*
Célula gigante parasitada	Ausente	Presente
Outras células parasitadas	Ausente	Endotelial, espongioblastos e decídua

* Ninho grande > 100 amastigotas.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.1.5.2. Órgãos fetais

4.1.5.2.1. Fígado

O fígado do feto controle apresentou-se com lóbulos modestamente constituídos, já que o conteúdo de tecido intersticial era pouco. Só puderam ser percebidos quando localizada a veia centrolobular e os ductos biliares. Os hepatócitos mostraram-se volumosos com núcleos bem evidentes. Foram visíveis ainda os megacariócitos e os linfócitos, geralmente aderidos nas paredes dos sinusóides. Os sinusóides eram amplos (Figura 16).

No feto do grupo infectado, o fígado apresentou hepatócitos nem sempre bem constituídos. Os sinusóides estavam dilatados (Figura 17) e eram visíveis áreas de desorganização (Figura 18). Em outras áreas, os hepatócitos mostraram-se mais volumosos. Não foram encontrados ninhos de parasita.

4.1.5.2.2. Pâncreas

O aspecto histológico do pâncreas do feto de camundongo do grupo controle era de uma glândula acinosa composta por tecido intersticial esparso. A luz acinar era estreita. O ácino era grande e os grânulos de secreção eram bem visíveis. Nos lóbulos estavam espalhados agrupamentos estéricos de células endócrinas (ilhotas de Lagerhans) (Figura 19).

No feto do grupo infectado pela cepa RAL de *T.cruzi*, o pâncreas estava bem preservado e com estrutura semelhante à do controle. Não foram observados ninhos de amastigotas nesta glândula (Figura 20).

4.1.5.2.3. Coração

A musculatura cardíaca do feto controle estava constituída de fibras unidas e anastomosadas, com núcleos grandes e ovais. A estriação era visível (Figura 21).

No feto do grupo infectado, a musculatura estava constituída de fibras mais dispersas, com núcleo de menor volume e com áreas de hemorragia (Figura 22).

Observou-se ausência de ninhos de parasita.

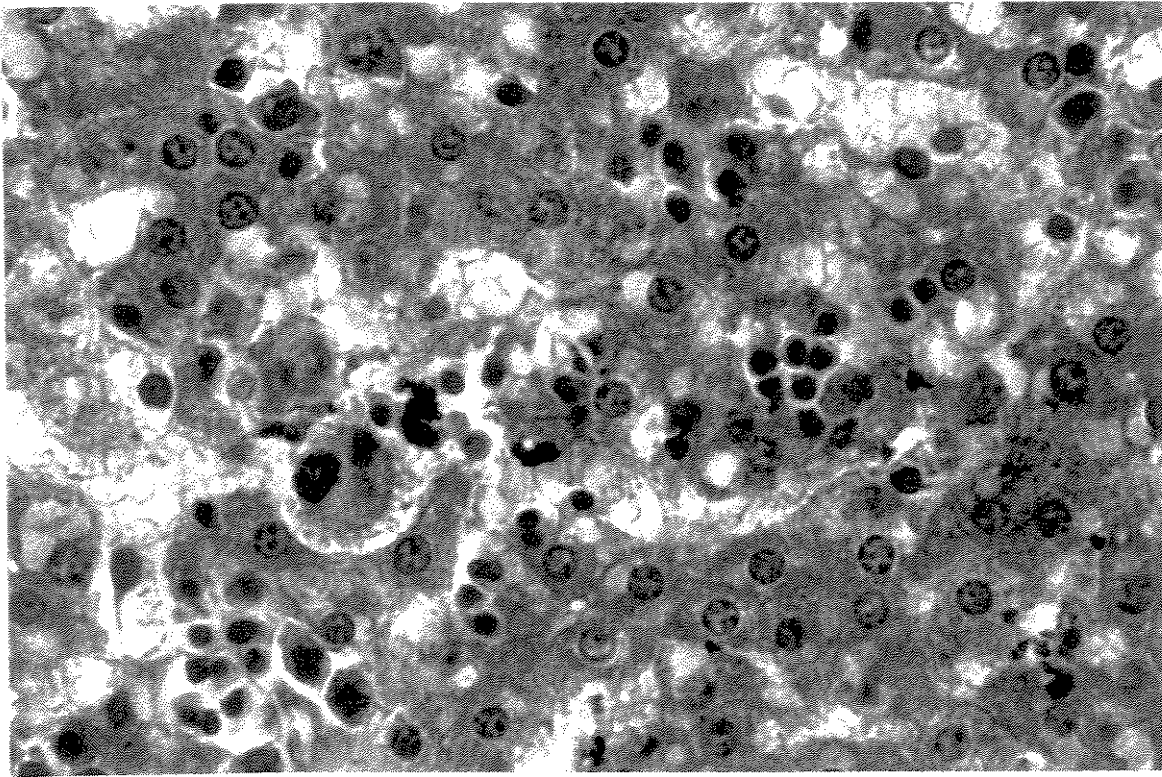


Figura 16. Aspecto histológico do fígado do feto do grupo controle. HE (950X).

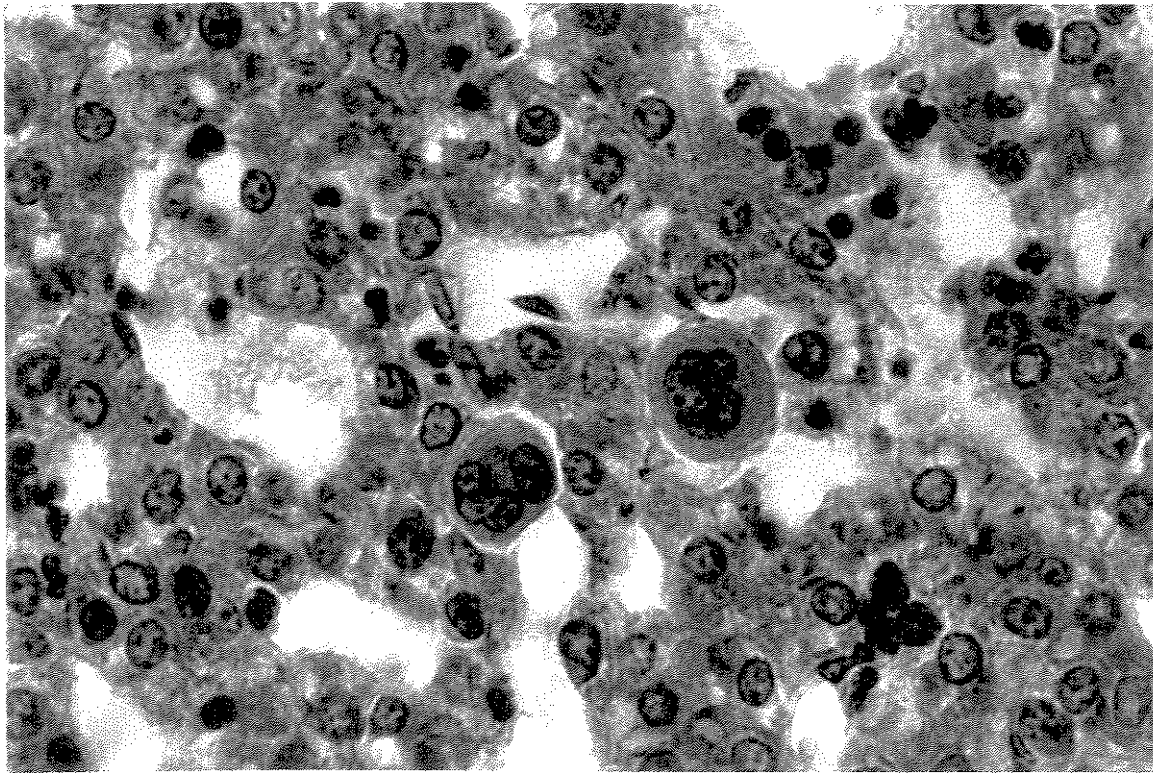


Figura 17. Aspecto histológico do fígado do feto do grupo infectado por *T. cruzi* (cepa RAL).
Notar sinusóides dilatados e megacariócitos. HE (950X).

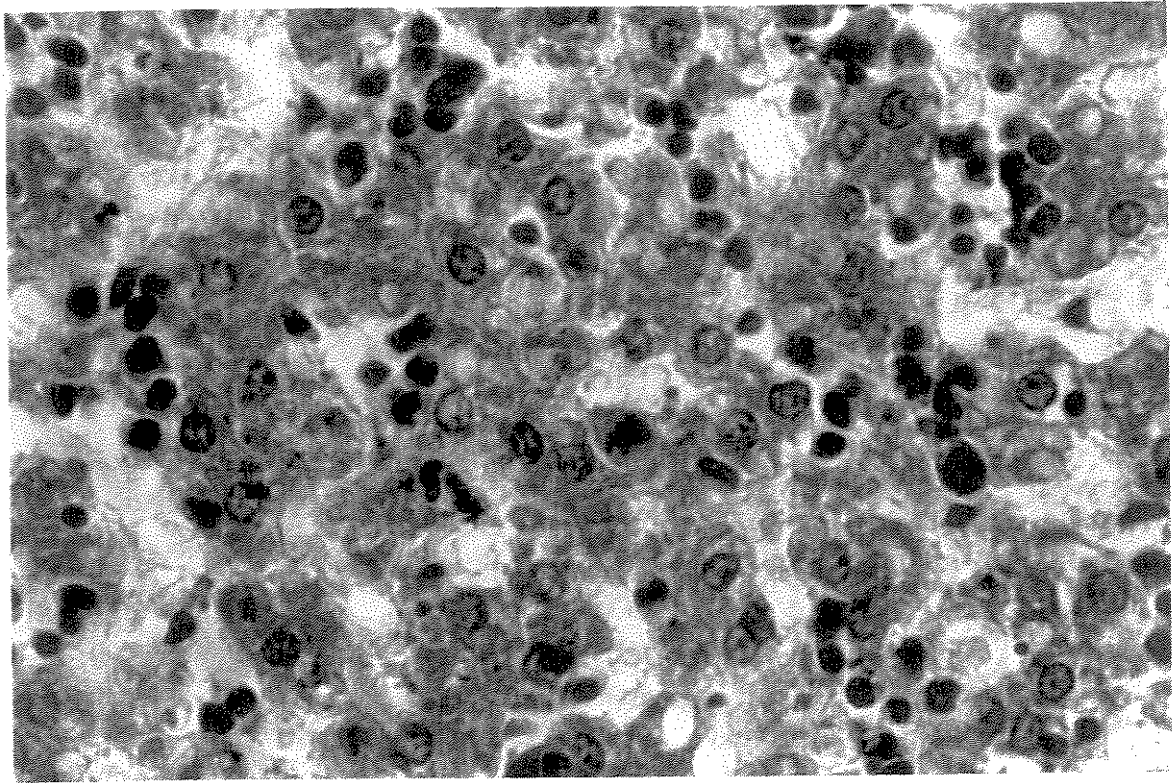


Figura 18. Aspecto histológico do fígado do feto do grupo infectado. Notar a desorganização tecidual. HE (950X).

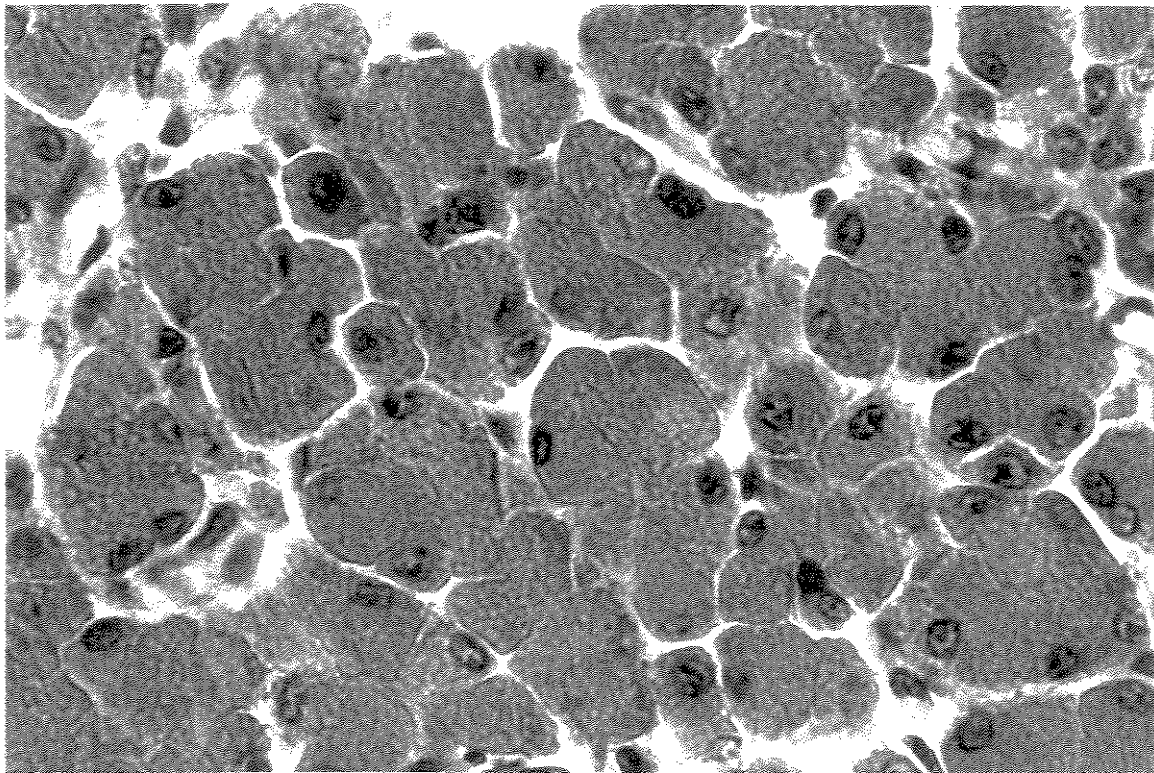


Figura 19. Aspecto histológico do pâncreas do feto do grupo controle. HE (950X).

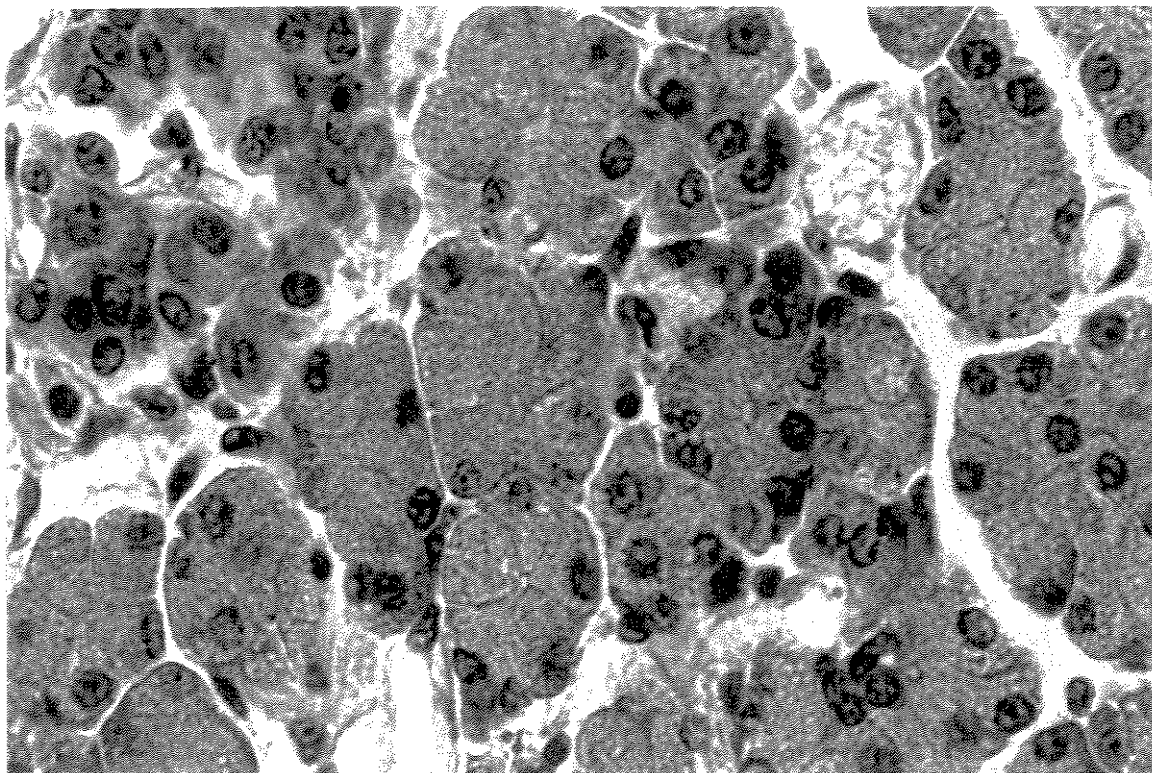


Figura 20. Aspecto histológico do pâncreas do feto do grupo infectado por *T. cruzi* (cepa RAL). HE (950X)

