



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ELIENI SOCORRO MARQUES SOUSA**

---

---

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL E REVISÃO SISTEMÁTICA DA  
TRANSMISSÃO DO *Trypanosoma cruzi* PELA CANA-DE-  
AÇÚCAR CONTAMINADA**

---

---

**Goiânia**  
**2009**

---

**ELIENI SOCORRO MARQUES SOUSA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade Federal de Goiás**

---

---

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL E REVISÃO SISTEMÁTICA DA  
TRANSMISSÃO DO *Trypanosoma cruzi* PELA CANA-DE-  
AÇÚCAR CONTAMINADA**

---

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade Federal de Goiás  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Orientador: Marco Tulio Antonio Garcíazapata

Co-orientadora: Elisângela de Paula Silveira-Lacerda

**Goiânia**

**2009**

---

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO  
DE MESTRADO**

**Aluna: Elieni Socorro Marques Sousa**

---

**Orientador: Prof. Dr. Marco Túlio Antonio Garcíazapata**

---

**Co-orientadora: Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira-Lacerda**

**Membros:**

**1. Prof. Dr. Marco Túlio Antonio Garcíazapata**

**2. Profa. Dra. Renata Mazaro e Costa**

**3. Profa. Dra. Ana Maria de Castro**

**SUPLENTE:**

**1º Prof. Dr. Carlos Eduardo Anuniação**

**2º Profa. Dra. Maria Helena Rezende**

**Data: 25.05.2009**

---

Dedico este trabalho ao meu filho, Davi e à minha mãe Adeusina. Ao meu querido filhinho que, embora tão pequeno, sem nem mesmo entender o porquê da minha ausência, soube compreender e até mesmo me fortalecer nos momentos mais difíceis desta jornada. À minha mãe amada, que além de ser chagásica crônica, sofreu a perda de sete irmãos e de seus pais, todos por doença de Chagas, razão maior deste estudo.

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus,

Senhor, obrigada por mais esta conquista, pois sua mão esteve sempre estendida sobre mim. Ajude-me a ser coerente, honesta e ética com aqueles que necessitarem de minha ajuda profissional. Ó, rei eterno, imortal, invencível, Deus único, aceite minha gratidão!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Túlio Antônio Garcíazapata, agradeço pela orientação, amizade e incentivo. "O verdadeiro mestre não é aquele que dá o todo do próprio saber, mas aquele que nos conduz ao limiar de nossa mente". Você é o exemplo de um verdadeiro mestre. Aceite meus agradecimentos com a mais profunda admiração e respeito.

À Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira-Lacerda, minha co-orientadora, agradeço pelo apoio, pela ajuda constante e, principalmente, pelo seu carisma encantador. Você foi fundamental nesta conquista!

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, meus agradecimentos, especialmente ao Prof. Dr. Celmo Celeno Porto e à Valdecina Quirino, que com muito carinho e atenção contribuiu com a parte burocrática deste projeto.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, agradeço pelas lições do saber, por repartir suas experiências de vida e me auxiliar a trilhar este caminho.

Aos estagiários, André Ricardo Macedo e Mara Rubia Barbosa, ao meu colega de Mestrado, Hugo Deleon, meu respeito, afeto e eterna saudade.

Meu eterno e sincero agradecimento aos colaboradores desta pesquisa: Dr. Alejandro Luquetti Ostermayer, Dra. Ana Maria de Castro, Dr. Domingos Tiveron Filho, Dra. Maria Helena Rezende, Dra. Maria Tereza Faria, Dr. Alcides Mendes Júnior e Dr. Luiz Eduardo Ramirez.

Aos dois grandes amores da minha vida, meu esposo Denes e meu filho Davi, ofereço mais esta vitória. Obrigada por vocês existirem e fazerem parte da minha vida. Amo vocês!!!

Aos meus pais, José Jerônimo Marques e Adeusina Esteves Marques, que mesmo distantes mantiveram-se sempre ao meu lado, lutando comigo, iluminando meus caminhos obscuros, para que eu os trilhasse sem medo e cheia de esperança.

Às minhas irmãs, Eulália e Elisangela, aos meus sobrinhos, Eduardo Gabriel e Gustavo e, de forma muito especial, à minha sobrinha Camilla, que sempre cuidou tão bem do meu filhinho. Obrigada, Bia!!!

Aos meus colegas de trabalho, agradeço pelo apoio e paciência que tiveram comigo, especialmente minha colega Daiana, que sempre deu um jeitinho de justificar as minhas "ausências imprevistas".

À Profa. Me. Suzana Oellers, agradeço pela leitura atenta e cuidadosa de todo o trabalho, revisão e normalização do texto. Obrigada, Suzana, do fundo do meu coração!!!

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta para este estudo, agradeço imensamente!!!

## SUMÁRIO

---

DEDICATÓRIA .....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
SUMÁRIO .....	vii
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xviii
INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas .....	1
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> : características bioquímicas, biológicas e físico-químicas .....	2
1.3 Ciclos de transmissão de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
1.3.1 Ciclo silvestre .....	3
1.3.2 Ciclo parodoméstico .....	4
1.3.3 Ciclo doméstico .....	4
1.4 Reservatórios silvestres de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
1.5 Vias de transmissão de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
1.6 Transmissão oral de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
2 OBJETIVOS .....	10
2.1 Objetivo geral .....	10
2.2 Objetivos específicos .....	10
3 METODOLOGIA .....	11
3.1 Revisão sistemática .....	11
3.1.1 Tipo de estudo .....	11
3.1.2 Local .....	11
3.1.3 Amostra .....	13
3.1.3.1 Fontes de dados e seleção dos descritores .....	13
3.1.3.2 Critérios de inclusão e exclusão, estratégia de busca para dados eletrônicos e metodologia da pesquisa .....	13



3.2 Estudo experimental .....	14
3.2.1 Área e local do estudo .....	14
3.2.2 Avaliação da infecção natural de <i>Didelphis sp</i> por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
3.2.2.1 Aprovação pelo Comitê de Ética .....	15
3.2.2.2 Obtenção de <i>Didelphis sp</i> .....	15
3.2.2.3 Diagnóstico de infecção natural por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
3.2.2.4 Técnica de Strout modificada com uso de tubo capilar (micro-hematócrito) .....	19
3.2.2.5 Hemocultura .....	20
3.2.3 Contaminação experimental de <i>D. albiventris</i> por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	20
3.2.4 Contaminação experimental <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
3.2.5 Contaminação experimental <i>in vivo</i> da cana-de-açúcar por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	30
4 PUBLICAÇÕES .....	33
4.1 Artigo 1 – Os gambás ( <i>Didelphis sp</i> ) e a cana-de-açúcar ( <i>Saccharum spp</i> ) na possível transmissão oral da doença de Chagas: revisão sistemática da literatura .....	33
4.2 Artigo 2 – Experimental contamination of sugarcane ( <i>Saccharum spp</i> ) by <i>Trypanosoma cruzi</i> through direct contact with <i>Didelphis sp</i> perianal secretion .....	33
Os gambás ( <i>Didelphis sp</i> ) e a cana-de-açúcar ( <i>Saccharum spp</i> ) na possível transmissão oral da doença de Chagas: revisão sistemática da literatura .....	34
Abstract .....	34
Introdução .....	35
Método .....	36
Tipo de estudo .....	36
Local .....	36
Fontes de dados e seleção dos descritores .....	36

<b>Critérios de inclusão e exclusão, estratégia de busca e metodologia de pesquisa</b> .....	38
<b>Resultados e discussão</b> .....	38
<b>Conclusão</b> .....	45
<b>Resumo</b> .....	45
<b>Colaboradores</b> .....	46
<b>Referências</b> .....	46
<b>Experimental contamination of sugarcane (<i>Saccharum</i> spp) by <i>Trypanosoma cruzi</i> through direct contact with <i>Didelphis</i> sp perianal secretion</b> .....	48
<b>ABSTRACT</b> .....	49
<b>1. Introduction</b> .....	49
<b>2. Materials and methods</b> .....	51
<b>2.1. Area of study</b> .....	51
<b>2.2. <i>Didelphis</i> sp obtention and analysis of natural infection by <i>T. cruzi</i> ...</b>	51
<b>2.3. Experimental infection of <i>D. albiventris</i> by <i>T. cruzi</i></b> .....	52
<b>2.4. Experimental in vitro contamination of sugarcane by <i>T. cruzi</i></b> .....	53
<b>2.5. Experimental infection of mice by <i>T. cruzi</i></b> .....	53
<b>2.6. Experimental in vivo contamination of sugarcane by <i>T. cruzi</i></b> .....	54
<b>2.7. Histological analysis of sugarcane</b> .....	54
<b>3. Results</b> .....	55
<b>3.1 Parasitological diagnosis of <i>Didelphis albiventris</i></b> .....	55
<b>3.2 Analysis of sugarcane contamination by <i>T. cruzi</i></b> .....	55
<b>3.3 Microscopic analysis of histological sections</b> .....	57
<b>4. Discussion</b> .....	57
<b>Acknowledgements</b> .....	59
<b>References</b> .....	59
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	62
<b>5.1 Conclusões</b> .....	62
<b>5.2 Sugestões e recomendações</b> .....	62
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
<b>APÊNDICE</b> .....	74
<b>Apêndice 1 – Parecer do Comitê de Ética</b> .....	74

<b>ANEXOS .....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo 1 – Normas de publicação do periódico Cadernos de Saúde Pública .....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo 2 – Normas de publicação do periódico Acta Tropica .....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

---

<b>ir</b>	- aproximadamente
<b>cm</b>	- centímetro
<b>CETAS</b>	- Centro de Tratamento de Animais Silvestres
<b>[ ]</b>	- concentração
<b><i>D. albiventris</i></b>	- <i>Didelphis albiventris</i>
<b><i>D. marsupialis</i></b>	- <i>Didelphis marsupialis</i>
<b><i>D. virginiana</i></b>	- <i>Didelphis virginiana</i>
<b>DD</b>	- <i>Didelphis</i> sp
<b>DCA</b>	- doença de Chagas aguda
<b>sp</b>	- espécie
<b>spp</b>	- espécies
<b>f/g</b>	- formas por grama de peso
<b>f/ml</b>	- formas por mililitro
<b>GO</b>	- Goiás
<b>°C</b>	- graus Celsius
<b>IBAMA</b>	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e aos Recursos Naturais Renováveis
<b>ICB</b>	- Instituto de Ciências Biológicas
<b>IPTSP</b>	- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
<b>km</b>	- quilômetro
<b>LIT</b>	- <i>liver infusion tryptose</i>
<b>µg</b>	- micrograma
<b>µL</b>	- microlitro
<b>mL</b>	- mililitro

<b>NUPEREME</b>	- Núcleo de Pesquisa em Parasitas Emergentes e Re-emergentes
<b>PVC</b>	- cloreto de polivinila
<b>%</b>	- porcentagem
<b>PCR</b>	- reação em cadeia da polimerase
<b>SC</b>	- <i>Saccharum</i> spp
<b><i>T. cruzi</i></b>	- <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TC</b>	- <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>v/v</b>	- volume por volume

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Estratégia da revisão sistemática da literatura. ....	12
<b>Figura 2</b>	Delineamento do estudo. ....	14
<b>Figura 3</b>	Representação da metodologia empregada para obtenção de secreção das glândulas perianais de gambás contaminados com <i>T. cruzi</i> . ....	17
<b>Figura 4</b>	Coleta de sangue através de punção da veia caudal dos gambás. ....	18
<b>Figura 5</b>	Coleta de secreção glandular através de punção das glândulas perianais dos gambás. ....	18
<b>Figura 6</b>	Análise microscópica de tubo capilar (micro-hematócrito) após centrifugação. ....	19
<b>Figura 7</b>	Processamento das amostras de sangue e secreção em câmara de fluxo para cultura em meio LIT. ....	21
<b>Figura 8</b>	Inoculação intraperitoneal de suspensão de <i>T. cruzi</i> nos gambás. ....	22
<b>Figura 9</b>	Fragmentos de cana-de-açúcar preparados para contaminação experimental por <i>T. cruzi</i> . ....	23
<b>Figura 10</b>	Representação da metodologia empregada para avaliar a contaminação da cana-de-açúcar por <i>T. cruzi</i> . ....	24
<b>Figura 11</b>	Contaminação da cana-de-açúcar por inoculação direta de suspensão de <i>T. cruzi</i> em sua extremidade. ....	25
<b>Figura 12</b>	Contaminação de cana-de-açúcar por inoculação direta de suspensão de <i>T. cruzi</i> em sua superfície. ....	25
<b>Figura 13</b>	Moedor manual utilizado para extair o caldo dos fragmentos de cana-de-açúcar após inoculação com as cepas Y e P12 silvestre de <i>T. cruzi</i> . ....	26
<b>Figura 14</b>	Manuseio dos camundongos e higienização das gaiolas. ....	27
<b>Figura 15</b>	Manutenção dos camundongos no biotério de experimentação. ...	27
<b>Figura 16</b>	Inoculação intraperitoneal de caldo de cana contaminado por <i>T. cruzi</i> em camundongos. ....	28
<b>Figura 17</b>	Fragmentos de cana-de-açúcar preparados para contaminação por suspensão de <i>T. cruzi</i> . A: cepa Y; B: cepa P12 silvestre. ....	29

<b>Figura 18</b>	Inoculação direta de suspensão de <i>T. cruzi</i> na extremidade (corte transversal) e na superfície (sobre a casca) da cana-de-açúcar. ..	29
<b>Figura 19</b>	A: Cortes à mão livre de secções da cana-de-açúcar em estudo; B: Lâminas histológicas. ....	30
<b>Figura 20</b>	Inoculação direta de suspensão de <i>T. cruzi</i> sobre as raízes da cana-de-açúcar in vivo. ....	31
<b>Figura 21</b>	Coleta de amostras de raízes, bainha, colmo e folhas de cana-de-açúcar contaminada in vivo com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> para a confecção de cortes histológicos. ....	31
<b>Figura 22</b>	Confecção de cortes histológicos de amostras de cana-de-açúcar contaminada in vivo com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> . ....	32
<b>Artigo 1 – Os gambás (<i>Didelphis sp</i>) e a cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp</i>) na possível transmissão oral da doença de Chagas: revisão sistemática da literatura</b>		
<b>Figura 1</b>	Fluxograma da estratégia da revisão sistemática. ....	37
<b>Figura 2</b>	Distribuição dos artigos selecionados para compor a presente revisão sistemática da literatura de acordo com a base de dados em que foram localizados. ....	42
<b>Artigo 2 – Experimental contamination of sugarcane (<i>Saccharum spp</i>) by <i>Trypanosoma cruzi</i> through direct contact with <i>Didelphis sp</i> perianal secretion</b>		
<b>Figure 1</b>	Frequency of infection in mice contaminated with juice obtained from sugarcane directly inoculated on the tip with Y and sylvatic P12 strains of <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	56
<b>Figure 2</b>	Hand-cut sections of sugarcane: A) Stalk – transverse section; B) Stalk – longitudinal section; C) Sheath – transverse section; D) Root – transverse section. ....	57

