

Parte I – Conceitos atuais em doença de Chagas humana e experimental

1. Desafios da pesquisa científica após 90 anos da descoberta da doença de Chagas

Tania C. Araújo-Jorge
Solange L. de Castro
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

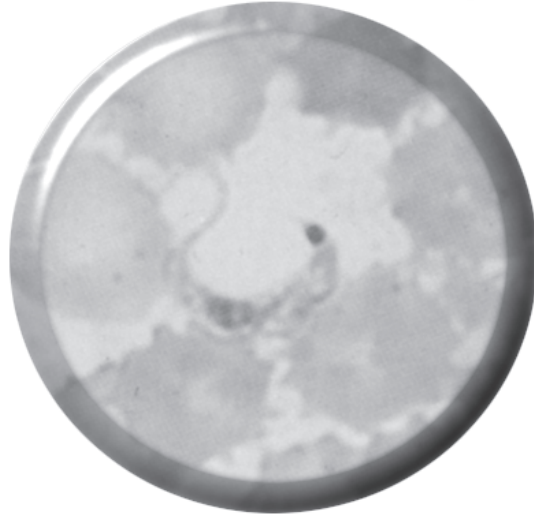


All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

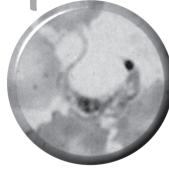
Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Parte 1



Conceitos Atuais em Doença de Chagas
Humana e Experimental

Capítulo 1



Desafios da pesquisa científica após 90 anos da descoberta da doença de Chagas

1.1

Questões da Doença Humana para Trabalho em Modelos Animais

Tania C. Araújo-Jorge & Solange L. de Castro

Quando Dr. Carlos Chagas viu pela primeira vez, sob as lentes de seu microscópio, o protozoário flagelado que denominou *Schizotrypanum cruzi*, em homenagem a seu mestre e amigo Oswaldo Cruz, começou a estudar a biologia desse interessante microorganismo e seu comportamento em animais experimentais. Este fato, único na medicina, da mesma pessoa descobrir e descrever o quadro clínico de uma nova doença, com um novo agente etiológico, o ciclo de vida desse agente, seus vetores e reservatórios, foi explicado mais tarde pelo próprio Chagas (Chagas 1922): “...quando no sangue periférico de uma criança febril, observamos o flagelado patogênico, de sua biologia já possuíamos noção completa, adquirida em demorados estudos anteriores”, usando sobretudo animais inoculados experimentalmente com a urina de triatomíneos ou com o sangue de macacos infectados.

Desde essa época, cientistas em todo o mundo tentam desvendar questões obscuras dessa relação parasita-hospedeiro para as quais hoje, após noventa anos da descoberta da doença, não se tem resposta. Como o *Trypanosoma cruzi* entra em tantos tipos celulares diferentes? Como pelo menos parte da população de parasitas que infecta um indivíduo escapa da potente resposta imune e mantém uma carga parasitária latente e em equilíbrio com seu hospedeiro por todo o longo período em que permanece assintomático? Os próprios pacientes e seus parentes também formulam claramente questões ainda não esclarecidas como: “doutor, por que meu irmão, que sempre viveu nas mesmas condições que eu, tem o coração bom e o meu está assim tão doente?” ou “doutor, não tem um remédio que possa matar o bicho que está causando esse inchaço na minha barriga?” ou ainda “doutor, por que esse remédio que o senhor me deu está me fazendo tão mal?”.

Com o sucesso da iniciativa das Organizações Mundial e Pan-americana da Saúde no programa de erradicação da transmissão vetorial, e com a melhoria nas técnicas de diagnóstico e da qualidade do sangue visando a interrupção da transmissão transfusional ou através de transplante de órgãos, o problema de novos casos de doença de Chagas na América Latina poderá estar resolvido na primeira década do novo século se as medidas que têm sido

eficientes para o controle da infestação de casas por *Triatoma infestans* forem igualmente eficazes para diferentes vetores como *Rhodnius prolixus* e outras espécies. O Uruguai já teve êxito na interrupção da transmissão vetorial e há previsão de certificação da interrupção da transmissão no Brasil e no Chile para 2001 (WHO, 1999). Com isso, o foco dos estudos deve, necessariamente, ser direcionado mais para os pacientes chagásicos e para as lesões que evoluem durante as fases indeterminada e crônica da infecção. Acreditamos que, nesse campo, permanecem como desafios o encontro de respostas definitivas a questões como:

- qual a fisiopatologia da miocardite chagásica, dos “megas”, e das lesões neurológicas?
- que fatores determinam a patogênese em órgãos específicos?
- quais os mecanismos decisivos para a cronificação da infecção: mecanismos de imunossupressão ou de imunopatogênese? Ou ambos?
- o que protege da doença os indivíduos infectados em fase indeterminada?
- que fatores concorrem para a evolução de pacientes da fase indeterminada para a crônica, disparando o surgimento de lesões com diferentes aspectos anátomo-clínicos?
- qual a influência da infecção materna na transmissão congênita e no desenvolvimento de doença em seus descendentes?
- existem, ou não, populações de parasitas com tropismo por certos órgãos?
- há possibilidades reais de imunoproteção e perspectivas concretas para o desenvolvimento de vacinas? Quais as estratégias mais promissoras de imunoproteção?
- a eficácia de quimioterápicos tripanocidas está associada a diferentes populações parasitárias?
- como aprimorar o tratamento etiológico de indivíduos infectados? Como intervir, terapeuticamente, na fase indeterminada da infecção?
- como melhorar o tratamento sintomático de pacientes crônicos?
- como melhorar a qualidade de vida dos seis milhões de pacientes ainda infectados?
- como proceder à profilaxia e ao tratamento de infecções por *T. cruzi* reativadas por imunossupressão, e quais as conseqüências do não-tratamento?

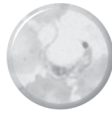
Uma pesquisa sobre a produção científica recente em doença de Chagas, na base de dados bibliográficos *MedLine*, feita em julho de 1999, identificou o seguinte quantitativo:

Palavra-chave	1964-1999	1995-1999	1990-1999
<i>Chagas disease</i>	5.240	1.098	2.155
<i>Chagas disease & review</i>	415	129	250
<i>Chagas disease & chemotherapy</i>	523	128	224
<i>Chagas disease & pathology</i>	816	172	355
<i>T. cruzi</i>	5.206	1.279	2.487
<i>T. cruzi & review</i>	234	69	155
<i>T. cruzi & animal models</i>	222	92	157
<i>T. cruzi & experimental infection</i>	324	99	186

Mais de 90% das referências correspondem a trabalhos originais e apenas 6% dos trabalhos estão associados a estudos com infecção experimental. Até estudos de quimioterapia, reconhecidamente pouco numerosos frente à necessidade de novas drogas clínicas e profiláticas, atingem cerca de 10% da produção científica em doença de Chagas, um percentual maior que o de estudos com infecção experimental. Talvez a heterogeneidade de resultados obtidos em diferentes modelos e a complexidade do trabalho com experimentação animal estejam na origem dessa carência de estudos, bem como na ausência de consenso quanto aos modelos mais adequados para cada aspecto da doença a ser estudado.

Como parte das comemorações dos noventa anos da descoberta da doença de Chagas, muitas revisões e livros vêm sendo lançados sobre o assunto e fica patente a necessidade de um uso mais objetivo dessa ferramenta já usada por Carlos Chagas: o estudo do curso da infecção por *T. cruzi* em modelos experimentais. A presente publicação se insere nesse contexto comemorativo e aponta a aplicabilidade dos modelos experimentais para a busca de respostas a questões como as levantadas acima.

Finalmente, uma vez que a detecção das fases indeterminada e crônica típicas da doença de Chagas em animais domésticos naturalmente infectados nas áreas endêmicas (como, por exemplo, o cão) ainda não tem base bibliográfica segura, apesar de não poder ser descartada, ressaltamos que este manual tratará da experimentação animal sobre a doença de Chagas, no sentido de reproduzir o mais fielmente possível, aspectos da doença humana. Dos diferentes modelos revisados (ver Capítulo 9), há nítida predominância de dados obtidos em camundongos, um reflexo da produção global da pesquisa básica em doença de Chagas. Talvez a sistematização de protocolos para estudos em murinos, apresentada nos capítulos finais deste manual, incentive a produção de um conjunto de protocolos para estudo em humanos, de modo a acelerar o encontro de respostas às questões acima.