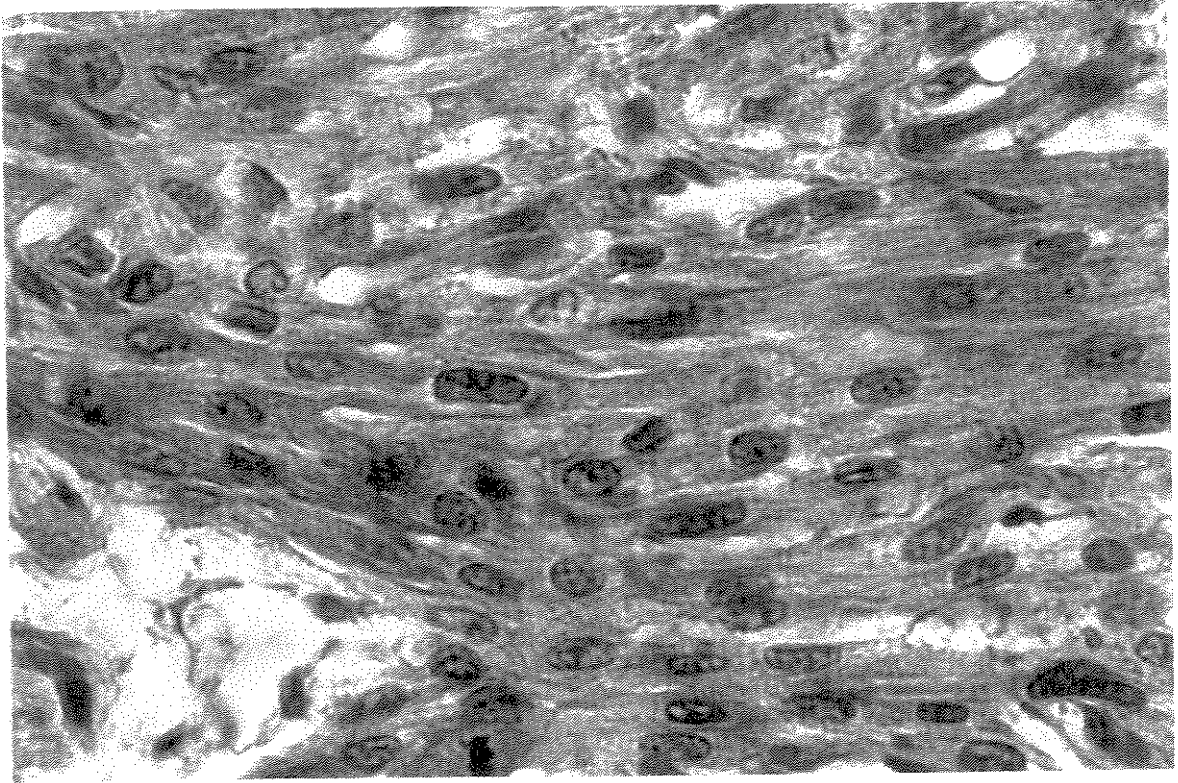


Figura 21. Aspecto histológico do coração do feto do grupo controle. HE (950X).

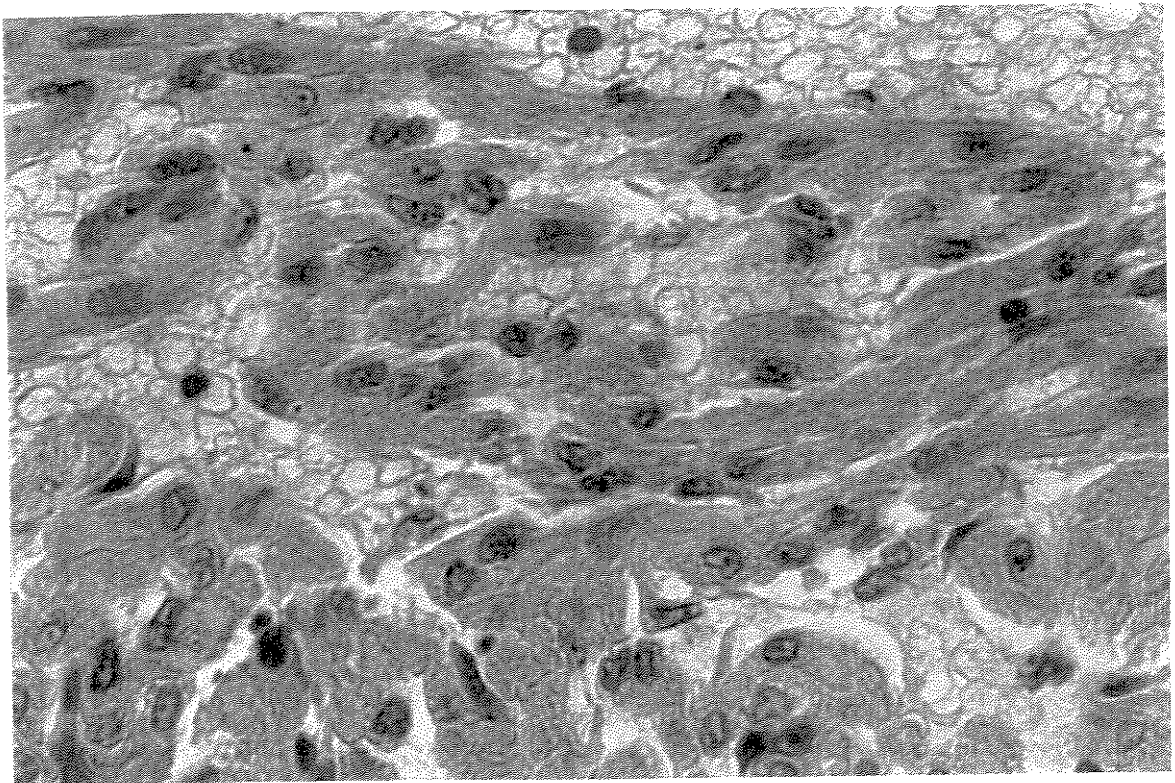


Figura 22. Aspecto histológico do coração do feto do grupo infectado por *T. cruzi* (cepa RAL).
Notar a desorganização tecidual. HE (950X).

4.2. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

4.2.1. Cariometria dos espongioblastos

Os diâmetros maior, menor e médio dos núcleos dos espongioblastos mostraram-se diminuídos nos animais infectados pela cepa RAL de *T. cruzi* (6,30 μm ; 4,86 μm e 5,51 μm), quando comparados aos dos animais controles (7,00 μm ; 5,61 μm e 6,25 μm). Tais diferenças foram significantes (Tabela 7, $p < 0,01$). A relação D/d mostrou-se não significativa no confronto efetuado (1,31 para o infectado e 1,27 para o controle) (Tabela 7).

O volume, área, perímetro e relação V/A mostraram-se menores nos animais infectados (93,05 μm^3 , 24,33 μm^2 , 17,66 μm e 3,67, respectivamente), quando comparados aos controles (132,59 μm^3 , 31,08 μm^2 , 19,92 μm e 4,17, respectivamente). A análise estatística efetuada mostrou que as diferenças eram altamente significantes para $\alpha = 0,01$ (Tabela 8).

Na Tabela 9 estão expressos os valores da excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno destes núcleos. Da sua análise verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e infectado pela cepa RAL de *T. cruzi*.

Os núcleos dos espongioblastos dos animais infectados eram menores, porém não apresentaram alteração de forma.

Tabela 7. Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μm) e relação D/d dos núcleos dos espongioblastos das placentas dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro maior		Diâmetro menor		Diâmetro médio		Relação D/d	
C	I	C	I	C	I	C	I
6,72	6,42	5,39	5,15	6,02	5,73	1,26	1,27
6,94	6,14	6,00	4,75	6,45	5,37	1,17	1,31
7,38	6,08	5,89	4,80	6,57	5,37	1,27	1,28
7,28	6,37	5,60	4,90	6,37	5,56	1,32	1,32
6,72	6,51	5,20	4,74	5,89	5,52	1,31	1,39
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
7,00	6,30	5,61	4,86	6,26	5,51	1,27	1,31
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 6,5 ^{ns}	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,133	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

^{ns} não significativa

Tabela 8. Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação V/A dos núcleos dos espongioblastos das placentas dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	I	C	I	C	I	C	I
115,59	105,04	28,50	26,32	19,11	18,26	4,00	3,82
144,25	86,81	32,94	23,18	20,37	17,23	4,30	3,58
153,47	85,88	34,29	23,11	20,93	17,19	4,38	3,58
140,28	93,57	32,23	24,58	20,35	17,81	4,24	3,70
109,34	93,96	27,47	24,46	18,83	17,83	3,93	3,68
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
132,59	93,05	31,09	24,33	19,92	17,66	4,17	3,67
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

Tabela 9. Valores médios do coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade dos núcleos dos espongioblastos das placentas dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Coeficiente de forma		Índice de contorno		Excentricidade	
C	I	C	I	C	I
0,98	0,99	3,58	3,56	0,60	0,60
1,00	0,98	3,55	3,58	0,50	0,63
0,98	0,98	3,57	3,58	0,60	0,61
0,98	0,97	3,58	3,59	0,64	0,64
0,97	0,97	3,59	3,61	0,63	0,69
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,98	0,98	3,57	3,58	0,59	0,63
U calc. = 10 ^{ns}		U calc. = 8,5 ^{ns}		U calc. = 7 ^{ns}	
p U = 0,345		p U = 0,242		p U = 0,155	

^{ns} não significante

4.2.2. Cariometria das células gigantes

Os diâmetros maior, menor e médio dos núcleos das células gigantes mostraram-se significativamente diminuídos nos animais infectados com a cepa RAL de *T.cruzi* (18,82 μ m; 10,58 μ m e 14,10 μ m), quando comparados aos dos animais controles (21,88 μ m; 16,34 μ m; 18,89 μ m) ($p < 0,01$ - Tabela 10). A relação D/d mostrou valor significativamente maior ($p < 0,01$) para o animal infectado (1,79) que o controle (1,34).

O volume, área, perímetro e relação V/A mostraram valores menores nos animais infectados (1467,65 μ m³; 156,51 μ m²; 47,17 μ m e 9,34 respectivamente), quando comparados aos dos animais controles (3512,19 μ m³; 280,47 μ m²; 60,38 μ m e 12,51) (Tabela 11 - $p < 0,01$).

Analisando-se a Tabela 12, verifica-se que os valores para o índice de contorno e excentricidade dos núcleos das células gigantes são maiores no grupo infectado (3,78 e 0,83) que no controle (3,61 e 0,66) ($p < 0,01$), enquanto que o coeficiente de forma era menor (0,88) quando comparado ao do controle (0,97) ($p < 0,01$).

Os núcleos das células gigantes dos animais infectados eram menores, porém mais alongados.

Tabela 10. Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μm) e relação D/d dos núcleos das células gigantes das placentas dos animais dos grupos controle (C) e infectado pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro maior		Diâmetro menor		Diâmetro médio		Relação D/d	
C	I	C	I	C	I	C	I
22,9	19,3	16,6	11,4	19,50	14,83	1,38	1,69
21,7	19,8	16,9	10,1	19,15	14,14	1,28	1,96
20,8	18,9	17,2	11,1	18,91	14,48	1,21	1,70
20,7	18,3	15,9	9,0	18,14	12,83	1,30	2,03
23,3	17,9	15,1	11,3	18,76	14,22	1,54	1,58
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
21,88	18,84	16,34	10,58	18,89	14,10	1,34	1,79
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

Tabela 11. Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação V/A dos núcleos das células gigantes das placentas dos animais dos grupos controle (C) e infectado pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	I	C	I	C	I	C	I
3855,74	1696,00	298,65	172,73	62,44	49,04	12,91	9,82
3651,82	1470,12	288,02	157,03	60,87	48,24	12,68	9,36
3516,24	1578,73	280,85	164,67	59,83	47,24	12,52	9,59
3103,95	1098,20	258,44	129,28	57,74	44,17	12,01	8,49
3433,22	1495,21	276,41	158,81	61,01	46,46	12,42	9,42
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
3512,19	1467,65	280,47	156,51	60,38	47,17	12,51	9,34
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

Tabela 12. Valores médios do coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade dos núcleos das células gigantes das placentas dos animais dos grupos controle (C) e infectado pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Coeficiente de forma		Índice de contorno		Excentricidade	
C	I	C	I	C	I
0,96	0,90	3,61	3,73	0,69	0,81
0,98	0,85	3,59	3,85	0,63	0,86
0,99	0,90	3,57	3,74	0,56	0,81
0,97	0,83	3,59	3,88	0,64	0,87
0,93	0,92	3,67	3,69	0,76	0,78
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,97	0,88	3,61	3,78	0,66	0,83
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

* Estatisticamente significante para $\alpha = 0,01$

UNICAMP
 Instituto de Física de Caracaras
 Caixa Postal 609
 13506-900 - Caracaras, SP

4.2.3. Cariometria dos tecidos fetais

4.2.3.1. Fígado

O diâmetro menor dos núcleos dos hepatócitos mostrou-se significativamente diminuído nos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (5,13 μ m) quando comparados ao do grupo controle (5,51 μ m) ($p < 0,05$ - Tabela 13). Os dados apresentados nas Tabelas 14 e 15 não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 13. Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μ m) e relação D/d dos núcleos dos hepatócitos dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro maior		Diâmetro menor		Diâmetro médio		Relação D/d	
C	I	C	I	C	I	C	I
6,51	5,94	5,42	4,87	5,93	5,37	1,21	1,22
6,28	5,95	5,40	5,12	5,82	5,51	1,17	1,17
6,45	6,24	5,49	5,20	5,94	5,69	1,18	1,21
6,52	6,81	5,51	5,56	5,98	6,14	1,19	1,24
6,32	5,77	5,74	4,88	6,02	5,30	1,10	1,19
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
6,42	6,14	5,51	5,13	5,94	5,60	1,17	1,21
U calc. = 5 ^{ns}		U calc. = 4*		U calc. = 5 ^{ns}		U calc. = 5,5 ^{ns}	
p U = 0,075		p U = 0,048		p U = 0,075		p U = 0,093	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,05$

^{ns} não significante

Tabela 14. Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação V/A dos núcleos dos hepatócitos dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	I	C	I	C	I	C	I
111,79	82,98	27,83	22,84	18,80	17,03	3,95	3,58
105,74	89,36	26,80	24,01	18,39	17,43	3,88	3,67
112,98	100,04	28,00	25,72	18,80	18,02	3,96	3,79
114,19	126,80	28,29	30,05	18,94	19,50	3,99	4,09
116,17	79,61	28,62	22,21	18,96	16,77	4,01	3,53
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
112,17	95,76	27,91	24,97	18,78	17,75	3,96	3,73
U calc. = 5 ^{ns}		U calc. = 5 ^{ns}		U calc. = 5 ^{ns}		U calc. = 5 ^{ns}	
p U = 0,075		p U = 0,075		p U = 0,075		p U = 0,075	

^{ns} não significante

Tabela 15. Valores médios do coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade dos núcleos dos hepatócitos dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Coeficiente de forma		Índice de contorno		Excentricidade	
C	I	C	I	C	I
0,98	0,98	3,58	3,58	0,55	0,57
0,99	0,99	3,57	3,57	0,51	0,51
0,99	0,98	3,57	3,58	0,52	0,55
0,99	0,98	3,57	3,59	0,53	0,58
0,99	0,98	3,55	3,57	0,41	0,53
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,99	0,98	3,57	3,58	0,50	0,55
U calc. = 5 ^{ns}		U calc. = 6 ^{ns}		U calc. = 5,5 ^{ns}	
p U = 0,075		p U = 0,111		p U = 0,093	

^{ns} não significante

4.2.3.2. Pâncreas

Os diâmetros maior e médio dos núcleos das células pancreáticas mostraram-se significativamente diminuídos nos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (5,33 e 4,84 μ m), quando comparados aos fetos controles (5,59 e 5,04 μ m) ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ - Tabela 16).

O volume, área, perímetro e relação V/A apresentaram valores menores nos fetos nascidos de mães infectadas (60,76 μ m³; 18,55 μ m²; 15,37 μ m e 3,23, respectivamente), quando comparados aos fetos controles (69,16 μ m³; 20,17 μ m²; 16,01 μ m e 3,36) (Tabela 17 - $p < 0,01$).

O coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade não apresentaram diferenças significantes entre os grupos estudados (Tabela 18).