## LISTA DE TABELAS

---

### **Artigo 1 – Os gambás (*Didelphis* sp) e a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) na possível transmissão oral da doença de Chagas: revisão sistemática da literatura**

<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos artigos encontrados de acordo com a base de dados em que foram localizados utilizando os descritores preestabelecidos. ....	39
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos artigos encontrados de acordo com a base de dados em que foram localizados contendo no mínimo dois descritores preestabelecidos associados. ....	39
<b>Tabela 3</b>	Distribuição dos artigos encontrados em mais de uma base de dados, daqueles excluídos da pesquisa em decorrência da repetição e dos selecionados para prosseguir nesta revisão sistemática após eliminação das repetições. ....	39
<b>Tabela 4</b>	Relação dos artigos selecionados para compor a presente revisão sistemática de literatura. ....	42

### **Artigo 2 – Experimental contamination of sugarcane (*Saccharum* spp) by *Trypanosoma cruzi* through direct contact with *Didelphis* sp perianal secretion**

<b>Table 1</b>	Mice infected with juice obtained from sugarcane directly inoculated on the tip with Y and sylvatic P12 strains of <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	55
----------------	--	----



## RESUMO

---

**Introdução:** A transmissão oral da doença de Chagas destaca-se na atualidade pela ocorrência de surtos da doença por ingestão de alimentos como caldo de cana, não se descartando a possibilidade de contaminação através de reservatórios silvestres do *Trypanosoma cruzi*, como os gambás. **Objetivos:** a) Fazer uma revisão sistemática da literatura abordando a temática da contaminação da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) e/ou *Didelphis* sp por *T. cruzi*; b) Verificar a transmissão de cepas de *T. cruzi* provenientes das glândulas perianais de *D. albiventris* por contaminação direta da cana-de-açúcar; c) Buscar elucidar o potencial de penetração de *T. cruzi* nos tecidos do colmo da cana-de-açúcar; d) Avaliar a possível penetração de *T. cruzi* através das raízes da cana-de-açúcar inoculada *in vivo* com este protozoário.

**Metodologia:** Estudo realizado em duas etapas: 1) Revisão sistemática da literatura utilizando artigos científicos que abordam a temática da contaminação da cana-de-açúcar e/ou *Didelphis* sp por *T. cruzi*, pesquisando nas bases de dados Biblioteca Cochrane, LILACS, MEDLINE e SciELO, utilizando como descritores *T. cruzi*, *Didelphis* sp e *Saccharum* spp. Participaram da revisão artigos publicados no continente americano no período de 1909 até outubro de 2008 que apresentaram ao menos dois descritores associados; 2) Avaliação experimental da contaminação da cana-de-açúcar por *T. cruzi*, em que gambás foram infectados experimentalmente por inoculação intraperitoneal de suspensão deste protozoário e avaliados por micro-hematócrito, cultura em meio LIT (*liver infusion tryptose*) e PCR. Fragmentos de cana-de-açúcar foram contaminados por inoculação direta de suspensão de *T. cruzi* proveniente das glândulas perianais desses marsupiais. O caldo de cana foi extraído em diferentes intervalos, com o uso de um moedor manual, e avaliado por exame direto e inoculação em camundongos. Também foram realizados cortes histológicos da cana-de-açúcar contaminada *in vitro* e *in vivo* e analisados por microscopia óptica. **Resultados:** Mediante leitura e discussão dos artigos, observou-se a importância dos gambás e da cana-de-açúcar na transmissão da doença de Chagas. Porém, ao final da análise constatou-se que apenas um estudo tinha maior relação com os objetivos da pesquisa. Nas condições metodológicas empregadas, o estudo mostrou a contaminação da cana-de-açúcar por meio da infecção de camundongos

em até 6 h após a inoculação da cepa Y de *T. cruzi* e em até 4 h com a cepa P12 silvestre. Isso mostrou que a planta se contaminou quando inoculada na extremidade, mas não quando inoculada na superfície. Entretanto, não foi possível observar o potencial de penetração do *T. cruzi* na cana-de-açúcar ou a contaminação por via radicular com o método utilizado, não tendo sido visualizados esses protozoários por microscopia óptica nas lâminas confeccionadas. **Conclusão:** A revisão sistemática da literatura mostrou a carência de estudos a esse respeito. Os resultados do estudo experimental são inéditos e permitiram concluir que a transmissão de *T. cruzi* por cana-de-açúcar contaminada com secreção das glândulas perianais de gambás é possível. Sugere-se o emprego de outros métodos para avaliar a penetração de *T. cruzi* em cana-de-açúcar, bem como para a sua contaminação via radicular.

**Descritores:** Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; *Didelphis albiventris*; cana-de-açúcar.

## ABSTRACT

---

### **Experimental assessment and systematic literature review of *Trypanosoma cruzi* transmission by contaminated sugarcane**

**Introduction:** The oral transmission of Chagas disease has been calling the attention in the last few years, especially because of the occurrence of outbreaks due to the ingestion of food such as sugar cane juice, with the possibility of contamination by sylvatic reservoirs of *Trypanosoma cruzi*, such as *Didelphis* sp. **Objectives:** a) Perform a systematic literature review on sugarcane (*Saccharum* spp) and/or *Didelphis* sp contamination by *T. cruzi*; b) Verify the transmission of *T. cruzi* strains collected from the secretion of the perianal glands of *D. albiventris* by direct contamination of sugarcane; c) Try to elucidate *T. cruzi* potential of penetration in sugarcane stalks; d) Assess possible penetration of *T. cruzi* through sugarcane roots by examining histological sections of stalks inoculated *in vivo* with this protozoan.

**Methodology:** The study was carried out in two phases: 1) Systematic review of the literature using scientific articles that address the contamination of sugarcane and/or *Didelphis* sp by *T. cruzi*, searching for information in Cochrane Library, LILACS, MEDLINE and SciELO, using as descriptors *T. cruzi*, *Didelphis* sp, and *Saccharum* spp. We included in this review the articles published in the American continent from 1909 to October 2008 that presented at least two descriptors associated; 2) Experimental assessment of sugarcane contamination by *T. cruzi*, in which opossums were experimentally infected by intraperitoneal inoculation with a suspension containing this protozoan and assessed by microhaematocrit technique, culture in LIT (*liver infusion tryptose*) medium, and PCR. Fragments of sugarcane were contaminated by direct inoculation of *T. cruzi* suspension collected from the perianal glands of these marsupials. Sugarcane juice was extracted at different intervals, using a manual grinder, and assessed by direct examination and inoculation of mice. Also, histological sections of sugarcane contaminated *in vitro* and *in vivo* were performed and analyzed using an optical microscope. **Results:** After reading and discussing the articles selected, we confirmed the importance of opossums and sugarcane in the transmission of Chagas disease. Nevertheless, only one study approaches directly the object of this research since the others describe experimental contamination of *Didelphis* sp with different strains of *T. cruzi*. Given the

methods employed herein, this study showed the contamination of sugarcane through the infection of mice up to 6 h after inoculation with strain Y of *T. cruzi* and up to 4 h with sylvatic P12. This showed plant contamination when inoculated in the tips but not on the surface. However, it was not possible to observe the potential of *T. cruzi* penetration in sugarcane or the contamination through its roots with the method used during this study, and no protozoan were visualized using an optical microscope. **Conclusion:** A systematic review of the literature showed the lack of studies on this theme. To the best of our knowledge, this is a pioneer relevant study and lead to the conclusion that the transmission of *T. cruzi* by sugarcane contaminated wit secretion of the perianal glands of opossums is possible. We suggest the use of other methods for evaluating *T. cruzi* penetration in sugarcane, and the contamination of this plant through the roots.

**Descriptors:** Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; *Didelphis albiventris*; sugarcane.

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanosomíase americana, é classificada como uma antroponose bastante comum no continente americano. Estende-se do sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile, tendo grande incidência no Brasil. Esta patologia tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), um parasito de mamíferos que tem como hospedeiros intermediários numerosas espécies de hemípteros invertebrados da família Reduviidae, popularmente denominados “barbeiros” no Brasil, os quais transmitem a doença para o homem através de fezes e urina contaminados com o protozoário no momento do repasto sanguíneo (DIAS, 2001; REY, 2001). Esta doença afeta cerca de 12 a 14 milhões de pessoas na América Latina, região em que mais de 60 milhões de indivíduos vivem sob condições de risco de transmissão (DIAS, 2007).

A doença humana é caracterizada por duas fases distintas: a aguda e a crônica. Na primeira, com intensidade e duração de 60 dias, ocorre intensa febre, mal-estar, astenia, presença de sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e chagoma de inoculação), edema, esplenomegalia e hepatomegalia; porém, a grande maioria dos indivíduos não apresenta nenhuma sintomatologia. Na passagem para a fase crônica podem estar envolvidos fenômenos de imunomodulação, como declínio acentuado da parasitemia e redução progressiva dos fenômenos inflamatórios. Em geral, a fase crônica inicia-se com a forma indeterminada, também denominada latente ou subclínica, em que eletrocardiograma, raio-X de tórax, cólon e esôfago apresentam-se normais. Aproximadamente 20–25% dos indivíduos infectados evoluem para cardiopatia chagásica crônica, apresentando progressivo dano cardíaco resultante da destruição de cardiomiócitos e do sistema condutor, enquanto 5–10% são acometidos por síndromes digestivas, destacando-se a esofagopatia e a colopatia (CUNHA-NETO et al., 1995).

## 1.2 *Trypanosoma cruzi*: características bioquímicas, biológicas e físico-químicas

*T. cruzi* apresenta ciclo de vida complexo por ter diferentes formas evolutivas: a) tripomastigotas – formas infectantes do parasito que se localizam na corrente sanguínea do vertebrado, bem como nas porções distais do tubo digestivo do inseto vetor; b) epimastigotas – estágio de reprodução do parasito no inseto vetor ou em meios de cultura; c) amastigotas – formas que correspondem aos estágios de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (DIAS, 2001; REY, 2001).

É um parasito isotônico com o meio interno de mamíferos e triatomíneos vetores, sobrevivendo bem em temperaturas entre 24°C e 28°C em insetos e culturas artificiais, e entre 36°C a 37°C em mamíferos agudos ou crônicos (ALVARENGA; MARSDEN, 1975; DVORAK, 1976; GONZÁLES; DURANTE, 1994; GUTTERIDGE, 1976). Desse modo, o cozimento superficial de alimentos pode ensejar a transmissão do protozoário, enquanto procedimentos como a pasteurização seguramente a previnem (AMATO NETO; LEONHARDT; SOUZA, 1960; AMATO NETO; SANTOS; GIOIA, 1975; STORINO; JÖRG, 1994).

Em plasma congelado, *T. cruzi* permanece viável por 3 h a 24 h (AMATO NETO et al., 1996); em sangue humano conservado a 4°C, sobrevive bem e tem capacidade infectante por uma a duas semanas, diminuindo sensivelmente sua viabilidade na terceira semana, especialmente do 18º dia em diante (CERISOLA et al., 1972); e sob ultracongelamento a -70°C, conserva-se muito bem durante anos (BRENER, 1979; GUTTERIDGE, 1976).

Por outro lado, o parasito é sensível a diversos agentes químicos presentes ou adicionados ao seu meio ambiente, como o etanol, o hipoclorito de sódio a 1% (por 1 h), a violeta de genciana (1:4.000, por 24 h), o psoraleno, entre outros, podendo essas substâncias ser empregadas para eventuais propósitos de desinfecção preventiva (DÍAZ-UNGRÍA, 1968). Em termos de sua nutrição, o parasito tem facilidade de sobreviver em sangue ou meios pobres de nutrientes por pelo menos duas semanas (CERISOLA et al., 1972), desde que não haja dessecação ou agressões químicas e que a temperatura não ultrapasse a faixa dos 40°C.

O parasito retira do meio o provimento de glicose, frutose ou outros açúcares superiores, metabolizados por via glicolítica ou das pentoses. Seu metabolismo energético é processado por via oxidativa e por via anaeróbica, havendo grande consumo de oxigênio pelos tripomastigotas sanguíneos a 37°C, diminuindo em temperaturas menores e nas formas amastigotas (GUTTERIDGE, 1976).

### **1.3 Ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi***

Do ponto de vista epidemiológico, podem ser distinguidos: um ciclo de transmissão silvestre, um parodoméstico e um doméstico, este último relacionado mais estritamente com a endemia humana (REY, 2001).

#### **1.3.1 Ciclo silvestre**

O ciclo silvestre do *T. cruzi* é de natureza enzoótica, com circulação do protozoário entre vetores e reservatórios silvestres. Os ecótopos primitivos de *T. cruzi* são os mais diversos, podendo ser encontrados nos desertos norte-americanos, nos altiplanos andinos, nas florestas Amazônica e Atlântica e no complexo caatinga-cerrado-pampa úmido. Esse ciclo privilegia ambientes ecológicamente “fechados” ou “semi-abertos”, variando as proporções de vetores e hospedeiros segundo uma série enorme de fatores, como clima, altitude, umidade, características faunoflorísticas e disponibilidade alimentar. Nesse contexto, o parasita se alberga em mamíferos silvestres de pequeno e médio porte e em insetos vetores da ordem Hemiptera. Entre os mais diversos ecótopos, prevalecem aqueles naturais, nos quais os vetores podem formar suas colônias, como palmeiras, cascas de árvores e ninhos de animais silvestres (pássaros, roedores, marsupiais, quirópteros). Esse ciclo se caracteriza por um estado de equilíbrio desenvolvido por meio de longa adaptação, em que há pouca ou nenhuma ação patogênica do flagelado sobre seus hospedeiros naturais (DIAS, 2001; REY, 2001).