1.2

A Doença de Chagas Humana e seus Modelos de Estudo

José Rodrigues Coura

Nenhum dos modelos experimentais da infecção chagásica utilizados, até o presente, reproduz rigorosamente a infecção e a doença humana como ela ocorre na natureza, nem mesmo quando se utilizam primatas filogeneticamente mais próximos do homem. Este fato se deve a diferenças espécie-específicas e intra-específicas, relacionadas, de um lado aos mecanismos de defesa de cada espécie de hospedeiro, particularmente ao seu sistema imune, e de outro às características das diversas cepas e clones do *Trypanosoma cruzi*, de seus determinantes antigênicos, receptores e mecanismos de escape, os quais denominamos de “complexo cruzi” em trabalhos anteriores (Coura et al., 1966, 1990). Por outro lado, os mecanismos de seleção clonal por passagens sucessivas de cepas do *T. cruzi* em diferentes vetores e reservatórios, inclusive no próprio homem, e as transformações por elas sofridas ao longo do tempo, quando mantidas em meios artificiais de cultura, transformam-nas em verdadeiras “cepas de laboratório”, com perda total ou parcial de suas características originais.

Dois outros aspectos extremamente importantes, no que se refere às diferenças entre os estudos experimentais e a infecção natural do homem pelo *T. cruzi*, são a quantidade de parasitas inoculados nos estudos experimentais (inóculo), em contraste com o número de parasitas que penetram no homem em uma primo-infecção natural ou em reinfecções, e o tipo de parasito (epi ou tripomastigota) utilizado, o que em última análise depende, na infecção experimental, da decisão do pesquisador e, na natural, da qualidade do vetor e das chances de penetração do *T. cruzi* na ocasião de sua deposição na pele ou mucosa do homem. Geralmente os inóculos experimentais são enormes em relação às infecções naturais do homem. Por exemplo, um inóculo considerado pequeno na maioria dos estudos é de 10^3 (1.000 parasitas) para um camundongo jovem de 8 a 10 g, enquanto uma dejeção de triatomíneo infectado contém em média 140 parasitas (Pereira et al., 1988), dependendo naturalmente da espécie vatora, do sexo, do tempo de infecção e evacuação, e do estágio do parasita (Wood, 1951; Dias, 1956; Zeledon et al., 1977; Perlowagora-Szumlewicz & Müller, 1979). Quantos desses parasitos depositados na pele ou na mucosa de uma criança ou adulto teriam a chance de penetrar? Dez, vinte, quarenta? Por outro lado os inóculos experimentais são total, ou predominantemente, com formas infectantes (tripomastigotas), enquanto a metaciclo-gênese do *T. cruzi*

para formas infectantes, na infecção natural, varia muito de acordo com o vetor (Perlowagora-Szulewicz & Moreira, 1994).

Em revisão sobre os determinantes epidemiológicos da doença de Chagas humana – a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade –, apresentamos em detalhe (Coura, 1988) as diversas variáveis condicionantes daqueles determinantes. Por outro lado, Andrade (1990), analisando a influência de diversas cepas de *T. cruzi*, na patogênese da miocardiopatia crônica em camundongos *inbred* e *outbred*, conclui que:

embora não descartando a influência da cepa do hospedeiro, a análise estatística dos nossos resultados indicou a cepa do parasita como o fator mais importante na determinação da lesão cardíaca no camundongo, especialmente quando as cepas do tipo III são consideradas.

Em síntese, a interação parasita-hospedeiro é de fundamental importância na modulação da infecção, da doença e de sua morbi-mortalidade, tanto na infecção natural humana como na infecção experimental (Postan et al., 1987). Por infecção entende-se a penetração, multiplicação e desenvolvimento do parasita no hospedeiro, enquanto doença são os danos causados no organismo pelo parasita e seus produtos ou pela própria resposta do hospedeiro. O equilíbrio ou desequilíbrio entre o parasita e o hospedeiro definem a infecção, a doença e a sua morbi-mortalidade. Definitivamente não há uma correlação entre a virulência e a patogenicidade de uma cepa de *T. cruzi* do homem, principalmente na fase crônica da infecção ou da doença, em relação à infecção experimental com a mesma cepa (Schlemper Jr., 1982).

Embora o homem seja o modelo ideal para estudos experimentais sobre a infecção e a doença de Chagas, por motivos éticos apenas os estudos observacionais podem ser realizados no homem, ou seja, observações retrospectivas ou prospectivas sobre a prevalência, a incidência, a morbidade, a mortalidade e a letalidade decorrentes da infecção e da doença. Diversos tipos de estudos clínicos e epidemiológicos descritivos e analíticos podem ser realizados para definir a história natural da doença de Chagas.