Tabela 16. Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μ m) e relação D/d dos núcleos das células acinares do pâncreas dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro maior		Diâmetro menor		Diâmetro médio		Relação D/d	
C	I	C	I	C	I	C	I
5,70	5,15	4,39	4,50	4,99	4,81	1,31	1,15
5,64	5,43	4,74	4,48	5,16	4,92	1,20	1,23
5,34	5,31	4,52	4,30	4,90	4,76	1,19	1,25
5,62	5,36	4,48	4,45	5,00	4,87	1,27	1,22
5,67	5,39	4,69	4,38	5,15	4,85	1,22	1,24
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
5,59	5,33	4,56	4,42	5,04	4,84	1,24	1,22
U calc. = 3*		U calc. = 4,5 ^{ns}		U calc. = 1**		U calc. = 11,5 ^{ns}	
p U = 0,028		p U = 0,061		p U = 0,008		p U = 0,460	

* Estatisticamente significante para $\alpha = 0,05$

** Estatisticamente significante para $\alpha = 0,01$

^{ns} não significante

Tabela 17. Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação V/A dos núcleos das células acinares do pâncreas dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	I	C	I	C	I	C	I
67,04	59,29	19,76	18,27	15,93	15,19	3,33	3,21
75,41	63,26	21,26	19,10	16,35	15,62	3,44	3,28
63,14	57,80	19,03	17,95	15,53	15,16	3,27	3,18
67,63	62,42	19,87	18,83	15,94	15,46	3,34	3,25
72,57	61,05	20,92	18,60	16,32	15,41	3,43	3,23
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
69,16	60,76	20,17	18,55	16,01	15,37	3,36	3,23
U calc. = 1*		U calc. = 1*		U calc. = 1*		U calc. = 1*	
p U = 0,008		p U = 0,008		p U = 0,008		p U = 0,008	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

Tabela 18. Valores médios do coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade dos núcleos das células acinares do pâncreas dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Coeficiente de forma		Índice de contorno		Excentricidade	
C	I	C	I	C	I
0,97	0,99	3,60	3,56	0,64	0,49
0,98	0,98	3,57	3,58	0,54	0,57
0,98	0,97	3,57	3,59	0,53	0,59
0,97	0,98	3,59	3,58	0,60	0,56
0,98	0,98	3,58	3,59	0,56	0,58
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,98	0,98	3,58	3,58	0,57	0,56
U calc. = 8,5 ^{ns}		U calc. = 12 ^{ns}		U calc. = 11,5 ^{ns}	
p U = 0,242		p U = 0,500		p U = 0,460	

^{ns} não significativa

4.2.3.3. Coração

Os diâmetros menor e médio dos núcleos das fibras musculares cardíacas mostraram-se diminuídos nos fetos provenientes de mães infectadas (3,74 μ m e 5,32 μ m respectivamente) quando comparados aos fetos controles (4,23 μ m e 6,04 μ m), sendo tais diferenças estatisticamente significantes (Tabela 19, $p < 0,05$ e $p < 0,01$).

O volume, área, perímetro e relação V/A mostraram-se menores nos fetos do grupo infectado (82,87 μ m³; 22,59 μ m²; 18,69 μ m e 3,54, respectivamente). A análise estatística mostrou diferenças altamente significantes para $\alpha = 0,01$ (Tabela 20).

O coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Tabela 21).

Tabela 19. Valores médios dos diâmetros maior, menor e médio (μ m) e relação D/d dos núcleos das fibras musculares cardíacas dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Diâmetro maior		Diâmetro menor		Diâmetro médio		Relação D/d	
C	I	C	I	C	I	C	I
8,08	6,72	4,72	3,97	6,15	5,13	1,75	1,72
9,42	8,57	3,83	3,17	5,98	5,16	2,52	2,79
8,85	8,12	4,15	3,93	6,04	5,63	2,17	2,10
8,10	8,71	4,34	3,70	5,90	5,62	1,92	2,45
9,28	6,55	4,12	3,94	6,15	5,04	2,31	1,72
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
8,75	7,73	4,23	3,74	6,04	5,32	2,13	2,16
U calc. = 6 ^{ns}		U calc. = 3*		U calc. = 0**		U calc. = 11 ^{ns}	
p U = 0,111		p U = 0,028		p U = 0,004		p U = 0,421	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,05$

** Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

^{ns} não significativa

Tabela 20. Valores médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação V/A dos núcleos das fibras musculares cardíacas dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	I	C	I	C	I	C	I
127,23	74,76	30,14	21,06	20,50	17,13	4,10	3,42
117,86	75,28	28,56	21,23	21,83	19,56	3,99	3,44
119,01	96,45	28,94	25,15	21,15	19,55	4,02	3,75
109,95	97,39	27,54	25,21	20,05	20,41	3,93	3,75
126,69	70,48	30,08	20,29	21,92	16,80	4,10	3,36
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
120,15	82,87	29,05	22,59	21,09	18,69	4,03	3,54
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 1*		U calc. = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,008		p U = 0,004	

* Estatisticamente significante para $\alpha = 0,01$

Tabela 21. Valores médios do coeficiente de forma, índice de contorno e excentricidade dos núcleos das fibras musculares cardíacas dos fetos do grupo controle (C) e dos fetos nascidos de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Coeficiente de forma		Índice de contorno		Excentricidade	
C	I	C	I	C	I
0,89	0,89	3,77	3,76	0,80	0,76
0,75	0,71	4,13	4,26	0,91	0,91
0,81	0,82	3,95	3,92	0,87	0,86
0,86	0,76	3,84	4,10	0,83	0,89
0,78	0,89	4,03	3,76	0,88	0,75
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,82	0,81	3,94	3,96	0,86	0,83
U calc. = 12 ^{ns}		U calc. = 11 ^{ns}		U calc. = 10,5 ^{ns}	
p U = 0,500		p U = 0,421		p U = 0,383	

^{ns} não significante

4.3. RESULTADOS ESTEREOLÓGICOS

4.3.1. Placenta

Volumes relativos da placenta

Os volumes relativos da placenta ocupados pela decídua basal, camada esponjosa e camada labiríntica nos grupos estudados estão apresentados na Tabela 22. A análise estatística, mediante o teste de Mann-Whitney, permitiu observar diferença significativa no volume relativo da camada esponjosa, sendo menor no grupo infectado pela cepa RAL de *T.cruzi* (26,69%) em relação ao grupo controle (29,64%).

Tabela 22. Volumes relativos (%) ocupados pela decídua e camadas esponjosa e labiríntica das placentas dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Decídua		Esponjosa		Labiríntica	
C	I	C	I	C	I
9,16	8,02	26,90	23,43	63,94	68,55
8,63	7,71	29,66	26,76	61,71	65,57
8,17	6,71	29,21	25,72	62,64	67,57
8,83	9,14	29,82	29,81	61,35	61,05
10,43	9,63	32,63	27,71	56,94	62,66
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
9,04	8,24	29,64	26,69	61,32	65,08
U calc. = 7 ^{ns}		U calc. = 4*		U calc. = 6 ^{ns}	
p U = 0,155		p U = 0,048		p U = 0,111	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,05$

^{ns} não significante

Volumes absolutos da placenta

Os volumes absolutos ocupados pela decídua basal e pelas camadas esponjosa e labiríntica nas placentas dos animais dos grupos estudados, estão contidos na Tabela 23. As três regiões placentárias apresentaram diferenças estatisticamente significantes, após o teste de Mann-Whitney, sendo menor no grupo infectado pela cepa RAL de *T.cruzi* em relação ao grupo controle.

Tabela 23. Volumes absolutos (em mm³) das regiões decídua, esponjosa e labiríntica das placentas dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Decídua		Esponjosa		Labiríntica	
C	I	C	I	C	I
11,08	6,50	32,55	18,98	77,37	55,53
12,32	4,14	42,35	14,37	88,12	35,21
10,55	3,17	37,74	12,17	80,93	31,96
10,44	6,41	35,28	20,90	72,58	42,80
13,57	7,80	42,45	22,45	74,08	50,75
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
11,59	5,60	38,07	17,77	78,62	43,25
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

Volumes relativos nuclear e citoplasmático das células gigantes

Os volumes relativos dos núcleos e citoplasma das células gigantes estão apresentados na Tabela 24. Após sua análise, pode-se verificar não haver diferença estatística entre os grupos estudados.

Tabela 24. Valores médios do volume relativo (%) dos núcleos e citoplasma das células gigantes das placentas dos animais dos grupos controle (C) e infectado pela cepa RAL de *T. cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Volume relativo				
Núcleo		Citoplasma		
C	I	C	I	
18,82	16,97	81,18	83,03	
15,12	23,50	84,88	76,50	
14,52	13,70	85,48	86,30	
15,98	14,69	84,02	85,31	
17,52	15,31	82,48	84,69	
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	
16,39	16,83	83,61	83,17	
U calc. = 11 ^{ns}		U calc. = 11 ^{ns}		
p U = 0,421		p U = 0,421		

^{ns} não significante

Volume relativo das células gigantes

O volume relativo celular mostrou valor menor no animal infectado (0,49) em função do seu controle (1,78). O teste de Mann-Whitney mostrou significância nesta diferença (Tabela 25 - $p < 0,01$).

Relação núcleo-citoplasma

Esta relação não mostrou ser estatisticamente diferente no confronto efetuado (Tabela 25).

Tabela 25. Valores médios do volume relativo (%), volume absoluto (mm³) e da relação núcleo/citoplasma das células gigantes das placentas dos animais dos grupos controle (C) e infectado pela cepa RAL de *T.cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Volume relativo		Volume absoluto		Relação N/C	
C	I	C	I	C	I
2,0	0,55	2,42	0,45	0,232	0,204
1,8	0,65	2,57	0,35	0,178	0,307
1,4	0,45	1,81	0,21	0,170	0,159
2,3	0,40	2,72	0,28	0,190	0,172
1,4	0,40	1,82	0,32	0,212	0,181
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
1,78	0,49	2,27	0,32	0,1964	0,2046
U calc. = 0*		U calc. = 0*		U calc. = 11 ^{ns}	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,421	

* Estatisticamente significante para $\alpha = 0,01$

^{ns} não significante

Volumes celular e citoplasmático

Os volumes celular e citoplasmático das células gigantes das placentas dos animais infectados eram menores (9063,96 e 7596,30 μm^3 respectivamente) que os dos seus controles (21725,89 e 18213,70 μm^3) e tais diferenças eram significantes para $\alpha = 0,01$ (Tabela 26).

Tabela 26. Valores médios dos volumes celular e citoplasmático (μm^3) das células gigantes das placentas de animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Volume celular		Volume citoplasmático	
C	I	C	I
20633,85	10061,82	16778,11	8365,82
24323,57	6298,46	20671,75	4828,34
24386,45	11599,69	20870,21	10020,96
19554,57	7526,03	16450,62	6427,83
19731,03	9833,78	16297,81	8338,57
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
21725,89	9063,96	18213,70	7596,30
U calc. = 0*		U calc. = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004	

* Estatisticamente significante para $\alpha = 0,01$

Densidade numérica

O número de células gigantes por mm^3 de tecido foi igual a 580,96 células no feto infectado e 833,83 células nos controles. Esta diferença foi significativa para $\alpha = 0,05$ (Tabela 27).

Número de células gigantes por placenta

O número de células gigantes por placenta era menor no feto infectado (37649,85), quando comparado ao do seu controle (105717,20) e tal diferença foi significativa para $\alpha = 0,01$ (Tabela 27).

Tabela 27. Valores médios da densidade numérica ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$) das células gigantes, e do número de células gigantes por placenta dos animais controles (C) e infectados pela cepa RAL de *T.cruzi* (I). Teste de Mann-Whitney.

Densidade numérica		Nº células gigantes por placenta	
C	I	C	I
969,28	546,62	117283,01	44276,28
740,02	1032,00	105675,28	55418,31
574,09	387,94	74172,34	18349,63
1176,20	531,49	139143,94	37257,36
709,54	406,76	92311,45	32947,66
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
833,83	580,96	105717,20	37649,85
U calc. = 4*		U calc. = 0**	
p U = 0,048		p U = 0,004	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,05$

** Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

4.3.2. Órgãos fetais

4.3.2.1. Fígado

Densidade de volume

Após análise da Tabela 28, observou-se valores maiores para hepatócitos e menores para sinusóide nos fetos do grupo inoculado. Os confrontos efetuados mostraram que as diferenças eram estatisticamente significantes ($p < 0,01$). Os valores para megacariócito eram semelhantes nos dois grupos estudados.

Tabela 28. Valores médios da densidade de volume de hepatócitos, sinusóides e megacariócitos do fígado dos fetos controles (C) e inoculados (I) com a cepa RAL de *T.cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Hepatócito		Sinusóide		Megacariócito	
C	I	C	I	C	I
0,3490	0,5450	0,6490	0,4550	0,0020	0,0000
0,4090	0,4520	0,5910	0,5480	0,0000	0,0000
0,3530	0,4535	0,6455	0,5465	0,0015	0,0000
0,3585	0,4025	0,6385	0,5955	0,0030	0,0020
0,3380	0,4230	0,6620	0,5760	0,0000	0,0010
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,3615	0,4552	0,6372	0,5442	0,0013	0,0006
U calc. = 1*		U calc. = 1*		U calc. = 8,5 ^{ns}	
p U = 0,008		p U = 0,008		p U = 0,242	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

^{ns} não significativa

4.3.2.2. Pâncreas

Volume relativo nuclear e citoplasmático

Analisando-se a Tabela 29, observa-se que os valores para o núcleo e citoplasma das células acinares do pâncreas dos fetos dos dois grupos estudados, eram semelhantes entre si.

Relação núcleo/citoplasma

Também para a relação núcleo/citoplasma os valores eram semelhantes nos dois grupos estudados (Tabela 29).

Tabela 29. Valores médios do volume relativo nuclear, volume relativo de citoplasma e relação núcleo/citoplasma das células acinares do pâncreas dos fetos do grupo controle (C) e do grupo inoculado (I) com a cepa RAL de *T.cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Vol. rel. nuclear		Vol. rel. citoplasma		Relação N/C	
C	I	C	I	C	I
0,04	0,05	0,96	0,95	0,0377	0,0472
0,05	0,05	0,95	0,95	0,0527	0,0541
0,06	0,05	0,94	0,95	0,0588	0,0474
0,05	0,03	0,95	0,97	0,0520	0,0342
0,04	0,05	0,96	0,95	0,0435	0,0507
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,048	0,046	0,952	0,954	0,0489	0,0467
U calc. = 12 ^{ns}		U calc. = 12 ^{ns}		U calc. = 10 ^{ns}	
p U = 0,500		p U = 0,500		p U = 0,345	

^{ns} não significante

Volume citoplasmático

Da mesma maneira, os valores para o volume citoplasmático das células acinares eram semelhantes nos fetos dos dois grupos estudados (Tabela 30).

Volume celular

Os valores para o volume celular dos ácinos pancreáticos eram semelhantes em ambos grupos de fetos estudados (Tabela 30).

Densidade numérica

Mais uma vez, a densidade numérica pancreática era semelhante nos dois grupos de fetos estudados (Tabela 30).

Tabela 30. Valores médios do volume de citoplasma (μm^3), volume celular (μm^3) e densidade numérica ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$) das células acinares do pâncreas dos fetos do grupo controle (C) e do grupo inoculado (I) com a cepa rAL de *T. cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Volume citopl.		Volume celular		Densidade numérica	
C	I	C	I	C	I
1726,17	1235,67	1791,23	1293,94	558275,1	772830,7
1365,00	1152,96	1436,94	1215,32	695925,4	822830,6
1047,31	1191,94	1108,91	1248,41	901790,2	801018,4
1259,10	1770,24	1324,55	1830,72	754973,4	546232,1
1645,30	1177,94	1716,82	1237,67	582472,9	807968,2
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
1408,58	1305,75	1475,69	1365,21	698687,4	750176,0
U calc. = 9 ^{ns}		U calc. = 9 ^{ns}		U calc. = 9 ^{ns}	
p U = 0,274		p U = 0,274		p U = 0,274	

^{ns} não significante

4.3.2.3. Coração

Volume relativo nuclear e citoplasmático

Os valores dos volumes relativos para núcleo e citoplasma da fibra cardíaca, para própria fibra e para tecido conjuntivo, não mostraram diferenças em ambos grupos de fetos estudados (Tabelas 31 e 32).

Relação núcleo/citoplasma

Os valores para esta relação eram semelhantes nos fetos de ambos grupos estudados (Tabela 31).

Tabela 31. Valores médios do volume relativo nuclear, volume relativo de citoplasma e relação núcleo/citoplasma das fibras musculares do coração dos fetos do grupo controle (C) e do grupo inoculado (I) com a cepa RAL de *T. cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Vol. rel. nuclear		Vol. rel. citoplasma		Relação N/C	
C	I	C	I	C	I
0,07	0,05	0,93	0,95	0,0737	0,0567
0,06	0,06	0,94	0,94	0,0645	0,0587
0,08	0,06	0,92	0,94	0,0831	0,0691
0,07	0,07	0,93	0,93	0,0799	0,0777
0,06	0,07	0,94	0,93	0,0611	0,0696
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,07	0,06	0,93	0,94	0,0725	0,0664
U calc. = 8 ^{ns}		U calc. = 8 ^{ns}		U calc. = 7 ^{ns}	
p U = 0,210		p U = 0,210		p U = 0,155	

^{ns} não significante

Tabela 32. Valores médios do volume relativo de fibra muscular cardíaca e de conjuntivo dos fetos do grupo controle (C) e do grupo inoculado (I) com a cepa RAL de *T.cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Volume relativo de fibra		Volume relativo de conjuntivo	
C	I	C	I
0,805	0,859	0,195	0,141
0,785	0,743	0,215	0,257
0,787	0,740	0,213	0,260
0,832	0,821	0,168	0,179
0,797	0,855	0,203	0,145
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0,801	0,804	0,199	0,196
U calc. = 11 ^{ns}		U calc. = 11 ^{ns}	
p U = 0,421		p U = 0,421	

^{ns} não significante

Volume citoplasmático

O volume citoplasmático da fibra cardíaca era maior ($1623,62\mu\text{m}^3$) no feto controle, quando comparado ao do feto do grupo inoculado com a cepa RAL de *T.cruzi* ($1196,60\mu\text{m}^3$). Esta diferença foi significativa para $\alpha = 0,01$ (Tabela 33).