### 1.3.2 Ciclo paradoméstico

No ciclo paradoméstico, os animais parasitados que vivem perto de áreas residenciais mantêm focos epizooticos, como o que acontece com ratos que vivem nas casas, sendo também possível encontrar triatomíneos e reservatórios silvestres, como os gambás, que se aproximam das residências atraídos por galinheiros, alimentos ou até mesmo abrigo nos forros das casas. Nesse ecótopo circula o *T. cruzi* que pode, eventualmente, contaminar animais domésticos e o próprio homem (REY, 2001).

### 1.3.3 Ciclo doméstico

No ciclo doméstico, os animais domésticos e o homem constituem a fonte de infecção; já os triatomíneos constituem os vetores do protozoário, sendo encontrados em casas de barro cru com paredes fendilhadas, hábitat extremamente favorável ao seu desenvolvimento e multiplicação, em que parte considerável das populações latino-americanas reside. O ciclo doméstico comporta uma intensa circulação de parasitas, visto que, uma vez estabelecido, não mais depende dos ciclos silvestre e paradoméstico, ainda que as comunicações entre eles não estejam fechadas (DIAS, 2000; REY, 2001).

Nas regiões onde os triatomíneos se domicíliam, como é o caso dos locais em que prevalece *Triatoma infestans*, a função dos animais silvestres é praticamente nula no ciclo doméstico, pois, com exceção dos gambás, as outras espécies jamais se aproximam das casas. Nos locais onde predominam triatomíneos com hábitos semidomésticos, como *T. brasiliensis*, a passagem de *T. cruzi* de um ciclo a outro é mais provável (REY, 2001).

## 1.4 Reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi*

Os primeiros hospedeiros conhecidos de *T. cruzi*, além do homem, foram o tatu, o cão e o gato, estudados por Chagas em 1909. Atualmente, cerca de 200 espécies de mamíferos, pertencentes às ordens Didelphimorphia, Edentata,



Chiroptera, Rodentia, Primates, Lagomorpha e Carnivora, são reconhecidas como reservatórios deste protozoário e todas as espécies de mamíferos são teoricamente consideradas reservatórios potenciais (BARRETTO, 1979; GRISARD et al., 2000).

Existem inúmeros trabalhos sobre infecção natural de mamíferos por *T. cruzi* em diversas regiões do Brasil (BARRETTO, 1979; MELLO, 1981; FERNANDES et al., 1989; DIOTAIUTI et al., 1995; FERNANDES et al., 1999; GRISARD et al., 2000; PINHO et al., 2000; RAMIREZ et al., 2002) e em outros países da América Latina, como México (SOLIS-FRANCO; ROMO-ZAPATA; MARTINEZ-IBARRA, 1997; RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES 2002), Argentina (WISNIVESKY-COLLI et al., 1992; BAR et al., 1999), Venezuela (URDANETA-MORALES; NIRONI, 1996) e Guiana Francesa (DEDET et al., 1985). Além de listar as espécies com infecção natural para *T. cruzi*, esses trabalhos também estabelecem a importância delas para a manutenção do ciclo silvestre do parasita.

Entre os reservatórios silvestres, o gambá (Didelphimorphia: Didelphidae) é um dos mais frequentes. Nas Américas, existem quatro espécies de gambás: *Didelphis albiventris*, *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana* e *Didelphis aurita* (EMMONS; FEER, 1990), sendo a primeira muito comum no Brasil Central, presente em várias fitofisionomias do bioma Cerrado, principalmente nas matas de galeria, além de estar presente na caatinga brasileira e em outros países da América do Sul (ALHO et al., 1986).

Em Goiás, a espécie encontrada com maior frequência é *D. albiventris* e, eventualmente, *D. marsupialis* (OLIVEIRA, 2008). Em decorrência da escassez de seus predadores naturais (gaviões, canídeos e felinos silvestres e outros carnívoros de grande porte) na região, os gambás estão se tornando uma espécie de “praga”. A alta taxa de natalidade e de sobrevivência dos filhotes, e o fato de serem predadores e competidores de várias outras espécies de pequenos animais, acabam por fazê-los dominar a área e eliminar as outras espécies silvestres, ainda remanescentes, diminuindo a biodiversidade da região, podendo, assim, levar a um desequilíbrio ambiental (MELLO, 1981).

Os índices de infecção natural de gambás são altos, geralmente superiores a 20% (BARRETTO, 1979), o que reforça a importância desta espécie na manutenção de focos silvestres e na disseminação de *T. cruzi*, considerando-se que são animais sinantrópicos, que frequentemente invadem o ambiente peridomiciliar e até mesmo o

domicílio. Com relação aos roedores, várias espécies já foram encontradas infectadas por *T. cruzi* nas Américas, tendo sido registradas 22 no Brasil. Entretanto, diferentemente dos marsupiais, os roedores parecem contribuir pouco para a manutenção dos ciclos silvestres de *T. cruzi* (MELLO, 1981).

Para comprovar a importância de *Didelphis* sp na epidemiologia da doença de Chagas, Deane, Lenzi e Jansen (1984) conduziram estudos e concluíram que as glândulas anais dos gambás funcionam como reservatório de onde o parasito pode se disseminar para os tecidos e a circulação sanguínea do hospedeiro, o qual, por sua vez, infecta o inseto hematófago que se alimenta de seu sangue contaminado; além disso, podem funcionar como forma bastante eficiente de proteção contra a resposta imune do hospedeiro infectado, mostrando relação entre *T. cruzi* e os gambás (hospedeiros vertebrados), o que os torna disseminadores em potencial da patologia de Chagas.

### **1.5 Vias de transmissão de *Trypanosoma cruzi***

A transmissão natural ou primária da doença de Chagas é a vetorial, que se dá durante o repasto sanguíneo de triatomíneos hematófagos (barbeiros), podendo ocorrer também por vias chamadas alternativas: transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais, via transplacentária e via oral (DIAS, 1992; GARCIA-ZAPATA et al., 1986).

No Brasil e em outros países latinoamericanos, a transmissão de *T. cruzi* para seres humanos por meio de triatomíneos vem se tornando menos expressiva e, inclusive, já foram certificadas as interrupções deste tipo de transmissão do parasito (SILVEIRA et al., 2002). Como decorrência de tal situação, as conhecidas formas de infecção rotuladas como alternativas passaram a merecer maior atenção, porquanto os atingidos pela protozoose continuam podendo causar novos comprometimentos capazes de prejudicar o pleno êxito de medidas preventivas adotadas até o momento (RASSI et al., 2004).

## 1.6 Transmissão oral de *Trypanosoma cruzi*

A transmissão oral ocorre por ingestão de alimentos contaminados pelo parasito, sendo comum entre mamíferos do ciclo silvestre da tripanossomíase que ingerem triatomíneos ou outros mamíferos infectados. Entre humanos, este tipo de transmissão acontece de forma esporádica e circunstancial, pela ingestão de diferentes tipos de alimentos contaminados pelo parasito, tais como caldo de cana, açaí, sopas, comida caseira, leite e carne de caça semicruda, geralmente encontrando-se vetores ou reservatórios infectados nas imediações da área de produção, manuseio ou utilização dos alimentos. *T. cruzi* pode permanecer viável em alimentos por algumas horas ou dias, dependendo de temperatura, umidade e dessecação (DIAS, 2000; GARCIA-ZAPATA et al., 1986).

A penetração do parasito, em todos os casos de transmissão oral, pode ocorrer pela mucosa oral íntegra ou lesada (BRASIL, 2005; DIAS, 2000; LANA; TAFURI, 2005). Acreditava-se que, após a deglutição do protozoário, havia algum obstáculo para a transmissão oral da tripanossomíase americana, certamente por haver destruição de inúmeras formas infectantes quando estas são expostas ao meio ácido do suco gástrico. Entretanto, em vários experimentos, entre os quais foram testados leite ou sangue contaminados e a ingestão de triatomíneos e reservatórios contaminados por animais suscetíveis, mostraram que a transmissão oral se faz possível pela penetração dos parasitos através da mucosa do esôfago, do estômago e das porções iniciais do intestino delgado (DIAS, 2006).

Um estudo experimental realizado por Comandaroba, Pinheiro e Andrade (2002) comprovou que o parasito sobrevive ao suco gástrico e infecta camundongos, causando lesões idênticas às observadas em animais infectados por via intraperitoneal.

A transmissão oral da doença de Chagas tem sido registrada no Brasil desde o ano de 1968 (DIAS, 2000; LANA; TAFURI, 2005; SILVA et al., 1968). No entanto, ganhou maior enfoque nos últimos anos, em virtude de um surto da doença detectado no município de Navegantes, estado de Santa Catarina, cuja transmissão relacionou-se ao consumo de caldo de cana em um ponto de venda nas margens da BR 101 no dia 13 de fevereiro de 2005 (BRASIL, 2005).

Episódios epidêmicos tendo como fator causal comum a ingestão de produtos contaminados vêm sendo registrados desde 1968, quando em uma comunidade agrícola de Teotônia, estado do Rio Grande do Sul, acreditando-se que a transmissão tenha ocorrido pelo consumo de verduras servidas no refeitório da comunidade, contaminadas na horta por secreções de glândulas perianais de gambás (SILVA et al., 1968). Anos depois, em meados dos anos 80, em Catolé do Rocha, estado da Paraíba, descobriu-se que convidados de um casamento foram contaminados ao tomar caldo de cana. Durante a festa, a máquina de moer cana ficou sob uma cobertura de palha em que foram detectados triatomíneos. A hipótese é que os insetos tenham caído na máquina de moer cana, sendo também triturados e ingeridos junto com a bebida (MARCONDES, 1988; YASUDA, 1987).

A partir da década de 1990, vários pequenos surtos de doença de Chagas foram registrados na Amazônia, também atribuídos à transmissão oral, tendo famílias inteiras desenvolvido a doença sem que existissem barbeiros em suas casas. A explicação mais plausível recaiu sobre o equipamento usado para fazer suco de açaí, que normalmente fica fora das casas, e que possivelmente atraiu os barbeiros, os quais foram, então, triturados junto com os frutos (PINTO et al., 2001; VALENTE; VALENTE; FRAIHA NETO, 1999).

Em janeiro de 2005, foi registrado um surto intrafamiliar ocorrido no bairro Alto do Cassiano, no município de Redenção, a 60 km de Fortaleza, estado do Ceará (ESTADO DO CEARÁ, 2006). Houve relato de consumo de alimento suspeito, pois todas as pessoas que participaram dessa refeição adoeceram aproximadamente uma semana após a ingestão.

Em dezembro de 2004, no Igarapé do Fortaleza, município de Santana, estado do Amapá, ocorreu um surto de doença febril aguda, o qual se acredita que esteja relacionado à contaminação por via oral, vez que várias famílias adoeceram depois de consumir suco de açaí adquirido em um mesmo local. Em junho de 2006, registrou-se outro surto de doença de Chagas aguda (DCA) com provável forma de infecção por via oral, em decorrência da ingestão de suco de bacaba, possivelmente contaminado durante sua produção artesanal, em um único local na zona rural de Mojuí dos Campos, município de Santarém, estado do Pará (BRASIL, 2006).

Entre janeiro de 2005 e agosto de 2007, houve notificação de 22 surtos de DCA em vários estados brasileiros. Na maioria dos eventos, comprovou-se

associação da ocorrência de casos com consumo de alimentos *in natura*, como caldo de cana (Santa Catarina, 2005 e Bahia, 2006), bacaba (Igarapé do Fortaleza, Maranhão e Pará, 2006), sopa (bairro Alto do Cassiano, Redenção, estado do Ceará) e açai (Pará, 2006 e 2007, Amazonas, 2007), com registro de 170 casos e 10 óbitos (letalidade de 6,5%) (YASUDA, 1987).

Considerando a ocorrência de vários surtos de contaminação oral da doença de Chagas, em especial os que envolvem cana-de-açúcar e/ou gambás, disseminadores em potencial de *T. cruzi*, além da grande ocorrência destes marsupiais no Brasil, realizou-se uma revisão sistemática da literatura e avaliou-se experimentalmente a transmissão de *T. cruzi* pela contaminação de caldo de cana por secreções das glândulas perianais de *D. albiventris*.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo geral

Avaliação experimental e revisão sistemática da transmissão de *T. cruzi* através de cana-de-açúcar contaminada.

### 2.2 Objetivos específicos

a) Fazer uma revisão sistemática da literatura abordando a temática da contaminação da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) e/ou *Didelphis* sp por *T. cruzi*;

b) Verificar a transmissão de cepas de *T. cruzi* provenientes das glândulas perianais de *D. albiventris* por contaminação direta da cana-de-açúcar;

c) Buscar elucidar o potencial de penetração de *T. cruzi* nos tecidos do colmo da cana-de-açúcar;

d) Avaliar a possível penetração de *T. cruzi* através das raízes da cana-de-açúcar inoculada *in vivo* com este protozoário.

## 3 METODOLOGIA

---

O presente estudo segue a modalidade de manuscritos, tendo sido elaborado em duas etapas: a) revisão sistemática da literatura abordando a temática da contaminação da cana-de-açúcar e/ou *Didelphis* sp por *T. cruzi*; b) estudo experimental da transmissão de *T. cruzi* através de cana-de-açúcar contaminada.