1.2.1 Estudos Descritivos

Os estudos descritivos são os mais freqüentemente utilizados para avaliação da infecção e da doença de Chagas e analisam a forma e a distribuição da doença, enquanto os estudos analíticos avaliam os seus determinantes. Para descrever a ocorrência da doença, algumas questões amplas têm que ser respondidas: quem está afetado? onde e quando os casos ocorrem?, ou seja, é necessário especificar *pessoa, lugar e tempo*, de acordo com a epidemiologia clássica.

Embora exista um número infinitamente grande de variáveis relacionadas com a pessoa, as seguintes são

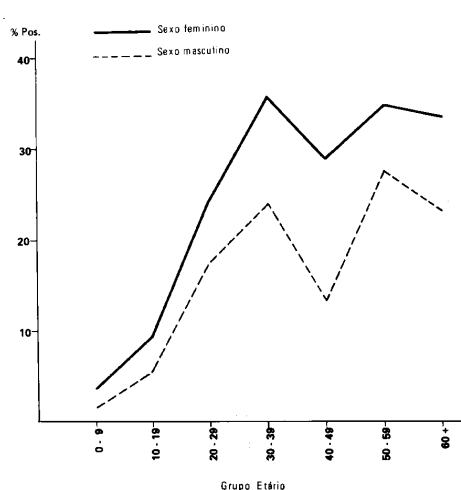


Figura 1 – Prevalência sorológica da infecção chagásica por idade e sexo. Virgem da Lapa, Minas Gerais, 1976

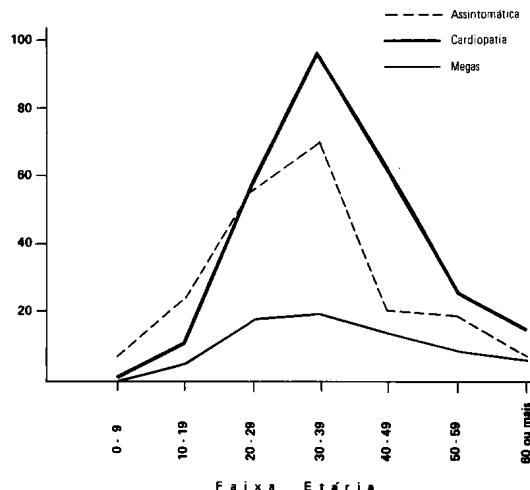


Figura 2 – Distribuição das formas clínicas de portadores de doença de Chagas de acordo com a faixa etária. Rio de Janeiro, 1960-1983

fundamentais na investigação sobre a doença de Chagas: idade, sexo, grupo étnico ou raça, ocupação, classe social e exposição à infecção.

A infecção chagásica é cumulativa e proporcional ao tempo e intensidade da exposição; portanto é lógico que a prevalência da infecção aumente com a idade, como pode ser observado na Figura 1. Da mesma forma a doença de Chagas, sendo uma doença evolutiva, tende a aumentar com a idade até a quarta/quinta década da vida (Figura 2), quando se estabiliza ou decresce devido à mortalidade (Coura et al., 1983).

Quanto ao sexo, por fatores ainda desconhecidos, a prevalência da infecção chagásica, na maioria dos estudos, tem se mostrado maior no sexo feminino, enquanto a doença incide mais no masculino. Admite-se que a mulher, por permanecer mais tempo em casa, esteja mais exposta à infecção, enquanto no homem, embora menos exposto, a infecção evolui mais freqüentemente para a doença devido ao maior esforço físico que desenvolve em suas atividades. Por outro lado, o negro, possivelmente por fatores coadjuvantes como a hipertensão arterial, tem tendência ao agravamento mais freqüente e precoce da doença de Chagas.

A ocupação, a classe social e a exposição à infecção estão intimamente relacionadas. A infecção e a doença de Chagas são mais freqüentes em pessoas procedentes de áreas rurais, de baixa condição social, que habitam ou habitaram cafuas, geralmente infestadas por triatomíneos, portanto, com maior chance de exposição de seus habitantes à infecção.