Volume celular

Conseqüentemente, também o volume celular era maior ($1739,31\mu\text{m}^3$) no feto controle que no inoculado ($1275,81\mu\text{m}^3$) e tal diferença foi significativa para $\alpha = 0,01$ (Tabela 33).

Densidade numérica

A densidade numérica das fibras mostrou-se aumentada ($793678,6/\text{mm}^3$) nos corações dos fetos inoculados, quando comparada à das do grupo controle ($585957,0/\text{mm}^3$), e tal diferença era significativa para $\alpha = 0,01$ (Tabela 33).

Tabela 33. Valores médios do volume de citoplasma (μm^3), volume celular (μm^3) e densidade numérica ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$) das células musculares cardíacas dos fetos do grupo controle (C) e do grupo inoculado (I) com a cepa RAL de *T.cruzi*. Teste de Mann-Whitney.

Volume citopl.		Volume celular		Densidade numérica	
C	I	C	I	C	I
1651,90	1246,25	1773,69	1316,94	563794,9	759337,4
1735,95	1226,05	1847,92	1297,99	541150,3	770421,1
1389,22	1351,65	1504,59	1445,09	664633,2	691998,8
1346,70	1196,03	1454,24	1288,97	687645,2	775816,0
1994,34	963,03	2116,13	1030,06	472561,6	970819,7
\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
1623,62	1196,60	1739,31	1275,81	585957,0	793678,6
U calc. = 1*		U calc. = 0*		U calc. = 0*	
p U = 0,008		p U = 0,004		p U = 0,004	

* Estatisticamente significativa para $\alpha = 0,01$

^{ns} não significativa

5. DISCUSSÃO

CHAGAS (1911, 1916, 1922, 1930, 1934) já evidenciara a responsabilidade da infecção congênita por *T.cruzi* na deficiência físico-mental. A partir daí, uma série de pesquisas procuraram comprovar a transmissão transplacentária nas fases aguda e crônica da infecção materna. Em 1914, MAYER & ROCHA-LIMA observaram pela primeira vez ninhos de amastigotas na placenta de camundongos, não encontrando parasitas nos fetos. Posteriormente em 1921, NATTAN-LARRIER observou a transmissão congênita em cobaias, relatando incidência elevada de abortamentos. Em 1928, o mesmo autor verificou a presença de ninhos de amastigotas, ocasionando lesões placentárias em cobaias. A partir dos resultados, o autor sugeriu que as lesões placentárias permitiriam algum tipo de comunicação entre os sangues materno e fetal.

No ser humano, a infecção chagásica congênita está associada a abortamento, prematuridade, baixo peso ao nascer e natimortalidade, na maioria dos casos. Tal fato não foi ainda devidamente estudado na infecção experimental (HOWARD & RUBIO, 1968; BITTENCOURT *et al.*, 1972, 1975; CARLIER *et al.*, 1987). Por outro lado, diversos trabalhos têm demonstrado experimentalmente que cepas distintas se comportam de modo diverso quanto à severidade da doença e ao padrão de transmissibilidade intra-uterina (ANDRADE *et al.*, 1973; ANDRADE, 1982; NUNES *et al.*, 1990).

As primeiras alterações dos fetos, observadas neste trabalho, foram o peso corporal e o comprimento menores naqueles fetos cujas mães foram infectadas com a cepa RAL de *T.cruzi* (0,72g e 1,86cm, respectivamente) em relação aos seus controles (1,65g e 2,68cm). Em trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, MENEGUETTE (1997) e MENEGUETTE *et al.* (1999 a, b, c) também observaram fetos de menor peso em animais inoculados com a cepa RC e

Colombiana (0,91g e 0,80g, respectivamente). Entretanto, os fetos provenientes de mães infectadas com as cepas Y e Bolívia, apresentaram peso corporal menor que as cepas anteriores (0,70g para Y e 0,68g para Bolívia). O comprimento dos fetos, quando comparado ao comprimento fetal dos animais inoculados com as cepas estudadas por MENEGUETTE (1997), também mostrou valor diminuído.

No ser humano, a redução do peso fetal está comumente associada à infecção chagásica congênita (HOWARD & RUBIO, 1968; BITTENCOURT & BARBOSA, 1969, 1972; BITTENCOURT *et al.*, 1972, 1975; FÁVERO & CARVALHEIRO, 1974; ARAÚJO *et al.*, 1983). Embora os recém nascidos de mães chagásicas sejam freqüentemente prematuros ou pequenos para a idade gestacional, existem relatos de diagnóstico da doença congênita em recém-nascidos a termo com peso normal ao nascer (SCHILLING *et al.*, 1961; SZARFMAN *et al.*, 1968; LAUTREC *et al.*, 1975; MUÑOZ *et al.*, 1982). Por tal razão, os autores discutem se a infecção chagásica materna, por si só, mesmo sem ocorrência de transmissão congênita da doença, não poderia ser a causa do baixo peso ao nascer, bem como da prematuridade, abortamento e natimortalidade (OLIVEIRA *et al.*, 1966; ALONSO *et al.*, 1967; CHAPADEIRO *et al.*, 1967; TERUEL & NOGUEIRA, 1970). Entretanto, há autores que mostram a existência de relação entre infecção chagásica materna, prematuridade e perdas fetais (PEDREIRA DE FREITAS, 1965; AMATO NETO *et al.*, 1968; MATHESON *et al.*, 1983; MILANESI *et al.*, 1979).

Em relação ao índice pôndero-estatural, observou-se valores significativamente maiores nos animais infectados com a cepa RAL de *T.cruzi*. Este dado demonstra que o retardo do crescimento intra-uterino, refletido pela diminuição dos pesos e comprimentos dos fetos do grupo inoculado, foi do tipo assimétrico, evidenciando um maior comprometimento do comprimento que do peso, e que a ação seria mais evidente sobre as mitoses do que sobre a síntese protéica. Tal resultado difere dos observados por MENEGUETTE (1997), já que os fetos de animais inoculados com as cepas Colombiana, Y, Bolívia e RC de *T.cruzi* não mostraram

diferenças significantes entre eles e seus controles, evidenciando o crescimento intra-uterino do tipo simétrico.

No material deste estudo, a placenta apresentou diâmetro diminuído nos animais infectados com a cepa RAL de *T.cruzi*, sugerindo uma diminuição do fluxo sangüíneo. Sabe-se que placentas menores com fluxo sangüíneo diminuído, resultam em hipóxia e desnutrição fetal significante, podendo causar retardo no crescimento intrauterino, gerando fetos de menor comprimento e peso (EMMANOUILIDES *et al.*, 1972; BITTENCOURT, 1976). No entanto, MENEGUETTE (1997) utilizando as cepas Colombiana, Y, Bolívia e RC, não observou diferenças no peso e diâmetro das placentas, em comparação às do controle. Deste modo, as alterações vâsculo-placentárias provocadas pelo parasitismo, observadas neste trabalho, podem ter contribuído para as modificações observadas no peso e no comprimento dos fetos.

As infecções fetais por protozoários podem estar associadas ao retardo do crescimento intra-uterino em consequência das alterações placentárias relacionadas com anomalias circulatórias, provocadas por parada ou retardo da angiogênese ao nível dos vasos placentários fetais.

É fato estabelecido numa variedade de espécies animais, inclusive o camundongo, que a nutrição alterada pode ocasionar efeitos permanentes se ocorrer em períodos específicos durante o desenvolvimento (WINICK & NOBLE, 1966; OSOFSKY, 1975; STEPHENS, 1980; LECHNER *et al.*, 1986; SNOECK *et al.*, 1990; LUCAS, 1991). Em nosso material foi possível observar alterações variáveis no fígado, pâncreas e coração fetais, avaliadas histometricamente, muito semelhantes às verificadas em fetos de mães desnutridas (HOET & HANSON, 1999).

O comprimento do cordão umbilical seria um indicador confiável do movimento fetal. Deste modo, o comprimento do cordão umbilical é influenciado por, pelo menos, dois fatores: a incidência do movimento fetal e do espaço intra-uterino disponível (MILLER *et al.*, 1981; MOESSINGER *et al.*, 1982; MOESSINGER, 1983). Se houver diminuição do espaço intra-uterino ou se o movimento fetal for

bloqueado haverá uma diminuição no estiramento do cordão umbilical com conseqüente diminuição do comprimento do mesmo. Cordões umbilicais encurtados foram observados em humanos com defeitos estruturais dos membros, que limitaram o movimento fetal (MILLER *et al.*, 1981). Injetando curare em roedores, durante a prenhez, com a finalidade de aumentar a pressão do saco amniótico e suprimir os movimentos fetais, MOESSINGER (1983) observou cordões umbilicais mais curtos. Esse encurtamento também foi observado em ratas que receberam dosagens altas de vitamina A durante a prenhez (CUNHA *et al.*, 1992), em ratas submetidas à restrição protéica (LEÃO *et al.*, 1992), à hipertermia (OLIVEIRA *et al.*, 1994), expostas à ação da ciclofosfamida (LIEDTKE *et al.*, 1995), de metais pesados como o metilmercúrio (LOPES *et al.*, 1992) e chumbo (KOMESU, 1995). BARRON *et al.* (1986) observaram movimentos fetais suprimidos e cordões umbilicais mais curtos naquelas ratas prenhas expostas à ação do álcool. Esses mesmos resultados obteve OLIVEIRA (1989), quando injetou etanol e aguardente de cana em ratas durante a prenhez. Nossos resultados também revelaram cordões umbilicais mais curtos naqueles animais infectados, o que poderia indicar limitação do movimento fetal.

Na doença de Chagas congênita, o cordão umbilical apresenta alterações inflamatórias decorrentes do parasitismo do epitélio amniótico, da geléia de Wharton e das paredes dos vasos umbilicais (MOYA *et al.*, 1979; ALMEIDA *et al.*, 1981; BITTENCOURT *et al.*, 1984; AZOGUE *et al.*, 1985). No trabalho de MENEGUETTE (1997) ficou evidente que as diversas cepas de *T.cruzi* estudadas contribuíram também para a diminuição do comprimento dos cordões umbilicais destes animais.

A relação entre os pesos do feto e da placenta foi significativamente menor nos fetos dos animais inoculados com a cepa RAL de *T.cruzi*. Este fato já havia sido observado por MENEGUETTE (1997) ao utilizar as cepas Colombianas, Y, Bolívia e RC de *T.cruzi*. Segundo HOWARD (1962) geralmente a placenta chagásica, principalmente a de natimorto, mostra volume e peso aumentados, encontrando-se aumentada a relação entre o peso da placenta e o do feto humano.

A placenta dos murídeos é do tipo hemotricorial labiríntica, de acordo com a classificação baseada em estudos ultraestruturais (BJÖRKMAN, 1970). Mesmo com a presença de três camadas trofoblásticas, existe um relacionamento íntimo entre as circulações materna e fetal na porção vascular labiríntica da placenta. Nos camundongos a placenta apresenta as seguintes regiões: decídua, que é a parte materna; esponjosa, com vasos e células características (espongioblastos e células gigantes) de origem trofoblástica (MULNARD, 1967); e labiríntica, que ocupa a maior parte da placenta (aproximadamente dois terços). É nesta região que se estabelece uma relação mais íntima entre os sangues fetal e materno, permitindo a ocorrência de trocas materno-fetais. A presença de parasitas na porção vascular da placenta é sugestiva da infecção fetal.

Os fenômenos de escape relacionados ao *T.cruzi*, seus sítios de infecção, bem como o parasitismo e as lesões placentárias são ainda pouco compreendidos. OLEG (1942) e WERNER (1954) afirmaram que as infecções congênicas em animais se devem a alterações morfológicas da placenta, de modo a permitir a passagem de parasitas, normalmente incapazes de atravessá-la ativamente. Para tal, seria necessário a existência de uma solução de continuidade do córion para que os parasitas pudessem passar do sangue materno para o sangue fetal.

O comprometimento da placenta na infecção chagásica intra-uterina se dá em diferentes graus, podendo ser focal ou difuso. Sua gravidade parece ser proporcional à intensidade das lesões encontradas no feto humano (BITTENCOURT, 1976). No entanto, quando as lesões são focais, o aspecto macroscópico da placenta humana pode não apresentar alterações (MOYA *et al.*, 1979; BITTENCOURT, 1984). No presente trabalho as placentas eram menores nos animais infectados com a cepa RAL de *T.cruzi*.

A transmissão congênita experimental tem sido amplamente demonstrada em diferentes animais com infecção aguda: cobaias (MAYER & ROCHA-LIMA, 1914; NATTAN-LARRIER, 1921); coelhos (VILLELA, 1923); cães

(CAMPOS, 1932) e ratos (WERNER & KUNERT, 1958). A primeira referência sobre a infecção natural do camundongo *Mus musculus* se deve a PACKCHANIAN (1942).

Utilizando a microscopia eletrônica, TAFURI *et al.*, (1984) observaram na placenta chagásica humana intenso parasitismo em macrófagos no estroma vilositário, fibrose da parede vascular com proliferação de fibroblastos e colágeno, provocando, por vezes à oclusão do lúmen. FRETES & DE FABRO (1995), por sua vez, demonstraram através de microscopia óptica e eletrônica alterações estruturais e histoquímicas dos vasos sanguíneos das placentas chagásicas humanas de termo, assinalando diminuição e oclusão dos vasos coriônicos com hialinização de suas paredes. As alterações dos vasos coriônicos na placenta humana infectada poderiam explicar em parte o retardo de crescimento intra-uterino observado nos nascituros de mães chagásicas. Outros autores consideram que a presença do parasita no estroma das vilosidades da placenta humana é prova da transmissão transplacentária (BITTENCOURT, 1967; APT & DIAZ, 1965), porém estudos experimentais demonstraram que a infecção placentária pode não ser acompanhada de transmissão congênita detectável (ANDRADE, 1982).

No presente trabalho, a incidência e a intensidade do parasitismo placentário no envolvimento da região labiríntica da placenta foram constatadas. Houve envolvimento da parte materna (decídua) e fetal das placentas, bem como das células gigantes trofoblásticas e dos espongioblastos. As alterações placentárias relacionadas com anomalias circulatórias observadas permitem explicar o retardo de crescimento dos fetos do grupo inoculado com a cepa RAL de *T. cruzi*. Nos estudos realizados por MENEGUETTE (1997), foram observadas diferenças no parasitismo placentário na fase aguda da infecção dos camundongos. Os grupos inoculados com as cepas Bolívia e RC apresentaram maior tropismo para células da placenta dos camundongos, inclusive parasitando células gigantes. Os grupos inoculados com as cepas Colombiana e Y apresentaram parasitismo menor e semelhante entre si, enquanto, com as cepas Bolívia e RC o parasitismo foi elevado e semelhante entre si, exceto pelo tamanho dos ninhos de parasitas.

No estudo da infecção experimental em camundongos fêmeas, infectados pela cepa RAL de *T. cruzi* observou-se que os animais apresentaram áreas de degeneração e necrose escassas, com calcificação distrófica exígua na camada decídua. O processo inflamatório produzido pela cepa RAL era constituído de plasmócitos e linfócitos, revelando comprometimento da decídua. MENEGUETTE (1997), observou lesões tissulares diferentes para os cinco grupos experimentais, como degeneração, necrose, calcificação e edema; sua distribuição, intensidade e tipo de infiltrado inflamatório estava intimamente relacionado a cada cepa. Áreas de degeneração, necrose e calcificação foram observadas na camada decídua das placentas de todos os grupos infectados. Porém no grupo inoculado com a cepa RC observou-se comprometimento, inclusive, da camada esponjosa. O processo inflamatório, de uma maneira geral, revelou que a decídua estava comprometida pelas cepas Colombiana, Y, Bolívia e RC. O grupo inoculado com a cepa Colombiana mostrou menor parasitismo, porém com processo degenerativo. A cepa RC apresentava maior infiltração, com comprometimento, inclusive, da camada esponjosa. As demais cepas causaram infiltrado inflamatório, constituído por linfócitos e plasmócitos. A cepa Y, da mesma forma que o grupo de controle, apresentou neutrófilos.