### 3.1 Revisão sistemática

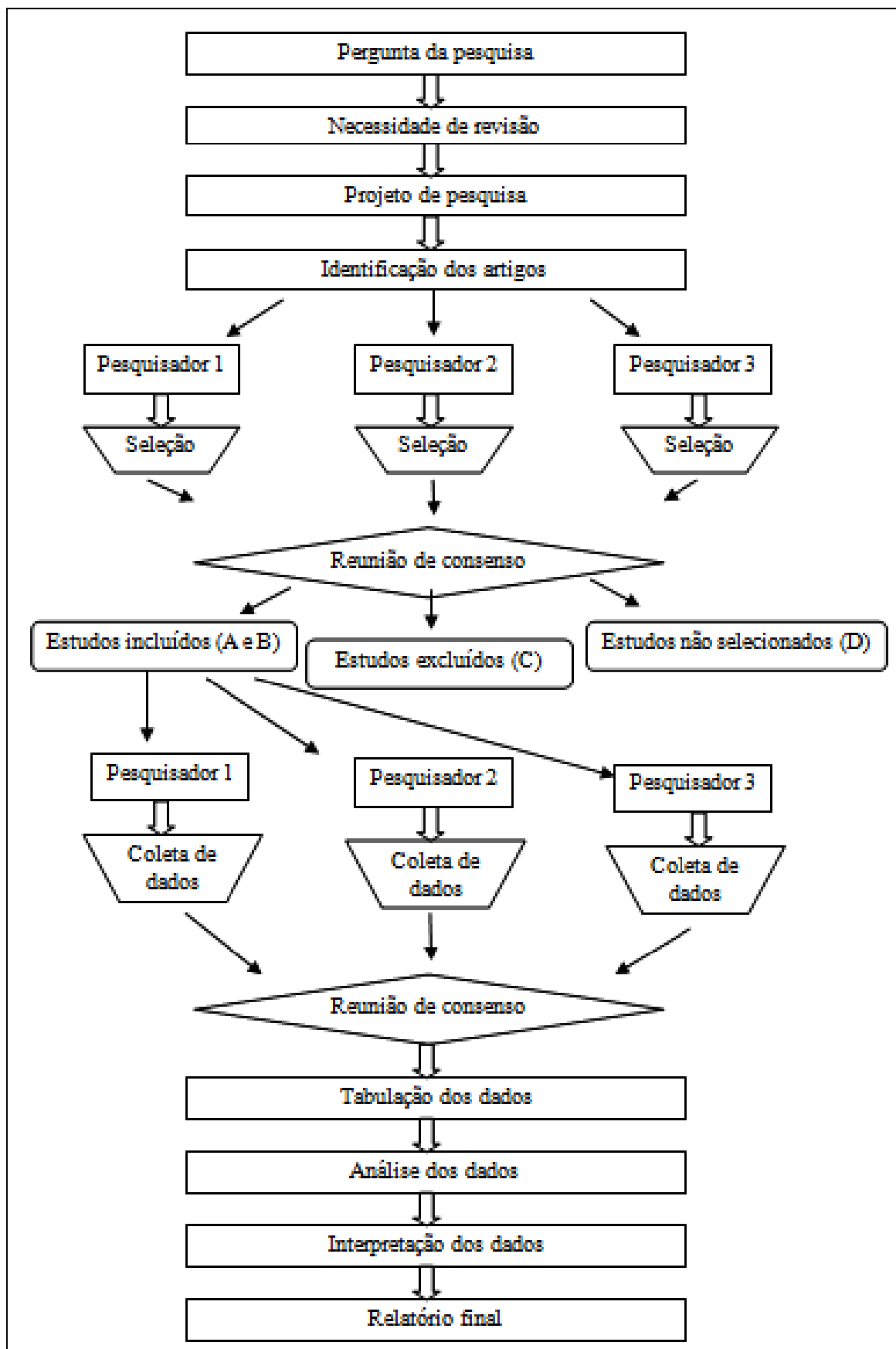
#### 3.1.1 Tipo de estudo

Classifica-se o presente estudo como revisão sistemática da literatura do tipo descritivo simples com base em fontes de dados documentais.

A revisão sistemática é uma forma de pesquisa que emprega como fonte de dados a literatura acerca de um tema, utilizando métodos sistematizados para elaborar uma síntese das evidências relacionadas a uma estratégia específica (Figura 1).

#### 3.1.2 Local

Este estudo foi realizado no período de outubro a novembro de 2008, em Goiânia, estado de Goiás, nas salas de informática do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, nas quais foi feita a coleta de dados por via eletrônica no dia 13 de outubro de 2008. A análise, interpretação e discussão dos dados foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Parasitas Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.



**Figura 1** – Estratégia da revisão sistemática da literatura.



### 3.1.3 Amostra

#### 3.1.3.1 Fontes de dados e seleção dos descritores

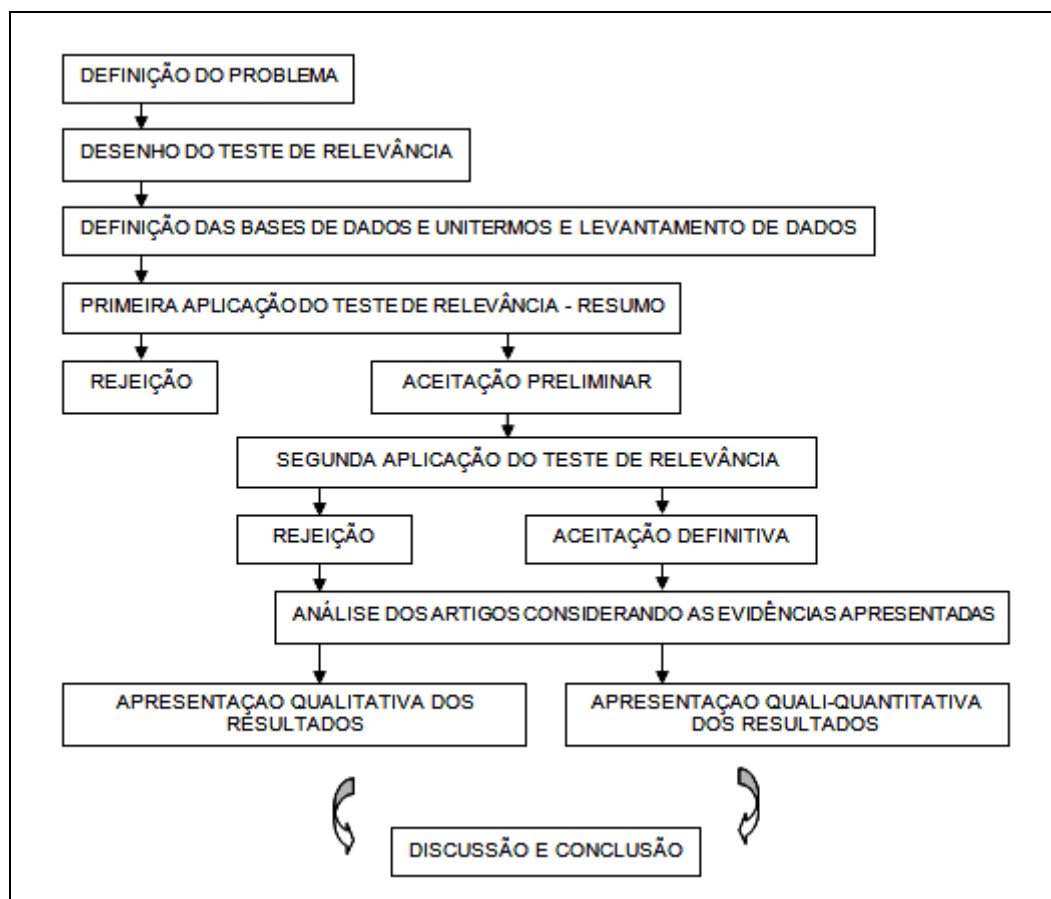
A busca de dados foi mediada por três pesquisadores, que optaram por localizar informações prioritariamente na Biblioteca Virtual em Saúde utilizando as seguintes bases de dados: Biblioteca Cochrane, LILACS, MEDLINE e SciELO. Após consenso, em 13 de outubro de 2008, os pesquisadores escolheram os descritores (*Trypanosoma cruzi* – TC; *Didelphis* sp – DD; *Saccharum* spp – SC) e analisaram sua existência e validade pesquisando-os separadamente por meio do DeCS - Terminologia em saúde e, em seguida, associando-os entre si, o que resultou em um vasto volume de informações (BIREME, 2008).

#### 3.1.3.2 Critérios de inclusão e exclusão, estratégia de busca para dados eletrônicos e metodologia da pesquisa

Foram incluídos neste estudo os artigos publicados no continente americano desde o ano de 1909 (descoberta da patologia de Chagas) até os dias atuais que apresentaram pelo menos dois descritores associados (TC+DD, TC+SC, DD+SC, TC+DD+SC), não havendo restrição concernente ao idioma de publicação. Portanto, foram excluídos todos os artigos que não atenderam a esses critérios.

Como pode ser visualizado na Figura 2, primeiramente, os descritores foram divididos entre os pesquisadores, para que fosse feita uma investigação individual, iniciando-se as buscas por resumos de cada estudo encontrado, já obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos. Na segunda etapa do estudo, os pesquisadores reuniram-se para uma análise mais aprofundada dos artigos selecionados com o intuito de excluir da pesquisa aqueles que se repetissem em mais de uma fonte de dados empregada. Após essa fase, realizou-se a leitura de cada resumo selecionado com a finalidade de avaliar a sua proximidade com os objetivos da pesquisa. Aqueles que apresentaram relação com os objetivos do estudo foram mantidos e os considerados fora deste escopo foram descartados. Na

terceira etapa, o corpo documental foi submetido a uma análise mais criteriosa a fim de extrair dos artigos sua temática principal e sua vinculação mais direcionada aos objetivos propostos. Foram selecionados alguns artigos em seu formato integral, o que propiciou maior riqueza de informações, possibilitando sua análise e discussão.



**Figura 2** – Delineamento do estudo.

**Fonte:** Muños et al. (2002).

## 3.2 Estudo experimental

### 3.2.1 Área e local do estudo

O estudo experimental foi realizado no período entre 2007 e 2009, em Goiânia, estado de Goiás, nos seguintes locais:

a) Núcleo de Pesquisa em Parasitas Emergentes e Re-emergentes do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás – realização de estudos laboratoriais, manipulação de cepas e cultura de *T. cruzi*;

b) Parque Zoológico de Goiânia – manuseio dos gambás e manutenção em cativeiro;

c) Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás – coleta e preparação de cana-de-açúcar para testes *in vitro*, bem como manutenção de uma planta em viveiro para teste *in vivo*;

d) Laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas – realização de experimentos com cana-de-açúcar *in vitro* e com camundongos;

e) Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – realização de cortes histológicos da cana-de-açúcar em estudo.

### **3.2.2 Avaliação da infecção natural de *Didelphis sp* por *Trypanosoma cruzi***

#### **3.2.2.1 Aprovação pelo Comitê de Ética**

Os procedimentos experimentais realizados foram previamente estabelecidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás, sob o n. 159/2007, em 21 de novembro de 2007.

#### **3.2.2.2 Obtenção de *Didelphis sp***

Para obtenção de secreção das glândulas perianais, foram utilizados oito gambás provenientes do Centro de Tratamento de Animais Silvestres do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (CETAS/IBAMA-GO). Os gambás, identificados como *D. albiventris*, foram capturados por bombeiros em diferentes áreas domiciliares de Goiânia e encaminhados ao CETAS/IBAMA-GO.

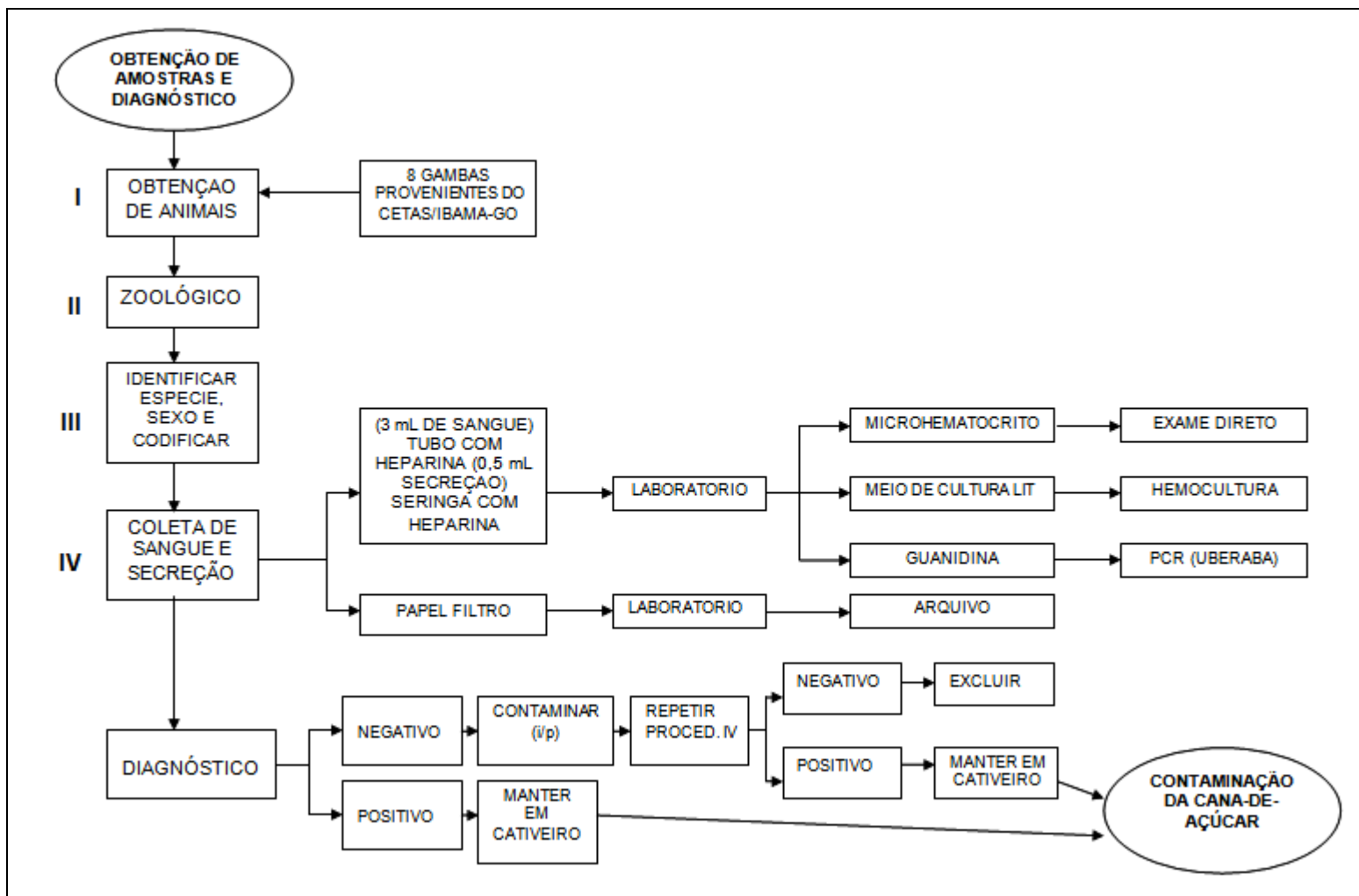
Mediante doação e autorização deste órgão, os animais foram transferidos ao Parque Zoológico de Goiânia para utilização neste experimento (Figura 3).