Outros fatores pessoais como estado civil, variáveis familiares como tamanho da família, ordem de nascimento, idade materna ao nascer, parecem de pouca importância na prevalência da infecção e da doença. Entretanto, a mortalidade precoce dos pais e irmãos é um dos indicadores importantes da doença de Chagas. Os estudos sobre fatores genéticos como os sistemas ABO e HLA são ainda controversos e necessitam ser ampliados para melhores conclusões.

As variáveis lugar e tempo (onde e quando) são muito importantes na investigação epidemiológica da doença de Chagas. O lugar está intimamente relacionado à distribuição e adaptação de triatomíneos ao domicílio e o tempo está diretamente relacionado à freqüência e intensidade da exposição. É indispensável em uma investigação epidemiológica sobre a infecção chagásica que se mostre ao paciente uma coleção de triatomíneos, adultos e ninfas, dos três gêneros (*Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*) e que a ele se pergunte: conhece? de onde? existe ou existia em sua residência? já foi picado por esse inseto? quando e onde? qual a freqüência? Deve-se indagar ainda sobre o tipo de residência, viagens e migrações e sobre a existência de casos idênticos na família.

De grande importância é a história de cirurgias, partos, transfusão de sangue, manipulação de animais e de materiais potencialmente contaminados, principalmente em laboratórios.

1.2.2 Estudos Analíticos

Os estudos analíticos avaliam os determinantes ou as razões da maior ou menor freqüência de um certo evento. Em síntese, eles estudam o “porquê”, através de formulação de hipóteses. Para testar uma hipótese sobre a causa de um evento, de uma doença ou de sua evolução, há duas possibilidades: observação ou experimentação. No caso da doença de Chagas, por motivos éticos, como já foi referido, os estudos devem ser observacionais. Excepcionalmente podem-se fazer “experimentos naturais”, ou seja, observar um fenômeno que ocorre naturalmente, sem interrompê-lo; por exemplo, verificar a incidência da doença de Chagas, em uma área com transmissão ativa, desde que a responsabilidade do controle não seja nossa. De qualquer forma esse tipo de estudo é criticável do ponto de vista ético.

Os estudos analíticos podem ser retrospectivos, prospectivos, seccionais, longitudinais e históricos prospectivos.

1.2.2.1 Estudos retrospectivos

Os estudos retrospectivos necessariamente são compostos de *casos* e *controles*. No caso da infecção chagásica, *casos* são indivíduos com sorologia, xenodiagnóstico, hemocultura e/ou PCR positivo para infecção chagásica, enquanto *controles* são indivíduos do mesmo grupo social, idade e sexo, porém com exames negativos para infecção chagásica.

Vantagens dos estudos retrospectivos: são relativamente baratos, necessitam de um menor número de participantes, apresentam resultados relativamente rápidos e são mais adequados para doenças raras ou pouco frequentes. Desvantagens: informações incompletas, possibilidade de variáveis confusionais e de medir apenas o risco relativo.

Para avaliação da doença de Chagas pareamos indivíduos da mesma área, idade e sexo, com sorologia positiva, com outros com as mesmas características e com sorologia negativa, os quais submetemos rotineiramente à anamnese e a exames clínico, eletrocardiográfico e radiológico do coração e do esôfago e ocasionalmente do cólon. Exames mais sofisticados como ecocardiografia, eletrocardiografia dinâmica (*holter*), ultrassonografia, eletrofisiologia cardíaca e digestiva com estimulação e até biópsias cardíaca e do aparelho digestivo orientadas, podem ser feitos; os três primeiros não invasivos, sem restrição, e os três últimos com as restrições éticas desses tipos de procedimentos na investigação clínica (Borges-Pereira et al., 1998).

1.2.2.2 Estudos prospectivos

Os estudos prospectivos ou de coortes, embora mais precisos, são pouco ou quase nunca utilizados na infecção chagásica devido a restrições éticas, ao deixarmos deliberadamente um grupo de pessoas expostas à infecção para analisarmos a sua incidência e evolução. Por outro lado, seriam estudos caros, necessitando o acompanhamento de um grande número de indivíduos, por um longo período de tempo e com possibilidade de muitas perdas devido à migração, morte ou abandono do estudo.