Para ANDRADE & ANDRADE (1979) a virulência de uma cepa resulta da maior ou menor capacidade de multiplicação do parasita, que é própria para uma determinada cepa, mas que pode variar dentro de certos limites. A patogenicidade está ligada à capacidade de provocar lesões tissulares, sendo uma característica constante, independente do inoculo. Estas duas condições em conjunto, seriam os fatores ligados ao parasita que determinam o curso da infecção experimental. A virulência pode ser atenuada ou exacerbada, dependendo do estado imunológico do hospedeiro, da idade, sexo, estresse, entre outros fatores, como o inóculo. Para um animal experimental, a patogenicidade de uma cepa está diretamente relacionada com a exaltação de sua virulência, que se traduz por um maior parasitismo tissular e maior grau de lesões. Por vezes, entretanto, as cepas, mesmo se multiplicando lenta e

progressivamente, podem causar lesões extensas que independem neste caso do inóculo (PHILIPS, 1960).

BRENER (1969) já havia relatado que as formas delgadas, ao contrário das formas largas, tinham maior capacidade de penetração nos tecidos, além de apresentarem maior suscetibilidade aos anticorpos. No presente estudo, a cepa RAL, que apresenta formas tripomastigotas sangüícolas com morfologia predominantemente intermediária e larga, mostrou grande capacidade de penetração nos tecidos placentários, com parasitismo intenso, atingindo as três camadas placentárias.

MENEGUETTE (1997) observou parasitismo placentário mais intenso nos grupos infectados com as cepas Bolívia e RC, atingindo maior volume da placenta. Com a cepa Colombiana ocorreu discreto parasitismo, com pequenos ninhos de amastigotas nas células endoteliais da decídua basal. As demais camadas não evidenciaram parasitismo e/ou processo inflamatório. As placentas do grupo inoculado com a cepa Y mostraram escasso parasitismo, comprometendo as células endoteliais da decídua. O grupo infectado com a cepa Bolívia mostrou parasitismo envolvendo as três regiões placentárias, sendo intenso nas células endoteliais da decídua e nas células trofoblásticas gigantes, com grandes ninhos. Na região esponjosa, as placentas mostraram parasitismo constituído por pequenos ninhos, enquanto que a região labiríntica apresentou células endoteliais com grandes ninhos de amastigotas. As placentas do grupo infectado com a cepa RC exibiram parasitismo comprometendo as três camadas, inclusive as células trofoblásticas gigantes. Embora intenso, era constituído na sua quase totalidade por ninhos pequenos (< 100 amastigotas).

ANDRADE (1982), estudando a influência das cepas na infecção placentária de camundongos, demonstrou que estas podem ser um fator importante na transmissão congênita da doença de Chagas. ANDRADE & ANDRADE (1979), no estudo da patologia da infecção experimental, observaram diferenças acentuadas nas lesões tissulares, sua distribuição, intensidade e tipo de infiltrado inflamatório em

animais infectados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Segundo esses autores, embora seja difícil fazer uma correlação nítida entre os resultados experimentais e a patologia humana, é possível que as diferenças dependentes do fator cepa possam influenciar nas manifestações da doença, não só no animal como no homem.

As cepas de *Trypanosoma cruzi* são populações complexas que diferem nas suas características morfológicas, biológicas, genéticas, bem como no comportamento da infecção no hospedeiro vertebrado. As cepas apresentam características intrínsecas como por exemplo, a composição antigênica, suscetibilidade à quimioterapia, padrão isoenzimático e perfil genômico de kDNA (ANDRADE, 1999). Os estudos da relação parasita-hospedeiro mostram diferenças na determinação das lesões teciduais relacionadas ao tropismo, virulência e patogenicidade das cepas, como observado no presente trabalho e no de MENEGUETTE (1997).

Neste trabalho, foi possível observar áreas de edema nas três camadas placentárias nos animais inoculados. MENEGUETTE (1997) também observou presença de edema nas placentas de todos os grupos inoculados com *Trypanosoma cruzi*, apresentando, no entanto, distribuição e intensidade variáveis de acordo com a cepa utilizada. Assim, a sua intensidade foi maior nas placentas inoculadas com as cepas Colombiana e Y, e menor nas inoculadas com as cepas Bolívia e RC. As cepas Colombiana e Y provocaram edema intenso inter e intracelular nas três regiões da placenta.

As áreas de degeneração, necrose e calcificação mostram variações entre os diferentes grupos experimentais, como observado por MENEGUETTE (1997), sendo as placentas do grupo inoculado com a cepa RC as mais prejudicadas. As placentas do grupo inoculado com a cepa Colombiana mostraram áreas escassas e pequenas de degeneração e necrose com calcificação distrófica, localizadas na camada esponjosa, no limite com a decídua. As placentas dos grupos inoculados com as cepas Y e Bolívia mostraram fenômenos degenerativos e necrose, com áreas de calcificação

distrófica, na decídua. As do grupo inoculado com a cepa RC, exibiram áreas de degeneração e necrose na decídua e na região esponjosa.

As células gigantes das placentas dos animais infectados pela cepa RAL mostraram pouca degeneração. Já MENEGUETTE (1997), observou alterações variáveis das células gigantes, de acordo com a cepa inoculada. Assim, as cepas Colombiana e RC causaram franca degeneração das células, enquanto que a cepa Bolívia provocou pouca degeneração e a cepa Y mostrou células gigantes parcialmente preservadas.

Os resultados estereológicos serão discutidos conjuntamente entre a cepa RAL (presente trabalho) e as cepas Colombiana, Y, Bolívia e RC (MENEGUETTE, 1997). Ambos os trabalhos demonstraram a existência de diferenças significativas dos volumes relativos ocupados pelas diversas regiões da placenta nos grupos experimentais. Os volumes relativos da decídua basal nas placentas dos grupos inoculados com as cepas Colombiana e Y de *T.cruzi* foram significativamente maiores que nas placentas dos animais do grupo controle e dos animais inoculados com as cepas RAL, Bolívia e RC. O edema presente nas placentas dos animais inoculados pode ser responsável, ao menos em parte, pelo aumento do volume relativo da decídua. Interferências no processo de decidualização impedem que ocorra um desenvolvimento completo da circulação placentária, refletindo-se em menor desenvolvimento fetal intra-uterino. Os volumes relativos ocupados pela região esponjosa nas placentas dos grupos inoculados com as cepas RAL, Bolívia e RC de *T.cruzi* foram significativamente menores que nos animais do grupo controle e nos inoculados com as cepas Colombiana e Y. Na região labiríntica, entretanto, os volumes relativos de placenta foram significativamente maiores nos grupos inoculados com as cepas Bolívia e RC e menores no grupo inoculado com a cepa Y, quando confrontados com o grupo controle.

Fica evidente que o comportamento das placentas dos grupos inoculados com as cepas RAL, Bolívia e RC foi semelhante, bem como o das cepas Colombiana e Y, no que se refere aos volumes relativos das três regiões placentárias.

Pode-se observar a existência de uma redistribuição dos volumes relativos entre as diferentes regiões da placenta dos animais inoculados com relação aos controles. Assim, nos grupos inoculados com as cepas Colombiana e Y ocorreu um aumento do volume relativo da decídua em detrimento dos volumes relativos das regiões esponjosa e labiríntica, enquanto que nos grupos inoculados com as cepas RAL, Bolívia e RC ocorreu uma diminuição do volume relativo da região esponjosa, com aumento da região labiríntica.

Na cepa RAL, os volumes absolutos ocupados pelas três regiões placentárias apresentaram diferenças significantes quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, os volumes absolutos ocupados pelas regiões da placenta, nos grupos infectados pelas cepas Colombiana, Y, Bolívia e RC só apresentaram diferenças significativas na camada esponjosa. Os volumes absolutos da região esponjosa das placentas destes grupos foram significativamente menores que o correspondente às placentas do grupo controle, provavelmente pela alteração vascular ocasionada pelo parasitismo das células endoteliais nos grupos inoculados, levando a lise celular (MENEGUETTE, 1997).

A análise das mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento da placenta de camundongo, entre o 6º e o 18º dia de prenhez, mostra que o volume placentário aumenta constantemente, porém, o número total de células da placenta atinge um platô no 14º dia (IGUCHI *et al.*, 1993). As células deciduais, que predominam na placenta no 6º dia, aumentam em número até o 10º dia, mas diminuem no 14º, enquanto que as células trofoblásticas aumentam linearmente até o 14º dia (IGUCHI *et al.*, 1993). Estes dados são de importância, uma vez que o inóculo, no presente estudo e no de MENEGUETTE (1997), analisados em conjunto, foi realizado, segundo a cepa, entre o 4º e 11º dia da prenhez, permitindo explicar, em alguns casos, a diferença de comportamento das diversas regiões placentárias.

A cariometria das células trofoblásticas gigantes, estudada conjuntamente entre a cepa RAL e as estudadas por MENEGUETTE (1997), permitiu observar a existência de uma diminuição significativa do tamanho nuclear nos

grupos inoculados (RAL, Colombiana, Y, Bolívia e RC) em relação ao grupo controle. Os grupos mais afetados pela redução do tamanho dos núcleos das células gigantes foram os inoculados com as cepas RAL, Bolívia e RC.

No presente trabalho foi observado que os parâmetros cariométricos que permitem avaliar a forma nuclear mostraram que os núcleos das células gigantes das placentas nos animais inoculados eram mais alongados que os núcleos pertencentes às placentas do grupo controle. Tal fato também foi observado no trabalho de MENEGUETTE (1997).

A cariometria permitiu demonstrar que os núcleos das células do espongiotrofoblasto, do grupo infectado pela cepa RAL de *T.cruzi*, foram significativamente menores que os controles, comportando-se de modo semelhante às cepas Bolívia e Y. Já nas cepas Colombiana e RC os núcleos foram significativamente maiores. Na cepa RAL, os núcleos dos espongioblastos não apresentaram alteração de forma.

O estudo das alterações nucleares ocorridas nas células parasitadas por *T.cruzi* oferece vasto campo para investigação, apesar das pesquisas desta natureza serem realizadas na veia umbilical por OLIVEIRA *et al.* (1981), assim como da interação do tropismo, capacidade de sobrevivência e reprodução na célula hospedeira, desenvolvidos *in vitro* por ALCÂNTARA & BRENER (1978), DVORAK & SCHMUNIS (1972), DVORAK & HYDE (1973), LUBAN & DVORAK (1974), NOGUEIRA & COHN (1976) e DVORAK (1979).

O aumento do volume nuclear com cromatina grumosa, por vezes delicada na textura, hipercromática, núcleos lobulados de contornos irregulares com nucléolo evidente, principalmente nas células gigantes, sugere atividade de síntese acentuada (ARBUZONA *et al.*, 1968). O estudo citométrico das células trofoblásticas gigantes mostrou que as placentas do grupo inoculado com a cepa RAL foram mais afetadas, inclusive no que se refere ao volume celular. Deste modo, o volume relativo, o volume absoluto, a densidade numérica e o número total de células gigantes nas placentas deste grupo foram significativamente menores que no grupo controle.

A densidade numérica e o número total de células gigantes permitem agrupar o grupo inoculado com a cepa RAL e os grupos inoculados por MENEGUETTE (1997) em dois pares: cepas RAL-Bolívia-RC e Y-Colombiana, não havendo diferenças significativas entre os integrantes de cada par. O número total de células gigantes foi significativamente menor nas placentas dos animais inoculados com as cepas Colombiana e Y que nos grupos inoculados com as cepas RAL, Bolívia e RC e que no grupo controle. Por outro lado, a diferenciação endócrina das células trofoblásticas afeta a organização da placenta de ratas, particularmente na região labiríntica (ROBY & SOARES, 1993). Segundo SOARES *et al.* (1995), são de fundamental importância para o controle das células gigantes trofoblásticas, o processo de endo-reduplicação e a aquisição das atividades endócrinas.

As células gigantes nos roedores se diferenciam por endo-reduplicação, e têm por funções a secreção endócrina e a invasão da decídua materna. Estas células são fonte exclusiva dos lactogênios placentários-I (PL-I) e II (PL-II) e, na segunda metade da prenhez sintetizam, também, as proteínas similares à prolactina-A (PLP-A), à prolactina-C (PLP-C), uma variante desta última (PLP-Cv), a proteína relacionada à prolactina (d/tPRP) e uma variante do lactogênio placentário-I (PL-IV) (SOARES *et al.*, 1996). O PL-I, o PL-II e a PL-IV atuam estimulando a produção de progesterona pelas células lúteas do ovário (McLEOD *et al.*, 1989), porém, o feto é também alvo da ação destes hormônios. A PL-IV é primeiramente expressa nas células estromais do útero, no período de decidualização e continua até a metade da gestação, após a qual se expressa nas células trofoblásticas da zona juncional da placenta (CROZE *et al.*, 1990). A síntese e secreção do PL-I é parte de um programa endógeno de diferenciação trofoblástica (NIEDER & JENNES, 1990). O lactogênio placentário II (PL-II), na rata é produzido pelas células gigantes da zona juncional da placenta (limite entre a esponjosa e a decídua), a partir da metade da gestação. À medida que avança a prenhez, as células produtoras do PL-II localizam-se, também, na região labiríntica (CAMPBELL *et al.*, 1989). Na placenta de camundongo, a origem celular do lactogênio placentário-I (PL-I) e a transição de PL-I a PL-II durante a

prenhez foi demonstrada por FARIA *et al.* (1991). O PL-I foi localizado nas células gigantes trofoblásticas até a metade da gestação, a partir da qual começam a expressar o PL-II. A imuno-reatividade para o PL-I estava presente nas células gigantes do trofoblasto nos dias 9º e 10º da prenhez, porém não foi detectável nas células gigantes do trofoblasto no dia 11º. As células gigantes imuno-reativas produtoras de PL-II foram detectadas primeiramente no dia 10º da prenhez, continuando no dia 11º. A expressão de PL-I e PL-II mostra uma significativa transição funcional nas células gigantes trofoblásticas da placenta de rato ou de camundongo, em torno do 10º dia (FARIA *et al.*, 1990, 1991).

As alterações provocadas pela cepa RAL sobre as células trofoblásticas e a diferença de comportamento observado nas populações celulares das diversas regiões placentárias podem afetar o desenvolvimento intra-uterino, provavelmente por uma produção deficiente de hormônios, tais como o PL, que têm como uma de suas funções, atuar como hormônio de crescimento fetal.

Recentemente, outras duas proteínas não-clássicas, membros da família das prolactinas (PRL) placentárias, a proliferina (PLF) e a proteína relacionada à proliferina (PLPLF), foram descritas na placenta de camundongos (JACKSON *et al.*, 1994; LINZER, 1995). A ação destes hormônios se exerce sobre o desenvolvimento dos vasos sanguíneos: a proliferina é angiogênica e a proteína relacionada à proliferina é antiangiogênica (JACKSON *et al.*, 1994; GU *et al.*, 1996), participando assim do estabelecimento do ambiente útero-placentário requerido para uma gestação exitosa. GROSKOPF *et al.* (1997) demonstraram, recentemente, que o quimiotactismo das células endoteliais induzido pelo hormônio angiogênico placentário proliferina (PLF), é inibido pela ação da toxina pertussis. O mesmo mecanismo inibitório poderia ocorrer no caso da infecção por *T.cruzi*.

YAMAGUCHI *et al.* (1992, 1994) demonstraram que o PL-I, o PL-II e a PLF são expressos pela mesma população de células gigantes da placenta de camundongo, na metade da prenhez. Estes achados demonstram que a mesma célula trofoblástica gigante expressa os três hormônios simultaneamente.

ZYBINA *et al.* (1979, 1996) demonstraram que as células gigantes de rato ou camundongo, no 12º dia de gestação, têm ploidia 4c-8c (algumas 16c-32c) enquanto que no 13º - 14º dia, a ploidia é de 8c-16c (algumas 32c-64c). Este aumento da ploidia seria condição indispensável para a diferenciação trofoblástica, permitindo a invasão da decídua.

KEIGHREN & WEST (1993), usando a técnica de hibridização *in situ* confirmaram que núcleos poliplóides (principalmente tetraplóides) estavam presentes na decídua uterina e no trofoblasto placentário. Porém, não observaram poliploidia de maior ordem nas células gigantes do trofoblasto da placenta de camundongo, sugerindo que estas células seriam politénicas e não poliplóides. As células gigantes em determinado estágio de diferenciação se dividem em numerosos fragmentos nucleares formando células multinucleadas que rapidamente degeneram em fragmentos nucleares com ploidia entre 1 e 32c.

No presente estudo foi demonstrado que o volume nuclear das células gigantes do trofoblasto são significativamente menores nas placentas dos animais infectados com a cepa RAL de *T. cruzi*, o que estaria refletindo uma ploidia menor e, conseqüentemente, uma alteração da diferenciação celular, prejudicando a invasão da decídua. O mesmo observou MENEGUETTE (1997) nos animais inoculados com as cepas Colombiana, Y, Bolívia e RC de *T. cruzi*.

Desse modo, as alterações funcionais provocadas pelas diversas cepas de *T. cruzi* sobre as células trofoblásticas gigantes e sobre os espongioblastos, podem atuar diretamente sobre o crescimento fetal, mediante os PL, ou indiretamente, mediante uma invasão decidual deficiente, causada por uma vascularização útero-placentária ineficiente, diminuição da secreção de progesterona pelos corpos lúteos, e/ou por uma falha na diferenciação daquelas células.