O manejo dos animais em cativeiro constou de criação em gaiolas individuais (para evitar canibalismo) medindo 0,70 m x 1,00 m x 0,50 m, mantidas em viveiro, em temperatura e umidade ambiente. Os gambás foram alimentados com ração para suínos com 18% de proteínas e água *ad libitum*, servidos diariamente em potes de plástico individuais. Ocasionalmente, lhes foram oferecidas frutas, como banana e laranja, e fígado cru. Procedeu-se à higienização das gaiolas diariamente por meio de lavagem da bandeja embaixo destas e dos recipientes em que foram servidos água e alimentos (PAIVA et al., 1992; RIBEIRO; GARCIA; BONOMO, 1987; RIVERA; AMARAL; NASCIMENTO, 2006). Os animais foram acompanhados, durante todo o período da pesquisa, por um médico veterinário, assim garantindo seu bem-estar.

### **3.2.2.3 Diagnóstico de infecção natural por *Trypanosoma cruzi***

Para verificar a hipótese de infecção natural por *T. cruzi*, após o período de adaptação em cativeiro de 7 dias, os oito animais foram submetidos à coleta de sangue e secreção das glândulas perianais para análise. A coleta de sangue foi realizada através de punção da veia caudal, após prévia tricotomia e assepsia do local com álcool a 70% (Figura 4). Em seguida, foi realizada a coleta de secreção glandular, através de punção das glândulas perianais localizadas abaixo do ânus (Figura 5). Sempre que necessário, os animais foram imobilizados com o emprego de cano de PVC, utilizado por eles como refúgio.

O material coletado foi levado para o Laboratório de Parasitas Emergentes e Re-emergentes para avaliação por observação microscópica de tubo micro-hematócrito após centrifugação (RAMIREZ et al. 2002; WOO, 1969), cultura em meio *liver infusion-tryptose* (LIT) suplementado com 20% de soro bovino fetal, processada segundo Chiari et al. (1989), e reação em cadeia da polimerase (PCR) executada de acordo com a técnica descrita por Britto et al. (1993) e Santos, Pena e Epplen (1993).



**Figura 3** – Representação da metodologia empregada para obtenção de secreção das glândulas perianais de gambás contaminados com *T. cruzi*.



**Figura 4** – Coleta de sangue através de punção da veia caudal dos gambás.

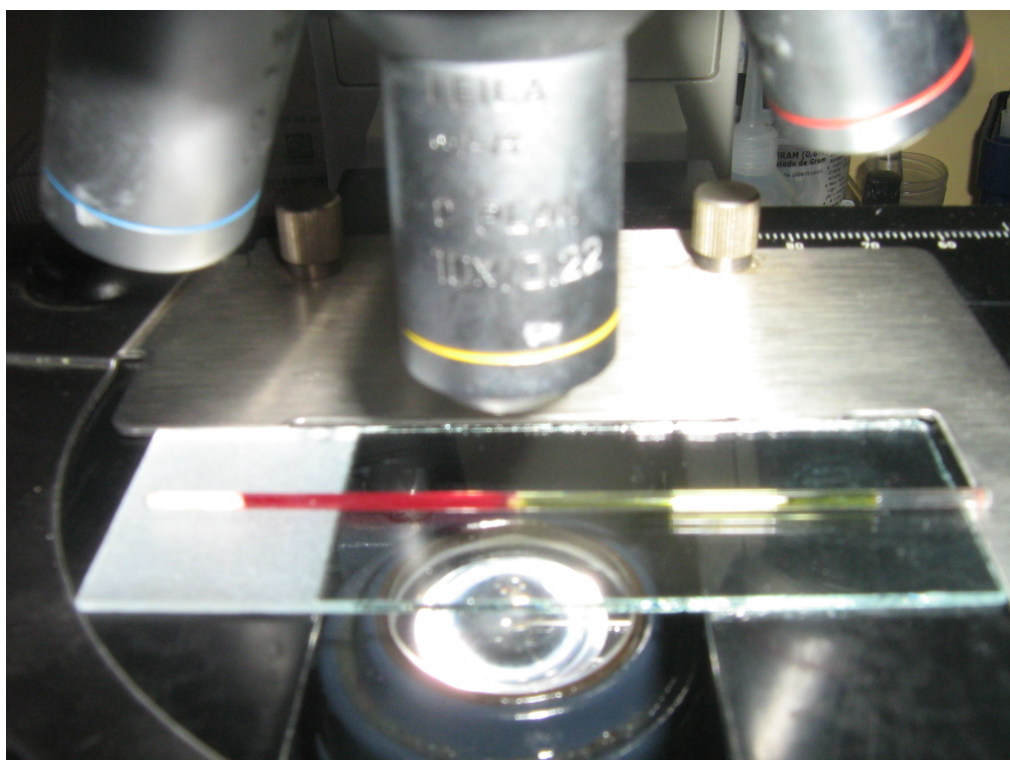


**Figura 5** – Coleta de secreção glandular através de punção das glândulas perianais dos gambás.

Amostras de sangue e secreção das glândulas perianais dos gambás foram preservadas em guanidina-EDTA e enviadas ao Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para serem processadas utilizando-se a técnica de PCR.

### 3.2.2.4 Técnica de Strout modificada com uso de tubo capilar (micro-hematócrito)

Após a coleta de sangue heparinizado, quatro tubos capilares (micro-hematócrito) foram preenchidos em até 80% de seu volume, vedados ao fogo e centrifugados a 6.300 g em centrífuga (Janetzki-K24) por 5 min. Os capilares foram arranjados sobre lâmina e, sob a região da interface sangue/plasma, foi colocado óleo de imersão para exame microscópico com aumento de 10 x (Figura 6) de modo a pesquisar tripomastigotas de *T. cruzi* (WOO, 1969). As secreções foram examinadas ao microscópio colocando-se uma gota entre lâmina e lamínula.



**Figura 6** – Análise microscópica de tubo capilar (micro-hematócrito) após centrifugação.

### 3.2.2.5 Hemocultura

Foram coletados 3 mL de sangue de cada gambá para realizar a hemocultura em meio LIT (CAMARGO, 1964; FERNANDES; CASTELLANI, 1964) utilizando o protocolo de Chiari et al. (1989) com algumas modificações sugeridas por Luz et al. (1994). Amostras de sangue venoso foram colhidas em tubos contendo heparina sódica e mantidas em banho de gelo até processamento em, no máximo, 4 h.

O sangue foi centrifugado a 1.000 g por 10 min a 4°C em centrífuga (Janetzki-K24) e o plasma removido e centrifugado à parte; ao seu sedimento foi adicionada uma alíquota de 3 mL do meio de cultura LIT. Ao sedimento de hemácias foi adicionado igual volume do plasma removido de meio de cultura LIT (CAMARGO, 1964), centrifugando-se a 2.500 g por 10 min a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de hemácias ressuspendido em meio LIT e homogeneizado, após o que alíquotas de 2-3 mL foram distribuídas em sete tubos plásticos de 15 mL cada (Falcon, USA) contendo 3 mL de LIT. As amostras de secreção das glândulas perianais foram processadas colocando-se igual quantidade de meio LIT (v/v).

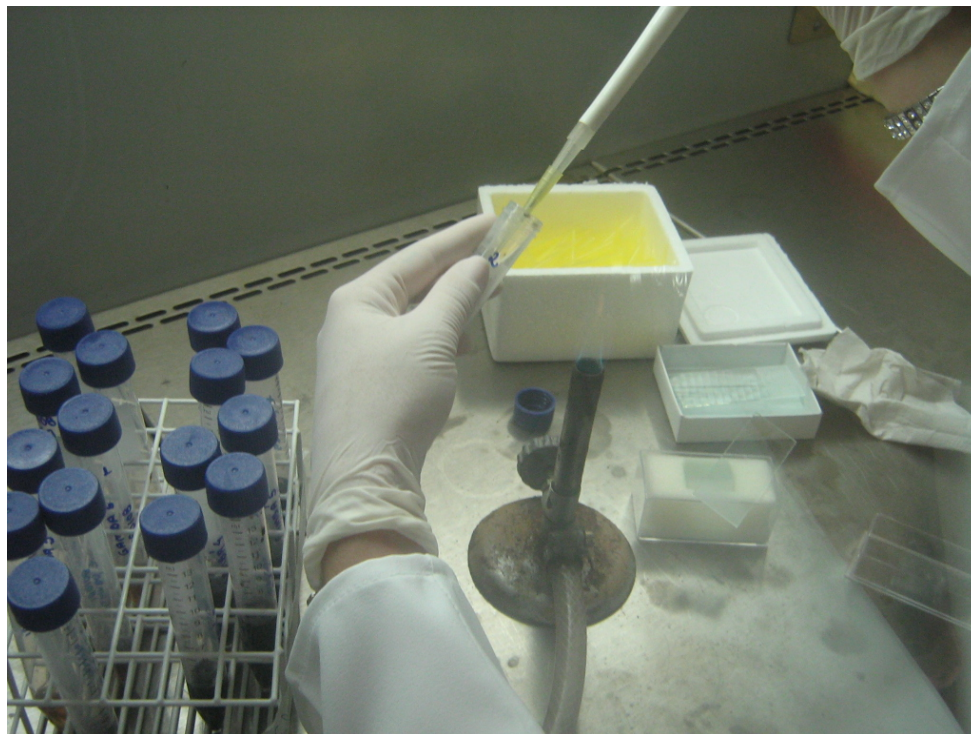
Os tubos foram mantidos em estufa BOD (General Electric-FANEN Ltda.) a 28°C e homogeneizados duas vezes por semana para aeração. Alíquotas de 10 µL da suspensão de cada tubo foram colocadas entre lâmina e lamínula para exame ao microscópio com aumento de 400 x aos 30, 60, 90 e 120 dias após inoculação em meio de cultura (Figura 7).

### 3.2.3 Contaminação experimental de *D. albiventris* por *Trypanosoma cruzi*

Como foi constatada ausência de infecção natural por *T. cruzi*, os gambás foram submetidos à contaminação experimental. Para preparo do inóculo foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi*: a) cepa Y, já conhecida e mantida no Laboratório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas de Goiânia; b) cepa P12 silvestre, isolada das glândulas perianais de gambás infectados naturalmente na região de Perdizes, estado de Minas Gerais (RAMIREZ et al., 2002), criopreservadas e mantidas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo



Mineiro, gentilmente cedida pelo professor Luiz Eduardo Ramirez para utilização nesta pesquisa.



**Figura 7** – Processamento das amostras de sangue e secreção em câmara de fluxo para cultura em meio LIT.

Procedeu-se à inoculação experimental de seis gambás, por via intraperitoneal, com 5.000 f/g de peso, sendo três com a cepa Y e três com a cepa P12 silvestre (Figura 8); dois animais não receberam nenhum tratamento, sendo utilizados como controle negativo. A partir de 72 h após a inoculação, foram realizados os mesmos procedimentos empregados para diagnóstico de infecção natural (micro-hematócrito, cultura em meio LIT e PCR), repetindo-se os mesmos procedimentos 7, 15 e 30 dias após a inoculação.

#### **3.2.4 Contaminação experimental *in vitro* de cana-de-açúcar por *Trypanosoma cruzi***

De uma plantação da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, foram colhidas amostras de colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) da

cultivar RB 867515, por ser esta empregada em grande escala para consumo humano. Após coleta e seleção, as plantas foram preparadas para o estudo dividindo-se os entrenós em fragmentos de 5 cm cada, perfazendo um total de 30 fragmentos (25 utilizados para contaminação experimental e posterior inoculação em camundongos e 5 utilizados para contaminação experimental e posterior análise histológica).



**Figura 8** – Inoculação intraperitoneal de suspensão de *T. cruzi* nos gambás.

Foram, então, distribuídos 25 fragmentos em recipientes plásticos individualmente, sendo 12 inoculados com a cepa Y, 6 na extremidade e 6 na superfície, 12 inoculados com a cepa P12 silvestre, 6 na extremidade e 6 na superfície (Figura 9), e um fragmento não inoculado utilizado como controle negativo.