1.2.2.3 Estudos seccionais

Este talvez seja o tipo de estudo mais utilizado em trabalhos de campo sobre a doença de Chagas. Nele definimos uma determinada população exposta ao risco da infecção chagásica e verificamos os infectados através da prevalência sorológica e os não infectados, ou sorologicamente negativos, utilizando uma população definida ou uma amostra representativa. Podemos determinar a intensidade da exposição pelo índice de triatomíneos domiciliados e infectados com *T. cruzi*, pelo tempo de exposição da população e pela prevalência sorológica da infecção nos diversos grupos etários.

Podemos ainda determinar a morbidade da doença pareando, por idade e sexo, indivíduos sorologicamente positivos e negativos e procedendo aos diversos tipos de estudos sorológicos, parasitológicos, clínicos, radiológicos, eletrocardiográficos e outros já mencionados para avaliação do risco relativo ou “excesso de risco” dos infectados.

Tomando-se as devidas providências para a interrupção da transmissão, através dos órgãos encarregados do controle da doença de Chagas ou quando possível com recursos próprios, estaremos eticamente autorizados a prosseguir o estudo evolutivo da morbidade, mortalidade e letalidade pela doença. Naturalmente essa população deverá receber a devida assistência enquanto permanecermos na área.

1.2.2.4 Estudos longitudinais

Embora seja um tipo de estudo prospectivo, no caso da doença de Chagas deve-se afastar o risco de “novos casos”, acompanhando *casos* e *controles*, após a sua definição no primeiro estudo seccional. Periodicamente, de forma ideal anualmente, os *casos* e os *controles* devem ser reexaminados com a mesma metodologia ao longo do tempo. Dessa forma podemos acompanhar a morbidade, a mortalidade e a letalidade e estudar, até certo ponto, a história natural da doença.

Dentro dessa linha, os chamados “estudos prospectivos históricos” tendem a combinar as vantagens dos

estudos retrospectivos, através de anotações anteriores, com os estudos prospectivos, como no caso da doença de Chagas, com as limitações já mencionadas para esse tipo de estudo.

Alguns modelos de estudos realizados

O primeiro estudo epidemiológico que realizamos sobre a doença de Chagas foi do tipo descritivo multidisciplinar, visando caracterizar o ciclo ou os ciclos da doença no antigo estado da Guanabara (Coura, 1965), hoje município do Rio de Janeiro, que constou de avaliação sobre reservatórios e triatomíneos silvestres, de estudo sorológico em populações autóctones, de demanda hospitalar e doadores de sangue, da doença em doadores e receptores de sangue e de um estudo descritivo histórico em uma série de migrantes e não migrantes do Rio de Janeiro.

De forma analítica, podemos caracterizar dois tipos de ciclos do “complexo cruzi” (Coura et al., 1966): um silvestre entre animais e triatomíneos, que somente acidentalmente atingia o homem e outro inter-humano, em nível hospitalar, entre doadores e receptores de sangue.

A partir daquele estudo, analisamos prospectivamente uma série histórica, inicialmente de cem pacientes entre 170 estudados (Coura, 1965), acrescidos posteriormente para 260 (Coura, 1976) e depois para 510 (Coura et al., 1983), de vários estados do Brasil, mostrando importantes diferenças regionais da morbidade da doença de acordo com a área de procedência dos pacientes.

Em uma série de trabalhos seccionais e longitudinais, realizados nos estados de Minas Gerais, Paraíba, Piauí e Amazonas (Coura et al., 1984, 1985, 1994a,b, 1995, 1996), confirmamos as variações regionais da doença de Chagas e praticamente definimos a sua história natural, desde a sua origem, como ocorre por exemplo na Amazônia, na forma de *antropozoonose* (infecção de animais que se transmite ao homem), onde triatomíneos silvestres atacam o homem (Coura et al., 1994a), para áreas intermediárias, como as do Nordeste, onde triatomíneos como o *T. brasiliensis* são ubiqüitários, vivendo e transmitindo a infecção dentro e fora do domicílio, entre animais e o homem, sob a forma de *anfixenose*, até áreas mais antigas, onde o *T. infestans* é, ou foi, totalmente domiciliado e a infecção é praticamente uma *zooantroponose* (zoonose mantida pelo homem).