Neste trabalho não foram observadas formas do parasita nos tecidos fetais estudados (fígado, pâncreas e coração).

A maioria dos estudos prévios realizados no camundongo (APT *et al.*, 1968a; DELGADO & SANTOS-BUCH, 1978; ANDRADE, 1982) e rato (APT *et al.*,

1968b) infectados indicaram ausência de infecção congênita, definida pela observação direta do parasita no sangue ou tecidos fetais (BITTENCOURT, 1976). A única observação aceitável de infecção congênita durante a fase crônica da infecção no camundongo foi a de CUNIO *et al.*, (1980), quando formas amastigotas foram encontradas nos tecidos fetais. A transmissão periparturiente de *T.cruzi* por ruptura das membranas amnióticas (BITTENCOURT *et al.*, 1981), como também a transmissão pós-natal pelo leite (MILES, 1972), sem infecção transplacentária direta, poderiam ter ocorrido para explicar as observações de CUNIO *et al.*, (1980). MECKERT *et al.*, (1980) afirmaram ter observado infecção congênita durante a infecção crônica no camundongo com base na presença de anticorpos IgM anti-*T.cruzi* no soro do recém nascido. Entretanto, tais anticorpos correspondem à síntese fetal em resposta aos antígenos circulantes advindos do sangue materno sem transmissão do parasita vivo, como já mostrado em outras infecções parasitárias (CARLIER *et al.*, 1987). Conseqüentemente durante a infecção crônica da camundonga prenha, a transmissão transplacentária do parasita ao feto, pode ser considerada um fenômeno raro, já que a placenta tem se mostrado como uma barreira efetiva contra a passagem de diversas cepas de *T.cruzi*, mesmo que elas sejam altamente patogênicas (DELGADO & SANTOS-BUCH, 1978; ANDRADE, 1982).

Concluindo, este trabalho indica retardo no crescimento intra-uterino na infecção experimental por *T.cruzi*, na ausência de infecção congênita.

6. CONCLUSÃO

O estudo da transmissão transplacentária em camundongos *Mus musculus*, infectados com a cepa RAL de *Trypanosoma cruzi*, permitiu concluir:

A) Nas placentas:

- 1) O peso, diâmetro e volume placentários dos animais infectados foram significativamente menores.
 - 2) Os fetos do grupo infectado apresentaram uma diminuição significativa no comprimento do cordão umbilical quando comparado aos do grupo controle.
 - 3) Foi observado intenso parasitismo em todas as camadas placentárias, com grandes ninhos de amastigotas nas regiões da decídua e labiríntica. As células gigantes mostraram-se parasitadas e com pouca degeneração.
 - 4) A forma nuclear dos espongiotrofoblastos do grupo infectado não foi afetada, porém o tamanho dos núcleos foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle.
 - 5) O tamanho dos núcleos das células gigantes mostrou-se significativamente menor no grupo infectado em relação ao controle, enquanto que a forma do núcleo mostrou um alongamento significativo no grupo inoculado.
 - 6) O volume relativo ocupado pela camada esponjosa das placentas dos animais infectados foi significativamente menor em relação ao grupo controle.
-

- 7) Os volumes absolutos das regiões decídua, esponjosa e labiríntica das placentas dos animais inoculados foram significativamente menores que os correspondentes às placentas do grupo controle.
- 8) O grupo infectado apresentou uma significativa redução no volume relativo das células gigantes em relação ao grupo controle.
- 9) Os volumes celular e citoplasmático das células gigantes das placentas dos animais do grupo infectado foram significativamente menores.
- 10) Houve uma drástica redução na densidade numérica das células gigantes das placentas dos animais infectados quando comparados aos animais controles.
- 11) O número total de células gigantes nas placentas dos animais infectados foi significativamente menor quando comparado ao do grupo controle.

B) Nos fetos:

- 1) Observou-se uma diminuição do peso corporal dos fetos provenientes de mães infectadas pela cepa RAL de *T.cruzi*.
 - 2) O comprimento dos fetos pertencentes ao grupo infectado foi significativamente menor que o dos fetos controle.
 - 3) O índice pômbero-estatural apresentou valor significativamente maior nos animais do grupo infectado.
-

-
- 4) A relação entre o comprimento do feto e o comprimento do cordão umbilical não apresentou diferença significativa entre o grupo inoculado e o grupo controle.
 - 5) A relação entre os pesos do feto e da placenta foi significativamente menor nos fetos dos animais inoculados.
 - 6) Houve redução significativa na relação peso do feto / comprimento do cordão umbilical nos animais do grupo infectado.
 - 7) O tamanho dos núcleos do músculo cardíaco mostrou-se significativamente diminuído nos fetos do grupo infectado.
 - 8) Observou-se significativa redução do tamanho nuclear das células pancreáticas dos fetos do grupo infectado, quando comparados aos fetos controles.
 - 9) Não ocorreu alteração significativa na forma dos núcleos das células hepáticas, pancreáticas e musculares cardíacas nos fetos de ambos os grupos estudados.
 - 10) A densidade de volume de hepatócitos foi maior nos fetos do grupo inoculado, enquanto que a densidade de sinusóide apresentou valor menor nos fetos do grupo inoculado.
 - 11) A densidade numérica das fibras musculares cardíacas mostrou-se aumentada nos corações dos fetos do grupo inoculado, quando comparada a grupo controle.
 - 12) Observou-se uma redução estatisticamente significativa nos volumes citoplasmático, nuclear e celular das células musculares cardíacas de fetos infectados em relação ao grupo controle.
 - 13) Não foi observada transmissão transplacentária.
-

7. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar as alterações morfológicas das placentas e dos fetos de camundongos *Mus musculus*, Swiss, infectados com a cepa RAL de *Trypanosoma cruzi*, durante a prenhez, através de métodos histopatológicos, morfométricos e estereológicos.

Fêmeas prenhas, pesando aproximadamente 30-35 gramas, foram inoculadas i.p. com 2×10^5 tripomastigotas sangüícolas da cepa RAL de *T.cruzi*, no 7º dia da prenhez e sacrificadas por inalação com éter etílico no 19º dia da prenhez. Os animais do grupo controle foram inoculados com solução fisiológica e mantidos nas mesmas condições ambientais dos infectados.

Foram determinados o peso e comprimento fetais, o peso e diâmetro placentários, bem como o comprimento do cordão umbilical dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais. Além do exame histopatológico do material foram estudadas a cariometria e a estereologia das placentas e tecidos fetais (pâncreas, fígado e coração). Também estudou-se cariometricamente as células gigantes e os espongiotrofoblastos.

Nos animais infectados, ocorreu uma queda no peso e diâmetro das placentas, bem como uma redução no tamanho e peso dos fetos, com diminuição do comprimento do cordão umbilical.

Histopatologicamente, os animais infectados apresentaram parasitismo nas camadas decídua, esponjosa e labiríntica das placentas, com escassa reação inflamatória na decídua. As células gigantes apresentaram ninhos de amastigotas e mostraram pouca degeneração. Nos órgãos fetais estudados (pâncreas, fígado e coração) não foram encontrados ninhos de parasita.

Os parâmetros nucleares das células gigantes mostraram-se significativamente diminuídos nos animais infectados quando comparados aos animais controles.

O estudo estereológico da placenta mostrou que a região esponjosa apresentou volume relativo e volume absoluto menor no grupo infectado, sendo a diferença estatisticamente significativa. Os volumes absolutos das regiões decídua e labiríntica das placentas dos animais infectados também apresentaram valores menores.

O volume relativo, celular e citoplasmático das células gigantes das placentas dos animais infectados mostrou valores significativamente menores quando comparados com os animais do grupo controle. A densidade numérica e o número de células gigantes por placenta também foi significativamente menor no grupo infectado.

Deste modo, as alterações funcionais provocadas por *Trypanosoma cruzi* sobre as células trofoblásticas gigantes e sobre os espongioblastos, podem atuar diretamente sobre o crescimento fetal, mediante uma perda de homeostasia da produção de lactogênio placentário, ou indiretamente mediante uma vascularização útero-placentária ineficiente, prejudicando desta maneira a nutrição fetal.

8. SUMMARY

Morphologic alterations of placentas and foetus of *Mus musculus* infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi* were investigated by histopathological, morphometrical and stereological methods.

On the 7th day of pregnancy, ten female swiss mice, weighing approximately 30-35gr were i.p. inoculated with 2×10^5 blood trypomastigotes of RAL strain. The animals were sacrificed with ethylic ether on the 19th day of pregnancy. Control group (non infected pregnant females) were i.p. inoculated with saline solution and kept in the same enviroment conditions of the infected counterparts.

In both experimental groups, weight and lenght of foetus, diameter and weight of placenta as well as umbilical cord lenght were assessed. Histopathology, cariometry and stereology of placentas and fetal tissues (liver, heart and pancreas) were performed. Cariometry of giant cells and spongyotrophoblasts were assessed too.

Infected animals showed reduction of fetal weight and lenght, as well as the diameter and weight of placentas, with enshortened umbilical cord.

Histopathologicaly, infected group displayed amastigote burdens in decidua, spongy and labyrinthic zone with scarce inflamatory reaction. Giant cells showed also amastigote burdens with few tissue disorganization. No parasite burdens were found in fetal organs (pancreas, liver and heart).

Giant cells of infected animals showed significant reduction of nuclear parameters when compared to control group.

The stereological study of placenta from infected animals revealed a spongy region with a smaller relative volume when compared to non infected counterparts although the absolute volume displayed significant differences in all regions of the placenta.

The relative cellular and cytoplasmatic volume of giant cells as well as the number/mm³ and the total number /placenta, were significantly lower in infected group when compared to non infected control animals.

We conclude that, the functional alterations on spongioblasts and giant trophoblastic cells caused by RAL strain of *T.cruzi* can directly impair intrauterine fetal development through two distinct ways: directly by depressing production of placental lactogen or indirectly by leading to an inefficient uterus placental vascularization, impairing fetal nutrition.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA, X.; APT, W.; REYES, H. Enfermedad de Chagas congénita: estudio prospectivo en dos localidades de la IV Región de Chile. *Parasitol.Dia*, v.12, p.19-25, 1988.
- AHERNE, W.A.; DUNNILL, M.S. The estimation of whole organ volume. In: *Morphometry*. London, Edward Arnold, 1982. Cap.2, p.10-18.
- ALCÂNTARA FILHO, A.; BRENER, Z. Role of macrophage membrane receptors and the uptake of *Trypanosoma cruzi*: removal by proteases resynthesis and specificity for bloodstream and culture forms. Apresentado na 5ª Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas (Caxambu), 1978. Resumo C-34.
- ALMEIDA, H.O.; OLIVEIRA, F.C.; TEIXEIRA, V.P.A. Flebite umbilical em caso de doença de Chagas congênita. *Rev.Goiana Méd.*, v.27, p.233-8, 1981.
- ALONSO, M.T.; OLIVEIRA, F.C.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; PEREIRA, F.E.L.; PACHECO, H.R.; ANDRADE, R.M. Doença de chagas e gravidez. III. Ocorrência de prematuridade entre filhos de chagásicas crônicas. *Pediatr.Prat. S.Paulo*, v.38, p.13-6, 1967.
- AMATO NETO, V.; MARTINS, J.E.; OLIVEIRA, L.; TSUZUKI, E. Incidência de doença de Chagas entre mães de prematuros no Hospital das Clínicas de São Paulo. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, v.10, n.3, p.192-5, 1968.
- ANDRADE, S.G. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v.76, n.1, p.123-8, 1982.
-

-
- ANDRADE, S.G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v.94, p.185-7, 1999. Suppl.1.
- ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A. Estudio histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Hospital**, v.70, p.101-12, 1966.
- ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. Patologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. Cap.6, p.199-239.
- ANDRADE, S.G.; BITTENCOURT, A.L.; FIGUEIRA, R.M.; CARVALHO, M.L. Estudio experimental de amostras do *Trypanosoma cruzi* isoladas de gestantes chagásicas. **Rev.Patol.Trop.**, v.2, n.3, p.301-10, 1973.
- APT, W. Transmisión congénita de protozoas parasitos. **Bol.Of..Sanit.Panam.**, v.72, n.6, p.517-46, 1972.
- APT, W.; DIAZ, M. Hallazgo de *T.cruzi* en estroma de las vellosidades coriales de ratones. **Bol.Chil.Parasitol.**, v.20, v.52-3, 1965.
- APT, W.; NAQUIRA, C.; STROZZI, L. Transmisión congénita del *Trypanosoma cruzi*. III. En ratones con infección aguda y crónica. **Bol.Chil.Parasitol.**, v.23, n.1, p.15-9, 1968a.
- APT, W.; NAQUIRA, C.; TEJADA, A.; STROZZI, L. Transmisión congénita del *Trypanosoma cruzi*. II. En ratas con infección aguda y crónica. **Bol.Chil.Parasitol.**, v.23, n.1, p.9-15, 1968b.
-

ARAÚJO, M.P.G.; JÁCOMO, K.H.; BITTENCOURT, A.L.; GOMES, E.A.G. Doença de Chagas congênita em Brasília. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 16. **Resumos**. Natal, jun. 1980.

ARAÚJO, M.P.G.; JÁCOMO, K.H.; YUNES, M.A.F. Doença de Chagas congênita em Brasília. Apresentação de 28 casos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, 15. **Resumos**. Natal, 1983.

ARBUZONA, G.S.; GRYAZONA, I.M.; MOROZOVA, T.M. Investigation of diffuse and compact chromatin in the rat liver during hormonal induction. *Mol.Biol.*, v.2, p.245-51, 1968.

ARCAVI, M.; ORFUS, G.; GRIEMBERG, G. Incidencia de la infección chagásica en embarazadas y en recién nacidos en área no endémica. *Medicina (Buenos Aires)*, v.53, p.217-22, 1993.

ASSINI, M.T.T.; OTERO, G.O.; BERTONA, C. Transmisión transplacentaria de la enfermedad de Chagas. Demonstración histopatológica. *Rev.Bras.Pesq.Med. Biol.*, v.3-4, p.45-9, 1970.

ATIAS, A.; RUBIO, M.; LOLIC, M.; VALENZUELA, R. A new case of congenital Chagas' disease. *Bol.Chil.Parasitol.*, v.16, n.2, p.42-4, 1961.

ATIAS, A.; SHILLING, E.; NAQUIRA, N.; VALENZUELA, R. Un caso de enfermedad de Chagas congénita de curso fatal. *Bol.Chil.Parasitol.*, v.18, n.1, p.13-6, 1963.

AUCHTER DE MANERO, A. Enfermedad de Chagas congénita. *Rev.Med. Córdoba*, v.46, p.325-8, 1958.