O inóculo, preparado a partir de secreções recém-colhidas das glândulas perianais de dois grupos de gambás infectados por *T. cruzi*, um com a cepa Y e o outro com a cepa P12 silvestre, foi quantificado pelo método de Brener (1961): 5  $\mu$ L de secreção foram coletados das glândulas perianais dos gambás e colocados entre lâmina e lamínula (22 x 22); em seguida, foram contados 50 campos microscópicos,

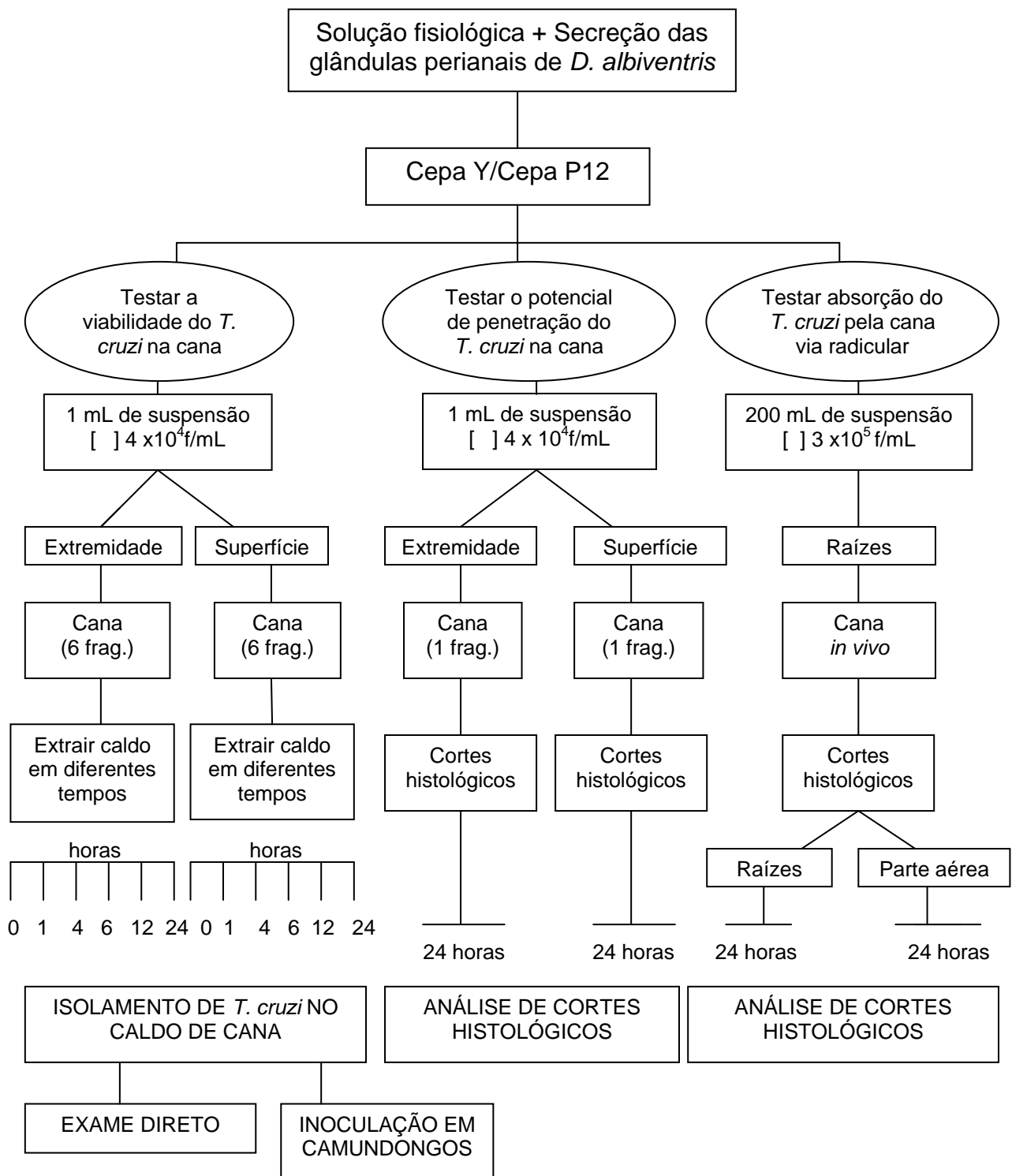
utilizando-se aumento de 400 x. O resultado foi multiplicado pelo fator do respectivo microscópio e corrigido para determinar o número de tripomastigotas em 1 mL de sangue. Finalmente, fez-se a diluição necessária para o inóculo, obtendo-se, assim, duas soluções de igual concentração ( $4 \times 10^4$  f/mL). A contaminação da cana-de-açúcar com os inóculos de *T. cruzi* ocorreu conforme mostrado na Figura 10.



**Figura 9** – Fragmentos de cana-de-açúcar preparados para contaminação experimental por *T. cruzi*.

Aplicou-se 1 mL de suspensão de *T. cruzi* (cepas Y e P12 silvestre) com conta-gotas, separadamente, na extremidade (Figura 11) e na superfície (Figura 12) de cada fragmento de cana-de-açúcar. Nos tempos 0, 1, 4, 6, 12 e 24 h após a inoculação, extraiu-se o caldo de cada fragmento de cana-de-açúcar com o uso de um moedor manual (Figura 13).

A contaminação da cana-de-açúcar foi avaliada por observação do caldo através de exame direto e inoculação em camundongos. Para isso, foram utilizados 135 camundongos machos isogênicos (*Mus musculus*), da linhagem BALB/c, por apresentar boa suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*, oriundos da criação mantida pelo Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.



**Figura 10** – Representação da metodologia empregada para avaliar a contaminação da cana-de-açúcar por *T. cruzi*.



**Figura 11** – Contaminação da cana-de-açúcar por inoculação direta de suspensão de *T. cruzi* em sua extremidade.



**Figura 12** – Contaminação de cana-de-açúcar por inoculação direta de suspensão de *T. cruzi* em sua superfície.



**Figura 13** – Moedor manual utilizado para extrair o caldo dos fragmentos de cana-de-açúcar após inoculação com as cepas Y e P12 silvestre de *T. cruzi*.

A espécie *Mus musculus* é frequentemente utilizada como modelo em ensaios experimentais de estudo em biologia por ter curto ciclo de vida, alta capacidade de procriação e tamanho reduzido. Ademais, *Mus musculus* foi a segunda espécie de mamífero a ter o genoma sequenciado, o que facilita sua comparação ao genoma humano (CHOUDHARY et al., 2005).

Os camundongos, com idade entre 6 e 8 semanas e peso entre 21 g e 26 g, foram encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética e selecionados ao acaso para constituir 27 grupos de 5 animais cada, os quais foram alojados em gaiolas de polipropileno (0,30 m x 0,20 m x 0,13 m), forradas com maravalha de pinho branco e com tampa de aço inoxidável. Todos os animais receberam água da rede de abastecimento pública filtrada e ração comercial para camundongos (Nutrilabor, Guabi) *ad libitum* durante todo o experimento.

A higienização e a troca de gaiolas e camas de maravalha foram realizadas duas vezes por semana (terças e sextas-feiras), sempre no período da manhã (Figura 14). As condições ambientais para a acomodação dos animais, no biotério de experimentação, foram as seguintes: temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa do ar em torno de 70% e ciclo claro-escuro constante, com período claro das 7h00 às 19h00.



**Figura 14** – Manuseio dos camundongos e higienização das gaiolas.

Após 7 dias, que correspondeu ao período de adaptação no biotério de experimentação, todas as gaiolas foram identificadas com etiquetas contendo a linhagem de camundongo utilizada, o grupo e a data referente à exposição. Durante todo o período de experimentação, os animais foram mantidos em grupos de 5 e observados diariamente (Figura 15).



**Figura 15** – Manutenção dos camundongos no biotério de experimentação.

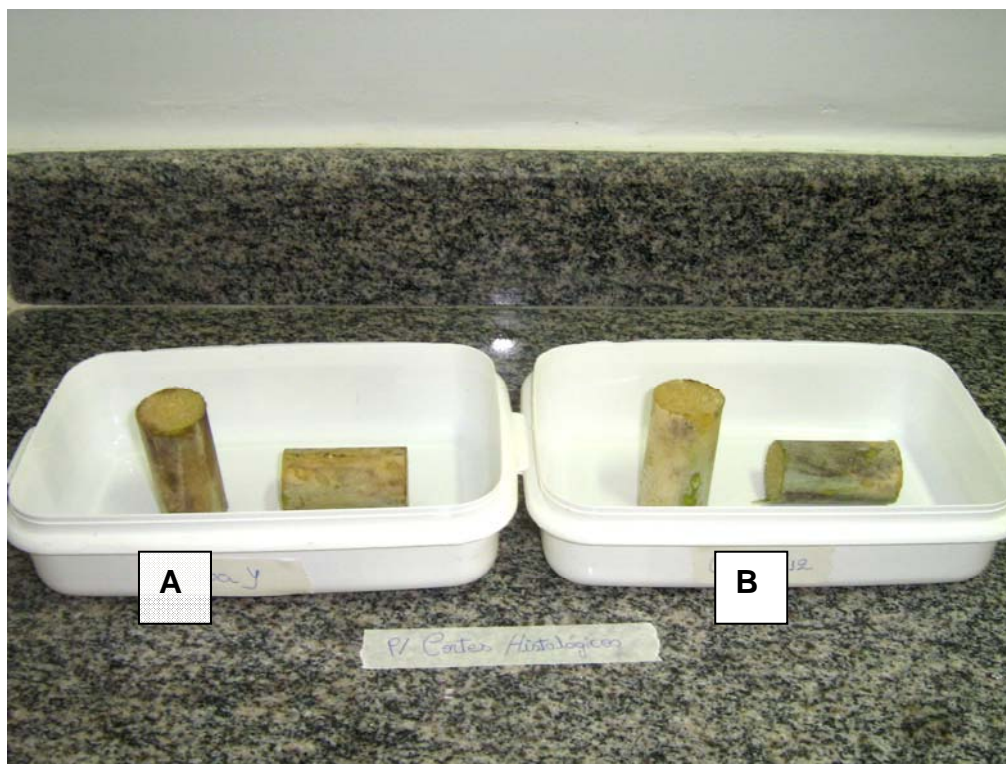
Os camundongos machos isogênicos BALB/c distribuídos em 27 grupos de 5 animais, após o período de adaptação, receberam os seguintes tratamentos: 24 grupos inoculados intraperitonealmente com 500  $\mu$ L de caldo de cana contaminado ( $\cong$ 1.000 parasitos) de acordo com a cepa de *T. cruzi* (Y e P12 silvestre), local de inoculação da cana-de-açúcar (6 na extremidade e 6 na superfície) e tempo após inoculação da cana-de-açúcar (0, 1, 4, 6, 12 e 24 h); dois grupos inoculados intraperitonealmente com 500  $\mu$ L de caldo de cana, um contaminado com a cepa Y e outro com a cepa P12 silvestre de *T. cruzi*, usados como controle positivo; e um grupo inoculado intraperitonealmente com 500  $\mu$ L de caldo de cana não contaminado, usado como controle negativo (Figura 16). Os animais foram avaliados por exame a fresco de sangue colhido da ponta da cauda aos 5, 10, 15 e 30 dias após a contaminação.



**Figura 16** – Inoculação intraperitoneal de caldo de cana contaminado por *T. cruzi* em camundongos.

Simultaneamente a este experimento, quatro fragmentos de cana-de-açúcar foram contaminados por *T. cruzi* (cepas Y e P12 silvestre), dois na extremidade e dois na superfície (Figuras 17 e 18).



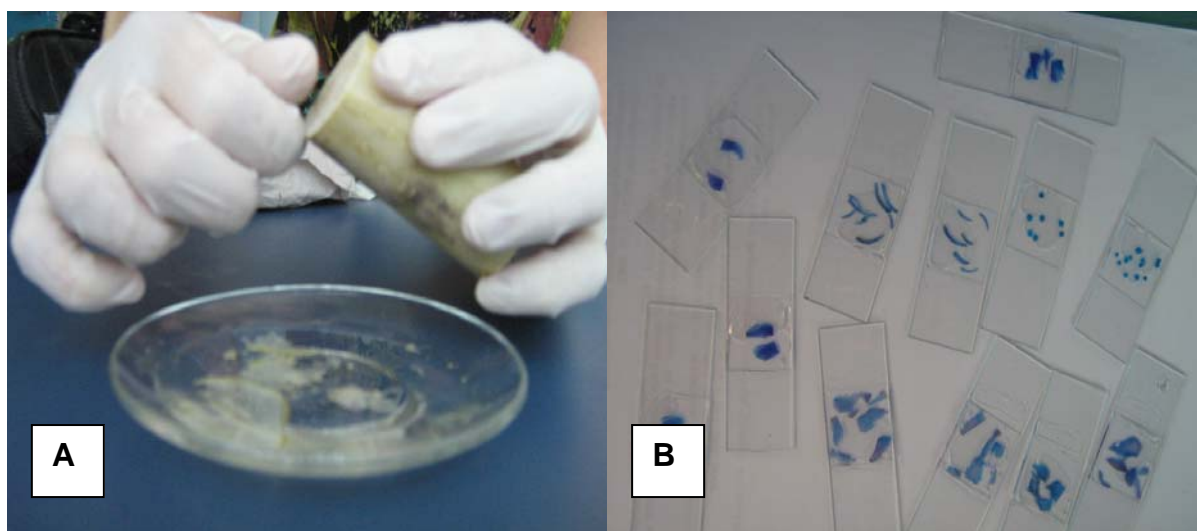


**Figura 17** – Fragmentos de cana-de-açúcar preparados para contaminação por suspensão de *T. cruzi*. A: cepa Y; B: cepa P12 silvestre.



**Figura 18** – Inoculação direta de suspensão de *T. cruzi* na extremidade (corte transversal) e na superfície (sobre a casca) da cana-de-açúcar.

Após 24 h, foram realizados cortes transversais e longitudinais à mão livre dos fragmentos de cana-de-açúcar contaminados *in vitro*, iniciando pela região do inóculo (extremidade ou superfície). As secções foram desidratadas em séries alcoólicas etílicas crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e pós-desidratadas em xilol e álcool etílico (1:1) e xilol puro (JOHANSEN, 1940). Em seguida, foram lavadas em água destilada e submetidas a dupla coloração com fucsina básica 0,1% e azul de Astra 0,3% na proporção 1:3. Posteriormente, as secções montadas entre lâmina e lamínula, utilizando-se resina sintética incolor 500<sup>®</sup>, da marca Acrilex (PAIVA et al., 2006), e analisadas por microscopia óptica (Figura 19).



**Figura 19** – A: Cortes à mão livre de secções da cana-de-açúcar em estudo; B: Lâminas histológicas.

### **3.2.5 Contaminação experimental *in vivo* da cana-de-açúcar por *Trypanosoma cruzi***

Em um recipiente (vaso) com 80 cm de diâmetro e 25 cm de profundidade, plantou-se uma muda de cana-de-açúcar, a qual foi mantida em viveiro, protegida de contaminações externas, por aproximadamente um ano, até o surgimento da parte aérea. Após este período, a planta foi transferida para o Laboratório de Anatomia Vegetal, da Universidade Federal de Goiás, onde recebeu aplicação de 200 mL de suspensão de *T. cruzi* cepa Y ( $3 \times 10^5$  f/ml) diretamente sobre as raízes superficiais, na região próxima ao colmo (Figura 20).



**Figura 20** – Inoculação direta de suspensão de *T. cruzi* sobre as raízes da cana-de-açúcar *in vivo*.

Após 24 h, foram colhidas amostras de raízes, bainha e colmo da mesma região (Figura 21) para confecção de cortes histológicos (Figura 22), que foram analisados como descrito para fragmentos de cana-de-açúcar contaminados *in vitro*.