Na nossa experiência, nas áreas primitivas, onde a infecção é predominantemente silvestre, a doença é de baixa morbidade por falta de adaptação do *T. cruzi* ao homem, enquanto nas áreas intermediárias a morbidade da infecção humana é menor que nas áreas de *zooantroponoses* (áreas antigas), onde o *T. cruzi* é muito bem adaptado ao homem e a morbidade da doença de Chagas é alta.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:17-27, 1990.
- BORGES-PEREIRA, J.; XAVIER, S. S.; PIRMEZ, C. & COURA, J. R. Chagas disease in Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brazil. IV. Clinical and epidemiological aspects of left ventricular aneurism. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31:457-463, 1998.
- CHAGAS, C. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da tripanozomíase americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 15:67-76, 1922.
- COURA, J. R. *Contribuição ao estudo da doença de Chagas no Estado da Guanabara*, 1965. Tese, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- COURA, J. R. Evolutive pattern in Chagas' disease and life-span of *Trypanosoma cruzi*. In: American Trypanosomiasis Research Symposium. *PAHO/WHO, Scientific Publication*, 318:378-383, 1976.
- COURA, J. R. Determinantes epidemiológicos da doença de Chagas no Brasil: a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83 (Supl.I):192-402, 1988.

- COURA, J. R. Avanços do conhecimento sobre o “complexo cruzi” e a doença de Chagas. *Boletim da Academia Nacional de Medicina*, 151:141-144, 1990.
- COURA, J. R.; ABREU, L. L.; DUBOIS, L. E. G.; CORREIA LIMA, F. G.; ARRUDA Jr., E.; WILLCOX, H. P. F.; ANUNZIATO, N. & PETANA, W. Morbidade da doença de Chagas. II. Estudos seccionais em quatro áreas de campo do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79:101-124, 1984.
- COURA, J. R.; ABREU, L. L.; PEREIRA, J. B. & WILLCOX, H. P. F. Morbidade da doença de Chagas. IV. Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80:73-80, 1985.
- COURA, J. R.; ANUNZIATO, N. & WILLCOX, H. P. F. Morbidade da doença de Chagas. I. Estudo de casos procedentes de vários estados do Brasil, observados no Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78:363-372, 1983.
- COURA, J. R.; BARRETT, T. V. & ARBOLEDA, M. N. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27:251-253, 1994a.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J.; ALVES FILHO, F. I.; CASTRO, J. A. F.; CUNHA, R. V.; COSTA, W. & JUNQUEIRA, A. C. V. Morbidade da doença de Chagas em áreas do Sertão da Paraíba e da Caatinga do Piauí. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29:197-205, 1996.
- COURA, J. R.; FERREIRA, L. F.; PEREIRA, N. C. & SILVA, J. R. Tripanosoma do “complexo cruzi” em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 8: 125-133, 1966.
- COURA, J. R., JUNQUEIRA, A. C., GIORDANO, C. M. & FUNATSU, R. K. Chagas’ disease in the Brazilian Amazon. I - A short review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 36:363-368, 1994b.
- COURA, J. R.; WILLCOX, H. P. F.; ARBOLEDA, M. N.; FERNANDES, O. & PAIVA, D. D. Chagas’ disease in the Brazilian Amazon. III. A cross-sectional study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 37:415-420, 1995.
- DIAS, E. Observações sobre a eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sulamericanos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 54: 115-124, 1956.
- PEREIRA, J. B.; PESSOA, I. & COURA, J. R. Observações sobre as dejeções e o número de *T. cruzi* eliminados em diferentes espécies de triatomíneos durante a alimentação. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83 (Supl.):195, 1988.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & MOREIRA, C. J. C. *In vivo* differentiation of *Trypanosoma cruzi*. 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89:603-618, 1994.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & MÜLLER, C. A. Experiments in a search for an insect model for xenodiagnosis of chronic Chagas’ disease. I. The prevalence and intensity of infection of *Trypanosoma cruzi* in nine vector species. *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro*, 1979, E11-E16.
- POSTAN, M.; BAILEY, J. J.; DVORAK, J. A.; McDANIEL, J. P. & POTALLA, E. W. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. Histopathological and eletrocardiographical response to chronic infection. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 37:541-549, 1987.
- SCHLEMPER Jr. B. R. *Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas*. 1982. Tese, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- WHO. Chile and Brazil to be certified free of transmission of Chagas disease. *TDR News* 59:10, 1999.
- WOOD, S. F. Importance of feeding and defecation times of insect vectors in transmission of Chagas’ disease. *Journal of Economic Entomology*, 44:52-54, 1951.
- ZELEDON, R.; ALVARADO, R. & JIRÓN, L. F. Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera-Reduviidae). *Acta Tropica*, 34:65-67, 1977.