-
- AZOGUE, E.; DARRAS, C. Estudio prospectivo de la enfermedad de Chagas en recién nacidos con infección placentaria por *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz - Bolivia). *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v.24, p.105-9, 1991.
- AZOGUE, E.; LA FUENTE, C.; DARRAS, C. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v.79, p.176-80, 1985.
- BARRON, S.; RILEY, E.P.; SMOTHERMAM, W.P. The effect of prenatal alcohol exposure on umbilical cord length in fetal rats. *Alcoholism: clinical and experimental research*, Baltimore, v.10, n.5, p.493-5, Oct. 1986.
- BITTENCOURT, A.L. Placentite chagásica e transmissão congênita da doença de Chagas. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, v.5, p.62-7, 1963.
- BITTENCOURT, A.L. Transmissão congênita da doença de Chagas. *Gaz.Méd. Bahia*, v.67, n.1, p.39-64, 1967.
- BITTENCOURT, A.L. Congenital Chagas' disease. *Am.J.Dis.Child.*, v.130, p.97-103, 1976.
- BITTENCOURT, A.L. Pathological aspects of congenital Chagas' disease. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS. *Anais*. Rio de Janeiro, 1979. p. k-10 - k-13.
- BITTENCOURT, A.L. **Doença de Chagas congênita na Bahia**. Salvador, 1984. 209p. Tese (Doutorado) - FACULDADE DE MEDICINA, Universidade Federal da Bahia.
-

- BITTENCOURT, A.L. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: MACLEOD, C. (ed.) **Parasitic infections in pregnancy and the newborn**. New York, Oxford Med. Publ., 1988, p.62-86.
- BITTENCOURT, A.L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. **Rev.Inst.Med.Trop.S. Paulo**, v.34, n.5, p.403-8, 1992.
- BITTENCOURT, A.L. Transmissão vertical da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. Cap.2, p.16-20.
- BITTENCOURT, A.L.; BARBOSA, H.S. The congenital transmission of Chagas' disease as a cause of abortion. **Gaz.Med. Bahia**, v.69, p.118-22, 1969.
- BITTENCOURT, A.L.; BARBOSA, H.S. Incidência da transmissão congênita da doença de Chagas em abortos. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, v.14, p.257-9, 1972.
- BITTENCOURT, A.L.; BARBOSA, H.S.; ROCHA, T.; SODRE, I.; SODRE, A. Incidência da transmissão congênita da doença de Chagas em partos prematuros na maternidade Tsylla Balbino (Salvador, Bahia). **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, v.14, p.131-4, 1972.
- BITTENCOURT, A.L.; FREITAS, L.A.R.; ARAÚJO, M.O.G.; JÁCOMO, R. Pneumonitis in congenital Chagas' disease. A study of ten cases. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v.30, n.1, p.38-42, 1981.
- BITTENCOURT, A.L.; GOMES, C. Gestações sucessivas de uma paciente chagásica com ocorrência de casos positivos de transmissão congênita da doença. **Gaz.Med. Bahia**, v.67, n.3, p.166-72, 1967.
-

-
- BITTENCORT, A.L.; SADIGURSKY, M.; BARBOSA, H.S. Doença de Chagas congênita. Estudo de 29 casos. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, v.17, n.3, p. 146-59, maio/jun. 1975.
- BITTENCOURT, A.L.; SANTOS, I.; RAMOS, M.E.A. Incidência de transmissão congênita da doença de Chagas em partos a termo. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo*, v.16, n.4, p.197-9, 1974.
- BITTENCOURT, A.L.; VIEIRA, G.O.; TAVARES, H.C.; MOTA, E.; MAGUIRE, J. Esophageal involvement in congenital Chagas' disease: report of a case with megaesophagus. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v.33, n.1, p.30-3, 1984.
- BJÖRKMAN, N. *An atlas of placental fine structure*. London, Baillière Tindall & Cassel, 1970.
- BLANCO, S.; CURA, S.N.; TULIÁN, R.; HURVITS, A.; VILLALONG, A.C. et. al. Detección de la madre y el niño chagásico en la transmisión materno infantil. *Medicina (Buenos Aires)*, v.53, p.44, 1993. Supl.1.
- BLANCO, S.B.; SEGURA, E.L. Infección chagásica en embarazadas, aspectos obstétricos y perinatales. Infección cannatal, estrategia para la detección de niños infectados congénitamente. *Medicina (Buenos Aires)*, v.55, p.26, 1997. Supl.3.
- BLANK, B. Enfermedad de Chagas y embarazo. Estado atual del tema. *Rev. Soc. Ginecol.Obstet. Buenos Aires*, v.2, p.311, 1974.
- BLANK, B.; BONET, A.H.; CICHERO, J.A.; ORTIZ, S.; DEL BOCA, J.; VILLAGRA, L.E.; MOSQUEIRA, J.; PALASSO, E.R.W. La infección chagásica feto neonatal en relación con la infección chagásica materna. *Rev.Soc.Ginecol.Obstet. Buenos Aires*, v.50, n.701, p.324-8, 1971.
-

- BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood stream of normal and immune mice. *An.Trop.Med.Parasitol.*, v.63, p.215-20, 1969.
- CAMPBELL, W.J.; DEB, S.; KWOK, S.C.; JOSLIN, J.A.; SOARES, M.J. Differential expression of placental lactogen-II and prolactin-like protein-A in the rat chorioallantoic placenta. *Endocrinology*, v.125, p.1565-74, 1989.
- CAMPOS, E.S. Transmissão intra-uterina do *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental do cão. *An.Fac.Med.S.Paulo*, v.3, p.35-9, 1928.
- CAMPOS, E.S. Mais uma contribuição ao estudo da transmissão intra-uterina experimental do *Trypanosoma cruzi* (3ª comunicação sobre a moléstia de Chagas congênita experimental). *Bol.Soc.Med.Cir. São Paulo*, v.14, n.7, p.235-9, 1930.
- CAMPOS, E.S. Tripanossomíase americana congênita experimental do cão. *Med.Prat.*, v.2, n.1-2, p.57-9, 1932.
- CARLIER, Y.; RIVERA, M.T.; TRUYENS, C.; PUISSANT, F.; MILAIRE, J. Interactions between chronic murine *Trypanosoma cruzi* infection and pregnancy: fetal growth retardation. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v.37, n.3, p.534-40, 1987.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v.1, p.158-218, 1909.
- CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v.3, p.219-75, 1911.
-

-
- CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanosomíase americana. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v.8, p.5-36, 1916.
- CHAGAS, C. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da tripanozomíase americana. Retrospecto histórico. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v.15, p.67-76, 1922.
- CHAGAS, C. Forma nervosa da tripanossomíase americana. *Rev.Clín.*, v.4, p.2-5, 1930.
- CHAGAS, C. Estado atual da trypanossomíase americana. *Rev.Biol.Hig.*, v.5, p.58-64, 1934.
- CHALKLEY, H.W. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J.Nat.Cancer Institute*, v.4, p.47-53, Aug. 1943.
- CHAPADEIRO, E.; OLIVEIRA, F.; LOPES, E.R.; ALONSO, M.T.; PEREIRA, F.E.L.; BONATELLI, A.P.F.; HIAL, U. Doença de chagas e Gravidez. IV. Ocorrência de natimortalidade entre filhos de chagásicas crônicas. *Hospital*, v.71, p.953-5, 1967.
- CONTI DIAZ, A. Infección chagásica en embarazadas y congénita en un centro assistencial de Montevideo. *Medicina*, v.53, p.44-5, 1993. Supl.1.
- CROZE, F.; KENNEDY, T.J.; SCHROEDTER, I.C.; FRIESEN, H.G. Expression of rat prolactin-like protein-B in deciduoma of pseudopregnant rat and in decidua during early pregnancy. *Endocrinology*, v.127, p.2665-72, 1990.
-

- CUNHA, S.A.; CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; AZOUBEL, R.; CONTRERA, J.D.
Experimental hypervitaminosis A in the rat. XXV. The effect of a high single dosis of vitamin A on umbilical cord lenght. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 44. *Anais*. São Paulo, jul. 1992. p.712.
- CUNIO, R.W.; OLMOS, J.A.; MERCAU, G.T.N.; BLANCA, R.L.; MARTEAU, D.F.; ONTIVERO, M.I.; BUDEGUER, M.V. Chagas Mazza congenito experimental. *Medicina (Buenos Aires)*, v.40, p.50-5, 1980. Supl.1.
- CUNIO, R.W.; OLMOS, J.A.; MERCAU, G.T.N.; SZECSEI, P.P.; ALVAREZ BUENO, A.A.; CUENYA P.; CARRERO, V.R.D.; MEULI, M. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 7. *Resum. Comun. Libres*. Buenos Aires, 1977. p.230.
- DAO, L. Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado Guarico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev.Policlin.Caracas*, v.17, p.17-32, 1949.
- DAVIES, J.; GLASSER, S.R. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. *Acta Anat.*, v.69, p.542-608, 1968.
- DELESSE, M.A. Procedé mécanique pour determiner la composition des roches. *Annales des Mines*, Paris, v.13, p.379-88, 1848.
- DELGADO, M.A.; SANTOS-BUCH, C.A. Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white swiss mice. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v.27, n.6, p.1108-15, 1978.
-

-
- DIAS, J.C.P. Epidemiological aspects of Chagas' disease in the western of Minas Gerais, Brazil. Environmental, ecologic and human aspects studies by the Bambui Center (FIOCRUZ) during the period 1943-1979. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE DOENÇA DE CHAGAS. Rio de Janeiro, *Anais*. Rio de Janeiro, 1979. p.171.
- DINIZ, E.M.A.; CAMARGO, M.E.; VAZ, F.A.C.V. Doença de Chagas congênita. Relato de um caso com sobrevida de 4 meses. *Pediatria (São Paulo)*, v.3, n.3, p.252-5, 1981.
- DVORAK, J. Trends in the area of in vitro cell cultures for *Trypanosoma cruzi* research, in the in vitro cultivation of the pathogens of tropical disease. *Trop.Dis.Res. Series*, v.3, p.223-36, 1979.
- DVORAK, J.; HYDE, T. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cell in vitro. I - Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp.Parasitol.*, v.34, p.26-283, 1973.
- DVORAK, J.; SCHMUNIS, C. *Trypanosoma cruzi*: interaction with mouse peritoneal macrophages. *Exp.Parasitol.*, v.32, p.289-300, 1972.
- EMMANOUILIDES, G.C.; HOBEL, C.L.; YASHIRO, K.; KLYMAN, G. Fetal responses to maternal exercise in the sheep. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, v.112, n.1, p.130-7, 1972.
- FARIA, T.N.; DEB, S.; KWOK, S.C.M.; TALAMANTES, F.; SOARES, M.J. Ontogeny of placental lactogen-I and placental lactogen-II expression in the developing rat placenta. *Develop.Biol.*, v.141, p.279-91, 1990.
-

- FARIA, T.N.; OGREN, L.; TALAMANTES, F.; LINZER, D.I.; SOARES, M.J. Localization of placental lactogen-I in trophoblast giant cells of mouse placenta. **Biol.Reprod.**, v.44, p.327-31, 1991.
- FÁVERO, M.; CARVALHEIRO, C.F.G. Doença de Chagas como causa de perdas fetais. **Medicina C.A.R.L.**, v.7, p.121-8, 1974.
- FERNÁNDEZ, E.A.; BARRETO, A.C.P.; IANNI, B.M.; VIANNA, C.B.; MADY, C.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Incidência da transmissão congênita na doença de Chagas. **Arq.Brasil.Cardiol.**, v.49, n.1, p.47-9, 1987.
- FREILIJ, H.; ALTCHER, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. **Clin.Infect.Dis.**, v.21, n.3, p.551-5, 1995.
- FRETES, R.E.; DE FABRO, S.P. Placenta chagásica humana: alteraciones estructurales y citoquímicas de los vasos sanguíneos. **Rev.Fac.Cienc. Med.Univ.Nac. Córdoba**, v.53, p.11-5, 1995.
- GAVALLER, G. Enfermedad de Chagas congenita: observación anatomo-patologica en gemelos. **Bol.Matern.Concep.Palac.**, v.4, n.1, p.59-64, 1953.
- GROSKOPF, J.C.; SYU, L.J.; SALTIEL, A.R.; LINZER, D.I. Proliferin induces endothelial cell chemotaxis through a G protein-coupled, mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. **Endocrinology**, v.138, p.2835-40, 1997.
- GUSMAN-BRACHO, C.; LAHUERTA, S.; VELASCO-CASTREJON, O. Chagas' disease. First congenital case report. **Arch.Med.Res.**, v.29, n.2, p.195-6, 1998.
-

-
- GU, Y.; SRIVASTAVA, R.K.; CLARKE, D.L.; LINZER, D.I.; GIBORI, G. The decidual prolactin receptor and its regulation by decidua-derived factors. **Endocrinology**, v.137, p.4878-85, 1996.
- HENNIG, A. Fehler der Oberflächenbestimmung von Kernen bei Endlicher Schnittdicke. **Mikroskopie**, v.12, n.1-2, p.7-11, April 1957.
- HOET, J.J.; HANSON, M.A. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. **J.Physiol.**, v.514, n.3, p.617-27, 1999.
- HOWARD, J. **La enfermedad de Chagas congénita**. Santiago, 1962. 55p. Tese (Doutorado) Universidad de Chile. 1962.
- HOWARD, J. Clinical aspects of congenital Chagas' disease. New approaches in American Trypanosomiasis research: proceedings of an international symposium. **PAHO Sci Pub.**, v.318, p.212-5, 1975.
- HOWARD, J.; RIOS, C.; EBENSPERGER, I.; OLIVOS, P. Enfermedad de Chagas congénita. **Bol.Chil.Parasitol.**, v.12, n.3, p.42-45, 1957.
- HOWARD, J.; RUBIO, M. Congenital Chagas' disease. I - Clinical and epidemiological study of thirty cases. **Bol.Chil.Parasitol.**, v.23, n.3-4, p.107-12, 1968.
- IGUCHI, T.; TANI, N.; SATO, T.; FUKATSU, N.; OHTA, Y. Developmental changes in mouse placental cells from several stages of pregnancy in vivo and in vitro. **Biol.Reprod.**, v.48, p.188-96, 1993.
-

JACKSON, D.; VOLPERT, O.V.; BOUCK, N.; LINZER, D.I.H. Stimulation and inhibition of angiogenesis by proliferin and proliferin-related protein. *Science*, v.266, p.1581-4, 1994.

JÖRG, M.E. Trypanosomiasis cruzi congenital mortal en lactente de 17 dias de vida. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE ENFERMEDAD DE CHAGAS, 1, Buenos Aires, Sociedade Argentina de Parasitologia, 1953, p.205-216.

KEIGHREN, M.; WEST, J.D. Analysis of cell ploidy in histological sections of mouse tissues by DNA-DNA in situ hybridization with digoxigenin-labelled probes. *Histochem.J.*, v.25, p.30-44, 1993.

KOMESU, M.C. **Estudo morfológico, morfométrico e estereológico das alterações provocadas no epitélio lingual do feto de rato pela administração de chumbo durante a gestação.** Ribeirão Preto, 1995. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

LAUTREC, J.C.; MARTINEZ, F.S.; MARCHESE, C.A.; VOTTA, R.A. Estudio de recién nacidos hijos de madres chagasicas. *Obstet.Ginecol.Lat.Am.*, v.32, n.2, p.83-7, 1975.

LEÃO, L.L.S.; LOPES, R.A.; NOVAES JR, A.B.; SALA, M.A.; KOMESU, M.C.; MAIA CAMPOS, G. The effect of maternal protein deprivation during pregnancy in rat umbilical cord length. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS,14. **Resumos.** Jaboticabal, 1992. p.259.

LECHNER, A.J.; WINSTON, C.C.; BAUMAN, J.E. Lung mechanics, cellularity and surfactant after prenatal starvation in guinea pigs. *J.Appl.Physiol.*, v.60, p.1610-14, 1986.

-
- LIEDTKE JR, H.; AZOUBEL, R.; TUBINO, P.J.G.; LOPES, R.A. Estudo morfológico de fetos de ratas tratadas com ciclofosfamida durante a gestação. **Rev.Regional de Ciências**, São José do Rio Preto, v.4, p.95-104, 1995.
- LINZER, D.I.H. Placental angiogenic and anti-angiogenic factors. **J.NIH Res.**, v.7, p.57-8, 1995.
- LISBOA, A.C. Sobre a forma congênita da doença de Chagas - Estudo anátomo-patológico de 6 casos. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, v.2, p. 319-34, 1960.
- LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; CUNHA, M.R.B.; FONSECA, M.A. Doença de Chagas congênita no Triângulo Mineiro. Relato de um caso. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, v.19, n.3, p.165-9, 1977.
- LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; OLIVEIRA, F.C.; ALONSO, M.T.; PEREIRA, F.E.; ALMEIDA, H.O.; HIAL, W. Doença de Chagas e gravidez. V. Estudo de 50 placentas de gestantes chagásicas crônicas. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, v.9, p.393-6, 1967.
- LOPES, R.A.; SALA, M.A.; MAIA CAMPOS, G.; PETENUSCI, S.O.; KOMESU, M.C. The effect of methylmercury on umbilical cord length. **Anais de Farmácia e Química**, v.31-32, p.66, 1991/1992. Suplemento (Resumo).
- LUBAN, N.; DVORAK, J. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. III. Selection for biological characteristics following intracellular passage. **Exp.Parasitol.**, v.36, p.143-9, 1974.
-

- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. In: BROCK, G.R.; WHELAN, J. (Ed.) **Childhood environment and adult disease**. Chichester, UK, John Wiley, 1991, p.38-55.
- LUMSDEN, W.H.R. Biological aspects of trypanosomiasis research, 1965; a retrospect, 1969. **Adv.Parasitol.**, v.8, p.227-49, 1970.
- MACEA, J.R.; LIMA, C.A.; MULLER, H.; CICHALANY, N.; HASE GANA, Y. Placentite chagásica. **J.Bras.Ginecol.**, v.84, n.1, p.35-8, 1977.
- MATHESON, I.M.H.; FRANKOWSKI, R.F.; HELD, B. Foetal maternal morbidity in the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. **Trans.R.Soc. Trop.Med.Hyg.**, v.77, p.405-11, 1983.
- MATTA, V.; HIDALGO, G.; RIVAS, L. Transmisión congénita y evolución fisiopatológica de la enfermedad de Chagas en Guatemala. **Rev.Asoc.Guatemalteca Parasitol.Med.Trop.**, v.6, p.110, 1991.
- MAYER, M.; ROCHA-LIMA, H. Zum Verhalten von *Schizotripanum cruzi* in Warmblütem und Arthropoden. **Arch.Schiffs Tropenhyg.**, v.18, p.101-36, 1914.
- MCLEOD, K.R.; SMITH, W.C.; OGREN, L.; TALAMANTES, F. Recombinant mouse placental lactogen-I binds to lactogen receptors in mouse liver and ovary: partial characterization of the ovarian receptor. **Endocrinology**, v.125, p.2258-66, 1989.
- MECKERT, P.C.; CHAMBO, G.S.; LAGUENS, R.P. Enfermedad congénita secundaria a la infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de la enfermedad de Chagas congénita. **Medicina (Buenos Aires)**, v.40, p.40-4, 1980. Suppl.1.
-

-
- MEDINA-LOPES, M.D. **Transmissão materno-infantil da doença de Chagas.** Brasília, 1983. 137p. Tese (Mestrado) - Universidade de Brasília.
- MELLO, D.A.; BORGES, M.M. Neonatal transmission of *T.cruzi* in *Calomys callosus* (Rodentia). *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v.75, n.5, 1981.
- MENEGUETTE, C. **Estudo experimental da transmissão transplacentária da infecção aguda e das alterações placentárias causadas por várias cepas do *Trypanosoma cruzi* em camundongos *Mus musculus*.** São José do Rio Preto, 1997. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina.
- MENEGUETTE, C.; SALA, M.A.; LOPES, R.A.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A.A. Experimental study on the effects of *T.cruzi* (Colombian strain) on mouse fetus and placenta. *Boll.Chim.Farm.*, v.138, n.2, p.30, Feb. 1999a.
- MENEGUETTE, C.; SALA, M.A.; LOPES, R.A.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A.A. Effects of *Trypanosoma cruzi* (Bolivia strain) on mouse fetus and placenta. *Boll.Chim.Farm.*, v.138, n.2, p.31, Feb. 1999b.
- MENEGUETTE, C.; SALA, M.A.; LOPES, R.A.; CARRARO-ABRAHÃO, A.A.; PRADO JR., J.C.; ALBUQUERQUE, S. Estudo experimental dos efeitos de *Trypanosoma cruzi* na placenta e fetos de camundongos. *Estudos Avançados*, v.13, , n.35, p.130-1, jan./abr. 1999c. Suplemento especial.
- MENEZES, C.A.S.; BITTENCOURT, A.L.; MOTA, E.; SHERLOCK, I.; FERREIRA, J. Avaliação da parasitemia em mulheres portadoras de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* durante e após a gestação. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v.25, p.109-13, 1992.
-

MERZ, W.A. Die streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und the anwendinig zur bestimmung von Oberflachem - Volumen Relationen im knochengewebe. *Mikroskopie*, v.22, n.5/6, p.132-42, feb. 1968.