**Figura 21** – Coleta de amostras de raízes, bainha, colmo e folhas de cana-de-açúcar contaminada *in vivo* com a cepa Y de *T. cruzi* para a confecção de cortes histológicos.



**Figura 22** – Confeção de cortes histológicos de amostras de cana-de-açúcar contaminada *in vivo* com a cepa Y de *T. cruzi*.

## 4 PUBLICAÇÕES

---

### 4.1 Artigo 1 – Os gambás (*Didelphis* sp) e a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) na possível transmissão oral da doença de Chagas: revisão sistemática da literatura

Elieni Socorro Marques Sousa, Mara Rubia de Sousa Barbosa, Isabel Cristina de Castro Gomes, Marco Túlio Antonio Garcíazapata

A ser enviado ao periódico Qualis A de circulação internacional **Cadernos de Saúde Pública**, do Brasil (normas no Anexo 1).

### 4.2 Artigo 2 – Experimental contamination of sugarcane (*Saccharum* spp) by *Trypanosoma cruzi* through direct contact with *Didelphis* sp perianal secretion

Elieni Socorro Marques Sousa, Mara Rubia de Souza Barbosa, André Ricardo Macedo, Alcides Mendes de Souza Junior, Elisângela de Paula Silveira-Lacerda, Marco Túlio Antônio Garcíazapata

A ser enviado ao periódico Qualis A de circulação internacional **Acta Tropica**, da Holanda (normas no Anexo 2).

**Os gambás (*Didelphis* sp) e a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) na possível transmissão oral da doença de Chagas: revisão sistemática da literatura**

**Opossum (*Didelphis* sp) and sugar cane (*Saccharum* spp) in the possible oral transmission of Chagas disease: systematic literature review**

**Running title: Transmissão oral da doença de Chagas: revisão sistemática da literatura**

*Elieni Socorro Marques Sousa<sup>1</sup>, Mara Rubia de Sousa Barbosa<sup>2</sup>, Isabel Cristina de Castro Gomes<sup>3</sup>, Marco Túlio Antônio Garcíaapata<sup>4</sup>*

**Abstract**

*Chagas disease outbreaks are currently important due to ingestion of contaminated food, such as sugar cane (*Saccharum* spp) juice, although the possibility of sylvatic reservoir contamination with *Trypanosoma cruzi*, such as opossum (*Didelphis* sp), cannot be overlooked. A systematic literature review was carried out in order to analyze scientific articles available at the Cochrane Library, LILACS, MEDLINE, and SciELO about contamination of sugar cane and/or opossum by *T. cruzi*, published in the American continent from 1909 to October 2008. After reading and discussing the chosen literature, we selected the scientific articles presented in this review, which corroborate the importance of opossum and sugar cane in Chagas disease epidemiology. Nevertheless, only one study approaches directly the object of this research since the others describe experimental contamination of *Didelphis* sp with different strains of *T. cruzi*. Our results show the importance of sugar cane and *Didelphis* sp in the oral transmission of Chagas disease, and we suggest that further studies on this theme should be performed.*

*Trypanosoma cruzi; Didelphis sp; Sugar cane; Oral transmission; Chagas disease*

---

<sup>1</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.

<sup>3</sup> Faculdade de Biomedicina, Universidade Católica de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.

<sup>4</sup> Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil.

**Correspondence**

M.T.A. García-Zapata, Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 12911, Setor Leste Vila Nova, 74643-970, Goiânia-GO, Brasil; Tel: + 55 (62) 3269-8219; fax: + 55 (62) 3521839. [zapata@iptsp.ufg.br](mailto:zapata@iptsp.ufg.br), [mctulian@yahoo.com.br](mailto:mctulian@yahoo.com.br)

## Introdução

A transmissão oral da doença de Chagas ocorre pela ingestão de alimentos contaminados pelo *Trypanosoma cruzi*, sendo comum entre mamíferos do ciclo silvestre da tripanossomíase, uma vez que estes podem se alimentar de triatomíneos e/ou outros mamíferos infestados. Em todos os casos, a penetração do parasito pode ocorrer pela mucosa oral íntegra ou lesada <sup>1,2,3</sup>. Em humanos, esse tipo de transmissão acontece de forma esporádica e circunstancial por ingestão de diferentes tipos de alimentos contaminados pelo parasito, tais como caldo de cana, polpa de açaí, sopas, comida caseira, leite e carne de caça semicrua. Geralmente são encontrados vetores ou reservatórios infectados nas imediações da área de produção, manuseio ou utilização dos alimentos contaminados.

O *T. cruzi* pode permanecer viável em alimentos por algumas horas ou até dias, dependendo de temperatura, umidade e dessecação. Episódios epidêmicos tendo como fator causal comum a ingestão de produtos contaminados têm sido registrados no Brasil desde 1968 <sup>1,2,3</sup>. Porém, a transmissão oral da doença de Chagas no Brasil vem recebendo maior atenção a partir de 2005, em decorrência do surto ocorrido no estado de Santa Catarina, embora este não tenha sido o único episódio no país, pois houve casos precedentes em Teutônia (RS) e em alguns municípios nos estados do Pará, Paraíba e Amazonas. Também há registros desse tipo de ocorrência na Colômbia, Argentina e México <sup>4</sup>.

No episódio de Santa Catarina em 2005, a transmissão relacionou-se ao consumo de caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) em um ponto de venda às margens da rodovia BR 101, no município de Navegantes, no dia 13 de fevereiro de 2005. Foram registrados 45 casos suspeitos de doença de Chagas aguda (DCA) relacionados ao consumo de caldo de cana, tendo sido confirmados 31 casos mediante exames laboratoriais, com cinco pacientes evoluindo para óbito <sup>5</sup>. Em Navegantes, foram capturados exemplares de *Didelphis* sp e *Trypanosoma tibiamaculata*, reservatórios silvestres da doença, infectados por *T. cruzi* <sup>6</sup>.

Entre janeiro de 2005 e agosto de 2007, a Secretaria de Vigilância em Saúde recebeu notificação de 22 surtos de DCA em vários estados brasileiros. Na maioria dos eventos, pôde-se comprovar a associação da ocorrência de casos com o consumo de alimentos *in natura*, como caldo de cana (Santa Catarina, 2005), sopa (bairro Alto do Cassiano, Redenção, estado do Ceará), bacaba (Maranhão, Pará, 2006) e açaí (Pará, 2006 e 2007; Amazonas, 2007). Foram identificados 170 casos e registrados 10 óbitos atribuídos à DCA, com letalidade de 6,5%, tendo sido a maior incidência registrada na Região Norte do país <sup>7</sup>.

Considerando-se a repetição de surtos de transmissão oral de DCA envolvendo caldo de cana e a falta de comprovação da forma de contaminação deste produto, não se descartando a possibilidade disto ter ocorrido por meio de reservatórios silvestres do *T. cruzi*, como *Didelphis* sp, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura acerca da contaminação de cana-de-açúcar e *Didelphis* sp por *T. cruzi*, destacando-se a importância desses elementos na epidemiologia da doença de Chagas, bem como a produção científica existente sobre este tema.

## **Método**

### **Tipo de estudo**

Este estudo classifica-se como revisão sistemática da literatura do tipo descritivo simples com fontes de dados documentais, uma forma de pesquisa que utiliza como fonte de dados a literatura acerca de um tema, empregando métodos sistematizados para apresentar uma síntese das evidências relacionadas a uma estratégia específica (Figura 1).

### **Local**

Este estudo foi realizado no período de outubro a novembro de 2008, em Goiânia-GO, nas salas de informática do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) e Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás (UFG), fazendo-se a coleta de dados por via eletrônica. A análise, interpretação e discussão dos dados foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Parasitas Emergentes e Re-emergentes (NUPEREME) do IPTSP.

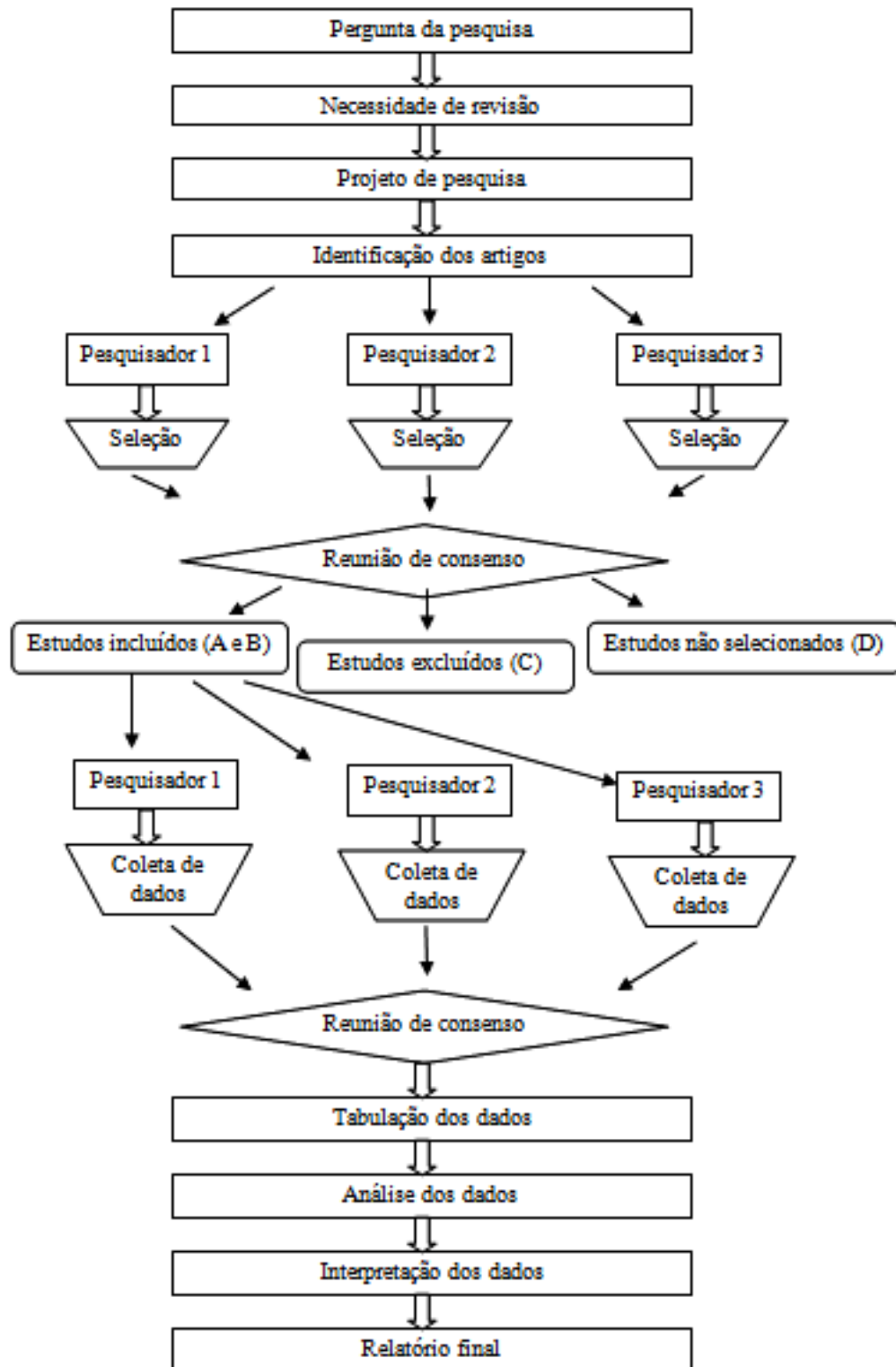
### **Fontes de dados e seleção dos descritores**

A busca de dados foi mediada por três pesquisadores, que optaram por localizar informações prioritariamente na Biblioteca Virtual em Saúde<sup>8</sup> utilizando as seguintes bases de dados: Biblioteca Cochrane, LILACS, MEDLINE e SciELO. Após consenso, em 13 de outubro de 2008, os pesquisadores escolheram os descritores (*Trypanosoma cruzi* – TC; *Didelphis* sp – DD; *Saccharum* spp – SC) e analisaram sua existência e validade pesquisando-os separadamente por meio do DeCS - Terminologia em saúde<sup>8</sup> e, em seguida, associando-os entre si, o que resultou em um vasto volume de informações.



Figura 1

Fluxograma da estratégia da revisão sistemática.



## **Critérios de inclusão e exclusão, estratégia de busca e metodologia de pesquisa**

Foram incluídos neste estudo os artigos publicados no continente americano desde o ano de 1909 (descoberta da patologia de Chagas) até os dias atuais que apresentaram pelo menos dois descritores associados (TC+DD, TC+SC, DD+SC, TC+DD+SC), não havendo restrição concernente ao idioma de publicação. Portanto, foram excluídos todos os artigos que não atendessem a esses critérios.

Primeiramente, os descritores foram divididos entre os pesquisadores, para que fosse feita uma investigação individual, iniciando-se as buscas por resumos de cada estudo encontrado, já obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos.

Na segunda etapa do estudo, os pesquisadores reuniram-se para uma análise mais aprofundada dos artigos selecionados com o intuito de excluir da pesquisa aqueles que se repetissem em mais de uma fonte de dados empregada. Após essa fase, realizou-se a leitura de cada resumo selecionado com a finalidade de avaliar a sua proximidade com os objetivos da pesquisa. Aqueles que apresentaram relação com os objetivos do estudo foram mantidos e os considerados fora deste escopo foram descartados.

Na terceira etapa, o corpo documental foi submetido a uma análise mais criteriosa a fim de extrair dos artigos sua temática principal e sua vinculação mais direcionada aos objetivos propostos. Foram selecionados alguns artigos em seu formato integral, o que propiciou maior riqueza de informações, possibilitando sua análise e discussão.

## **Resultados e discussão**

Na primeira etapa da busca de dados foram encontrados 14.028 artigos distribuídos entre as bases de dados anteriormente referidas utilizando os descritores preestabelecidos (Tabela 1).