MILANESE, M.L.; HOFF, R.; MOTT, K. A longitudinal study of infants born to chagasic women. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE DOENÇA DE CHAGAS**. Rio de Janeiro, 25-28 julho 1979.

MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi* milk transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitology*, v.65, p.1-9, 1972.

MILLER, M.E.; HIGGINBOTTOM, M.; SMITH, D.W. Short umbilical cord: its origin and relevance. *Pediatrics*, v.67, n.5, p.618-21, 1981.

MOESSINGER, A.C. Fetal akinesia deformation sequence: an animal model. *Pediatr.Res.*, v.72, n.6, p.857-63, 1983.

MOESSINGER, A.C.; BLANC, W.A.; MARONE, P.A.; POLSEN, D.C.; Umbilical cord length as index of fetal activity: experimental study and clinical implications. *Pediatr.Res.*, v.16, n.2, p.109-12, 1982.

MOYA, P.R.; VILLAGIA, L.; RISCO, J. Enfermedad de Chagas congénita: hallazgos anatomopatológicos en placenta y cordão umbilical. *Rev.Fac.Cienc.Med.Univ. Córdoba*, v.37, n.1-4, p.21-7, 1979.

MULNARD, J.G, Les propriétés phagocytaires dei trophoblaste au cours des premières phases de l'ovo-implantation chez la souris. *Arch.Biol.*, v.78, p.575-94, 1967.

-
- MUÑOZ, P.C.; LORCA, M.H.; THIERMAN, E.; ASTORGA, B.L.; ATIAS, A.M.; PINO, S. Transmisión congénita del *Trypanosoma cruzi*. Investigación en la maternidad del Hospital San Juan de Dios, de Santiago. *Rev.Chil.Pediat.*, v.53, n.1, p.22-7, 1982.
- MUÑOZ, P.C.; THIERMAN, E.; ATIAS, A.M.; SCH, C.A. Enfermedad de Chagas congénita sintomática en recién nacidos y lactantes. *Rev.Chil.Pediat.*, v.63, p.196-202, 1992.
- NÄGLER, K. Experimentelle studien über die passage von *Schizotrypanum cruzi* durch einheimische Tiere. *Zentrabl.Backteriologie.Mikrobiologie.Hyg. (B)*, v.71, p.2-3, 1913.
- NATTAN-LARRIER, L. Non-transmission des trypanosomiasés de la mère au fœtus. *Bull.Soc.Path.Exot.*, v.5, n.7, p.550, 1912.
- NATTAN-LARRIER, L. Hérité des infections expérimentales a *Schizotrypanum cruzi*. *Bull.Soc.Path.Exot.*, v.14, p.232, 1921.
- NATTAN-LARRIER, L. L'hérité de la maladie de Chagas. *Bull.Acad.Med.*, v.99, p.97, 1928.
- NIEDER, G.L.; JENNES, L. Production of mouse placental lactogen-I by trophoblast giant cells in utero and in vitro. *Endocrinology*, v.126, p.2809-14, 1990.
- NISIDA, I.V.V.; AMATO NETO, V.; BRAZ, L.M.A.; DUARTE, M.I.S.; UMEZAWA, E.S. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three Health Institution in São Paulo city, Brazil. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, v.41, n.5, p.305-11, 1999.
-

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J.Exp.Med.*, v.143, p.1402-1420, 1976.

NUNES, M.P.; COUTINHO, S.G.; LOUIS, J.A.; SOUZA, W.J. *Trypanosoma cruzi*: quantification in tissue of experimentally infected mice by limiting dilution analysis. *Exp.Parasitol.*, v.70, p.186-92, 1990.

OLEG, S. Sulla trasmissione transplacentare del *Trypanosoma brucei*. *Sperimentale*, v.95, p.127-40, 1942.

OLIVEIRA, C. Estudo morfológico, morfométrico e estereológico das alterações do epitélio de revestimento e glandular de palato, língua e glândulas submandibulares de fetos de ratos submetidos ao alcoolismo. Jaboticabal 1989. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

OLIVEIRA, F.C.; CHAPADEIRO, E.; ALONSO, M.T.; LOPES, E.R.; PEREIRA, F.E.L. Doença de Chagas e gravidez. I - Incidência de tripanossomíase e abortamento espontâneo em gestantes chagásicas crônicas. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo*, v.8, n.4, p.184-5, 1966.

OLIVEIRA, H.; PAULA, V.; TEIXEIRA, A.; OLIVEIRA, A.C.F. Alterações nucleares em células parasitadas pelo *T.cruzi*. *Rev.Patol.Trop.*, v.10, p.15-20, 1981.

OLIVEIRA, P.T.; LOPES, R.A.; TONETO, A.D.R.; SALA, M.A.; CAMPOS, G.M.; WATANABE, I. The effect of hypertermia on umbilical cord and placenta. *Anais de Farmácia e Química*, São Paulo, v.33-34, p.91, 1993-1994. Suplemento.

-
- OSOFISKY, H.J. Relationships between nutrition during pregnancy and subsequent infant and child development. *Obstet.Gynecol.Survey*, v.30, p.227-41, 1975.
- PACKCHANIAN, A. Reservoir host of Chagas' disease in the state of Texas. *Am.J.Trop.Med.*, v.22, p.623-31, 1942.
- PEDREIRA DE FREITAS, J.L. Moléstia de Chagas como problema de saúde médica no Brasil. *Rev.Assoc.Méd.Bras.*, v.11, p.13-521, 1965.
- PEHRSON, P.O.; WAHLGREN, M.; BENGTTSSON, E. Asymptomatic congenital Chagas' disease in a five-year-old child. *Scand.J.Infec.Dis.*, v.13, p.307-8, 1981.
- PHILIPS, N.R. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*. Considerations regarding standartization of material. *An.Trop.Med.Parasitol.*, v.54, p.60-70, 1960.
- PIFANO, F. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch.Ven.Med.Trop.Parasitol.Med.*, v.3, n.2, p.73-99, 1960.
- PONCE, C. & PONCE, E. Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Honduras. *Parasitol.Día*, v.9, p.199-202, 1995.
- RASSI, A.; BORGES, C.; KOBERLE, F.; PAULA, O.H. Sobre a transmissão congênita da doença de Chagas (A propósito da observação de uma parturiente na fase aguda). *Rev.Goiana Med.*, v.4, p.319-32, 1958.
- REZENDE, J.; BARCELLOS, J.M.; SANTOS, A.S. Placentite chagásica. Um caso provável de transmissão placentária da esquizotripanose humana. *Rev.Ginecol.Obstet.*, v.105, n.6, p.9-20, 1959.
-

RIBEIRO, R.D.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO, A.A.; LOPES, R.A.; PRADO JR, J.C.; GARCIA, T.A.R.; TOLDO, M.P.A. Uma nova cepa do *Trypanosoma cruzi* isolada do triatomíneo *Triatoma infestans*. In: Reunião Anual da SBPC, 45. Anais. Recife, jul. 1993. p.769-70.

ROBY, K.F.; SOARES, M.J. Trophoblast cell differentiation and organization: role of fetal and ovarian signals. *Placenta*, v.14, p.529-45, 1993.

ROJAS DE ARIAS, A. Epidemiología y vectores de la enfermedad de Chagas en Paraguay. *Mem. del Inst. Invest. Ciencias Salud*, v.15, p.3-28, 1990.

RUBIO, M.; DONOSO, F. Enfermedad de Chagas en niños y tratamiento con Bay 2502. *Bol. Chil. Parasitol.*, v.24, n.1, p.43-8, 1969.

SALA, M.A.; KOMESU, M.C.; LOPES, R.A.; MAIA CAMPOS, G. Karyometric study of basal cell carcinoma. *Braz. Dent. J.*, v.5, n.1, p.11-4, 1994.

SALA, M.A.; LOPES, R.A.; MATHEUS, M. Método morfológico para analisis cuantitativo de los tejidos. Determinación de los parámetros normales para el hepatocito de rata. *Arch. Fac. Med. Zaragoza*, v.32, n.1, p.29-31, 1992.

SALEME, A.; YACINELLI, G.L.; IÑIGO, L.A.; VALPERGA, S.M.; ALONSO, E.; ERIMBAVE, A.; MORENO, A.; ZERDAN, A.; HATEM, J.; TORO, A.G. Enfermedad de Chagas-Massa congénita en Tucuman. *Arch. Argent. Pediat.*, v.69, p.162-69, 1971.

SARASÚA, W.M. Detección de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Artigas, Uruguay. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.26, , p.28, 1993. Supl.2.

-
- SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.; BORGONÑO, J.; ROJAS, A.; TELLO, P.; SALINAS, P. Algunas características epidemiológicas, clínicas y parasitológicas de la enfermedad de Chagas congénita. *Pediatría (Santiago)*, v.32, p.65-72, 1989.
- SCHIEBLER, T.H.; KNOOP, A. Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Rattenplazenta. *Z.Zellforsch.*, v.50, p.494-52, 1959.
- SCHILLING, E.; GALLEGOS, R.; GALLO, A.; LOLIC, M.; ATIAS, A.; NAQUIRA, N.; VALENZUELA, R. Tres casos de enfermedad de Chagas congénita. *Rev.Chil.Parasitol.*, v.32, n.12, p.671-6, 1961.
- SCHMUÑIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. Cap.1, p.1-15.
- SCHMUÑIS, G.A.; SZARFMAN, A. La enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (Buenos Aires)*, v.37, n.1, p.47-53, 1977.
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1975.
- SNOECK, A.; REMACLE, C.; REUSENS, B.; HOET, J.J. Effects of low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol.Neonate*, v.57, p.107-18, 1990.
- SOARES, M.J.; CHAPMAN, B.M.; KAMEI, T.; YAMAMOTO, T. Control of trophoblast cell differentiation: lessons from the genetics of early pregnancy loss and trophoblast neoplasia. *Dev.Growth Diff.*, v.37, p.355-64, 1995.
-

SOARES, M.J.; CHAPMAN, B.M.; RASMUSSEN, C.A.; DAI, G.; KAMEI, T.; ORWIG, K.E. Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta*, v.17, p.277-89, 1996.

STAGNO, S; HURTADO, R. Enfermedad de Chagas congénita. Estudio inmunológico y diagnóstico mediante inmunofluorescencia con anti IgM. *Bol.Chil.Parasitol.*, v.26, n.1-2, p.20-27, 1971.

STEPHENS, D.N. Growth and development of dietary obesity in adulthood of rats which have been undernourished during development. *Br.J.Nutr.*, v.44, p.215-27, 1980.

STREIGER, M.; FABRO, D.; DEL BARCO, M.; BELTRAMINO, R.; BOVER, N. Chagas congénito en la ciudad de Santa Fe. Diagnóstico y tratamiento. *Medicina (Buenos Aires)*, v.55, p.125-33, 1995.

SZARFMAN, A.; COSSIO, P.; ARANA, R.M.; URMAN, J.; KREUTZER, E; LAGUNES, R.; SEGAL, A.; COARASE, L. Immunologic and immunopathologic studies in congenital Chagas' disease. *Clin.Immunol. Immunopathol.*, v.4, n.4, p.489-99, 1975.

SZARFMAN, A.; JANOWSKY, J.F.; TRANSVERSO, M. Primer caso de Chagas congénito diagnosticado en vida en el Hospital de Niños de la Municipalidad de Buenos Aires. *Arch.Argent.Pediatr.*, v.66, n.4-6, p.164-6, 1968.

TAFURI, W.L.; LOPES, E.R.; NUMAN, N. Doença de Chagas congénita. Estudo clínico-patológico de um caso de sobrevivida de seis meses. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo.*, v.15, n.5, p.322-30, 1973.

TAFURI, W.L.; ROCHA, A.; LOPES, E.R.; GOMES, J.; MINEO, J.R. Placentite chagásica - Apresentação de um caso com estudo a microscopia optica e eletrônica. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, v.26, n.3. p.152-59, maio/jun. 1984.

TELLO, P.; FERNANDEZ, P.; SANDOVAL, L; AMPUERO, G.; PIZARRO, T.; SCHENONE, H. Incidencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en madres e hijos de un sector del area Norte de Santiago. **Bol.Chil.Parasitol.**, v.37, n.1-2, p.23-4, 1982.

TERUEL, J.R.; NOGUEIRA, J.L. Perdas fetais em áreas de alta prevalência de moléstia de Chagas crônica. **Rev.Inst.Med.Trop. S.Paulo**, v.12, p.239-44, 1970.

VALPERGA, S.M.; CASTAGNARO, A.E.; OVEJERO DE VALPERGA, G.J.; MIRABELLA DE MIOTTI, M.G. et al. Prevalencia de Chagas congénito segundo estudo en Tucumán, Argentina. **Ciencia Med.**, v.7, p.137-55, 1992.

VIEIRA, O.G.; MAGUIRE, J.; BITTENCOURT, A.L.; FONTES, J.A.S. Doença de Chagas congênita. Apresentação de um caso com paralisia cerebral. **Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo**, v.25, n.6, p.305-9, nov./dez. 1983.

VILLELA, E. A transmissão intrauterina da moléstia de Chagas congênita pelo *Trypanosoma cruzi*. (Nota prévia). **Folha Med.** v.4, p. 41, 1923.

WEIBEL, E.R. Stereological principles morphometry in electron microscopic cytology. **Int.Rev.Cytol.**, New York, v.26, p.235, 1969.

WERNER, H. Über die Frage der placentaren Trypanosomen Infektionen und Übertragung von Trypanosomen und Antikörpern durch die Milch auf das Neugeborene. *Z.Tropenmed.Parasitol.*, v.5, p.422-42, 1954.

WERNER, H.; EGGER, I. Kongenitale Chagas - Einfluß einer *Trypanosoma cruzi* - Infektion auf die Embryonalentwicklung bei trächtigen Mäusen. *Z.Tropenmed.Parasitol.*, v.22, n.3, p.224-34, 1971.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular responses in rats during malnutrition at various ages. *J.Nutr.*, v.89, p.300-6, 1966.

YAMAGUCHI, M.; OGREN, L.; ENDO, H.; SOARES, M.J.; TALAMANTES, F. Co-localization of placental lactogen-I, placental lactogen-II, and proliferin in the mouse placenta at midpregnancy. *Biol.Reprod.*, v.51, p.1188-92, 1994.

YAMAGUCHI, M.; OGREN, L.; ENDO, H.; THORDARSON, G.; BIGSBY, R.M.; TALAMANTES, F. Production of mouse placental lactogen-I and placental lactogen-II by the same giant cell. *Endocrinology*, v.131, p.1595-1602, 1992.

ZAIDENBERG, M.; SEGOVIA, A. Enfermedad de Chagas congénita en la ciudad de Salta. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, v.35, p.35-43, 1993.

ZYBINA, E.V.; KUDRIAVTSEVA, M.V.; KUDRIATSEV, B.N. Distribuição do material cromossômico durante a divisão dos núcleos gigantes por fragmentação no trofoblasto dos roedores. Estudo morfológico e citofotométrico. [em russo]. *Tsitologii*, v.21, p.12-20, 1979.

ZYBINA, E.V.; ZYBINA, T.G. Polytene chromosomes in mammalian cells. *Int.Rev.Cytol.*, v.165, p.53-119, 1996.