Atendendo aos critérios de inclusão previamente estabelecidos, buscaram-se os artigos que contivessem no mínimo dois descritores associados, perfazendo um total de 175 (1,25%) (Tabela 2). Entre estes, observou-se que 116 (0,83%) repetiam-se em diferentes bases, sendo 78 (0,56%) repetidos entre as bases LILACS, MEDLINE e SciELO, 36 (0,26%) entre LILACS e MEDLINE e 2 (0,01%) entre MEDLINE e SciELO (Tabela 3). Eliminando-se as repetições de artigos, que totalizaram 71 (0,51), foram selecionados 45 (0,32%) para prosseguir na pesquisa, os quais foram somados aos 59 (0,42%) que não se repetiam, totalizando 104 artigos (0,74%), cujos resumos foram submetidos a uma breve leitura visando

verificar sua relação com os objetivos da pesquisa. Dessa forma, foram selecionados 56 artigos (0,40%) para uma análise mais criteriosa.

Tabela 1

Distribuição dos artigos encontrados de acordo com a base de dados em que foram localizados utilizando os descritores preestabelecidos.

Base de dados	Distribuição dos artigos (n°)							Total
	Descritor*							
	TC	DD	SC	TC+DD	TC+SC	DD+SC	TC+DD+SC	
LILACS	2.162	156	65	52	2	0	0	2437
MEDLINE	9.045	873	622	88	2	0	0	10.630
B. Cochrane	47	0	12	0	0	0	0	59
SciELO	630	79	162	31	0	0	0	902
<b>Total</b>	11.884	1.108	861	175	4	0	0	14.028

\* TC – *Trypanosoma cruzi*; DD – *Didelphis* sp; SC – *Saccharum* spp.

Tabela 2

Distribuição dos artigos encontrados de acordo com a base de dados em que foram localizados contendo no mínimo dois descritores preestabelecidos associados.

Base de dados	Distribuição dos artigos (n°)				Total
	Descritor*				
	TC+DD	TC+SC	DD+SC	TC+DD+SC	
LILACS	52	2	0	0	54
MEDLINE	88	2	0	0	90
B. Cochrane	0	0	0	0	0
SciELO	31	0	0	0	31
<b>Total</b>	171	4	0	0	175

\* TC – *Trypanosoma cruzi*; DD – *Didelphis* sp; SC – *Saccharum* spp.

Tabela 3

Distribuição dos artigos encontrados em mais de uma base de dados, daqueles excluídos da pesquisa em decorrência da repetição e dos selecionados para prosseguir nesta revisão sistemática após eliminação das repetições.

Base de dados	Artigos repetidos (n°)	Artigos excluídos (n°)	Artigos selecionados (n°)
LILACS, MEDLINE, SciELO	78	52	26
LILACS e MEDLINE	36	18	18
LILACS e SciELO	2	1	1
<b>Total</b>	116	71	45

Após leitura mais criteriosa, verificou-se que apenas um artigo mantinha relação direta com a temática proposta. Apesar disso, por consenso entre os pesquisadores, realizou-se a leitura de 11 (0,078%) artigos na íntegra, obtendo-se informações relevantes que permitiram analisar a importância de *Didelphis* sp na epidemiologia da doença de Chagas (Tabela 4). Assim, os estudos selecionados obedecendo à estratégia proposta compuseram esta revisão sistemática de literatura.

Analisando-se a base de dados em que os estudos utilizados para compor esta revisão sistemática da literatura foram encontrados, constatou-se que 2 (18,18%) provieram do MEDLINE e 9 (81,82%) do LILACS (Figura 2).

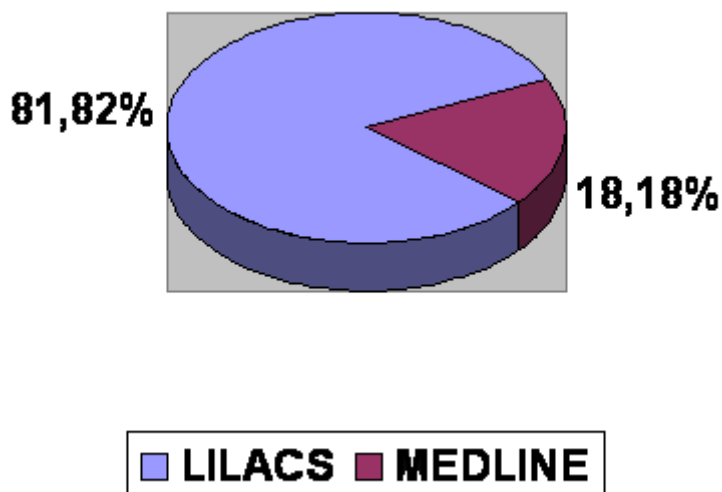


Figura 2

Distribuição dos artigos selecionados para compor a presente revisão sistemática da literatura de acordo com a base de dados em que foram localizados.

Após a leitura de todos os estudos selecionados, conforme mencionado anteriormente, observou-se que apenas o artigo de Cardoso et al. (2006)<sup>17</sup> apresentou relação direta com os objetivos propostos para esta revisão sistemática, uma vez que os pesquisadores analisaram a sobrevivência de *T. cruzi* em caldo de cana e destacaram a importância deste produto na transmissão oral da doença de Chagas. Por intermédio de experimentos, os autores demonstraram o alto nível de sobrevivência de *T. cruzi* no colmo da cana-de-açúcar. A metodologia do estudo consistiu em inocular colmos de cana-de-açúcar diretamente com o conteúdo intestinal de triatomíneos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

Tabela 4  
Relação dos artigos selecionados para compor a presente revisão sistemática de literatura.

Base de dados	Título do artigo	Objetivo do estudo	Método/diagnóstico	Área do estudo	Ano de publicação	Autores
LILACS	<i>Trypanosoma cruzi</i> : vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum <i>Didelphis marsupialis</i>	Estudar <i>T. cruzi</i> nas glândulas perianais de gambás	Exame a fresco, imunofluorescência, hemocultura e xenodiagnóstico	Rio de Janeiro, Brasil	1984	Deane et al., 1984
	Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas	Verificar a eficácia de transmissão de <i>T. cruzi</i> por via oral	Exame a fresco, hemocultura e xenodiagnóstico	São Paulo, Brasil	1987	Ribeiro et al., 1987
	The importance of the opossum ( <i>Didelphis albiventris</i> ) as a reservoir for <i>Trypanosoma cruzi</i> in Bambuí, Minas Gerais state	Pesquisar <i>T. cruzi</i> nas glândulas perianais de gambás	Exame a fresco, hemocultura e xenodiagnóstico	Minas Gerais, Brasil	1991	Fernandes et al., 1991
	<i>Trypanosoma cruzi</i> infection in the opossum <i>Didelphis marsupialis</i> : absence of neonatal transmission and protection by maternal antibodies in experimental infections	Analisar a possível proteção de anticorpos maternos aos filhotes de <i>Didelphis</i> sp	Hemocultura e xenodiagnóstico	Rio de Janeiro, Brasil	1994	Jansen et al., 1994
	Search for <i>Trypanosoma cruzi</i> in the anal glands of wild <i>Didelphis albiventris</i> from Santiago del Estero, Argentina	Estudar <i>T. cruzi</i> nas glândulas perianais de gambás	Exame a fresco e xenodiagnóstico	Santiago, Argentina	1995	Conti et al., 1995
	Histopathological study of experimental and natural infections by <i>Trypanosoma cruzi</i> in <i>Didelphis marsupialis</i>	Estabelecer padrões histopatológicos de infecção de <i>T. cruzi</i> em gambás	Exame a fresco, hemocultura e Imunofluorescência	Rio de Janeiro, Brasil	1995	Correia et al., 1996

	<i>Trypanosoma cruzi</i> in the anal glands of urban opossums. I- Isolation and experimental infections	Descrever as fases de <i>T. cruzi</i> no interior das glândulas perianais de gambás	Exame a fresco, esfregaço corado e xenodiagnóstico	Caracas, Venezuela	1996	Undaneta-Morales et al., 1996
	The opossum <i>Didelphis virginiana</i> as a synanthropic reservoir of <i>Trypanosoma cruzi</i> in Dzidzilché, Yucatán, México	Avaliar o papel de <i>D. virginiana</i> em transmissão peridoméstica de <i>T. cruzi</i>	Exame a fresco, microcapilar e xenodiagnóstico	Yucatán e Dzidzilché, México	2002	Ruiz-Pinha et al., 2002
	Survival of <i>Trypanosoma cruzi</i> in sugar cane used to prepare juice	Avaliar a sobrevivência de <i>T. cruzi</i> no caule da cana-de-açúcar contaminada	Exame a fresco, QBC e inoculação em camundongos	São Paulo, Brasil	2006	Cardoso et al., 2006
MEDLINE	<i>Trypanosoma cruzi</i> in the opossum <i>Didelphis marsupialis</i> : parasitological and sorological follow-up of the acute infection	Descrever a resposta humoral dos gambás e sua correlação durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i>	Exame direto e imunofluorescência	Rio de Janeiro, Brasil	1991	Jansen et al., 1991
	<i>Trypanosoma cruzi</i> in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials	Comparar a infecção por <i>T. cruzi</i> entre triatomíneos e gambás	Hemocultura e PCR	Mata Atlântica, Brasil	2000	Pinho et al., 2000

A diferentes intervalos de tempo (0, 1, 4, 6, 12 e 24 h) após a contaminação dos colmos, o caldo de cana foi extraído e analisado por método direto, centrifugação em tubo de hematócrito, QBC e inoculação experimental em camundongos. Os autores relataram que houve resultados positivos até 4 h após a inoculação pela técnica de centrifugação, até 12 h pelo método direto e QBC e até 24 h para a inoculação de camundongos. Os animais inoculados apresentaram parasitemia durante um período de observação de 14 dias, demonstrando que *T. cruzi* exibiu taxa de vida elevada no colmo da cana-de-açúcar.

Pinho et al. (2000),<sup>19</sup> em um estudo acerca da fase aguda da doença de Chagas com diferentes cepas de *T. cruzi* (Estica F, G-49, G-327 e Y), observaram variações entre elas e descobriram que os gambás podem eliminar algumas cepas de *T. cruzi* de seu organismo, além de demonstrar que os anticorpos IgG controlam a população do parasito na fase aguda da doença, embora não previnam ou controlem a fase crônica da patologia.

Jansen et al. (1994)<sup>12</sup> utilizaram fêmeas adultas de *Didelphis marsupialis* e suas proles para analisar a possível proteção e transmissão de anticorpos maternos aos filhotes. Utilizando hemocultura e xenodiagnóstico, os pesquisadores não observaram transmissão neonatal de *T. cruzi* em nenhum dos animais testados, porém as mães infectadas transferiram anticorpos IgG específicos às suas proles, o que lhes conferiu proteção parcial contra possíveis infecções experimentais. Os autores concluíram que a contaminação dos filhotes só se faz possível quando os níveis de anticorpos IgG maternos começam a declinar, o que torna a prole suscetível à infecção por *T. cruzi*.

Ribeiro et al. (1987)<sup>10</sup> utilizaram machos e fêmeas do gambá *Didelphis albiventris* em experimento para analisar a eficácia da transmissão oral de *T. cruzi*. Como parte de sua alimentação, foram fornecidos aos animais camundongos parasitados pela cepa Bolívia do *T. cruzi* ou triatomíneos comprovadamente contaminados pela mesma cepa. Foram realizados exames a fresco, hemoculturas e xenodiagnósticos nos animais estudados, registrando-se a ocorrência de 60,0% de infecção em gambás que ingeriram camundongos infectados e 83,3% naqueles que se alimentaram de triatomíneos infectados. Esses resultados são relevantes, pois mostram a possibilidade de transmissão do *T. cruzi* por via oral ou digestiva entre marsupiais, além de destacar a importância de *D. albiventris* na epidemiologia da doença de Chagas.

Jansen et al. (1991)<sup>18</sup> estudaram filhotes e adultos de *D. marsupialis* para descrever sua resposta humoral (níveis de IgG e IgM) e correlação durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* utilizando as cepas Y, F, G-49 e G-327 inoculadas no lúmen das glândulas anais e no tecido subcutâneo dos animais. Os autores observaram que as cepas G-49 e G-327 produziram infecção de longa duração, sendo a primeira mais infecciosa. A cepa Y produziu pequeno

índice de infecção quando inoculada no tecido subcutâneo de gambás, porém os autores demonstraram que essa cepa pode formar colônias extracelulares quando inoculada nas glândulas anais desses animais. Os pesquisadores concluíram que os anticorpos têm papel significativo no controle da infecção por *T. cruzi* em gambás e que os linfócitos T, dependentes ou não, provavelmente agem no início da fase aguda da patologia diminuindo a parasitemia e/ou eliminando algumas cepas do parasito.

Deane et al (1984)<sup>9</sup> inocularam várias cepas de *T. cruzi* em machos e fêmeas da espécie *D. marsupialis* e observaram grande quantidade do parasito nas glândulas anais de todos os animais infectados. Alguns meses após a inoculação das cepas, dois animais morreram e os demais desenvolveram a mesma patologia, embora não tenham evoluído para óbito. Os pesquisadores concluíram que as glândulas anais dos gambás funcionavam como reservatório de onde o parasito poderia se disseminar para os tecidos e a circulação sanguínea do hospedeiro, e que, posteriormente, ao se alimentar desse mamífero contaminado, o inseto hematófago se infectaria; além disso, as glândulas anais podem funcionar como uma forma bastante eficiente de proteção contra a resposta imune do hospedeiro infectado, mostrando grande relação entre o *T. cruzi* e seus diversos hospedeiros vertebrados.

Os demais estudos selecionados (Fernandes et al., 1991<sup>11</sup>, Conti et al., 1995<sup>13</sup>, Correia et al., 1996<sup>14</sup>, Undaneta-Morales et al., 1996<sup>15</sup>, Ruiz-Pinha et al., 2002<sup>16</sup>) se referem à pesquisa de infecção natural por *T. cruzi* em *Didelphis* sp em diferentes regiões da América Latina, bem como à realização de estudos experimentais acerca da contaminação desses animais por determinadas cepas do parasito e observação da infecção. Os referidos estudos consistiram em captura de marsupiais do gênero *Didelphis* sp em ambiente natural e análise diagnóstica de infecção natural por *T. cruzi*, na maioria das vezes empregando exames de sangue a fresco, cultura e xenodiagnóstico. Os resultados mostraram média de infecção natural acima de 50%, sendo a prevalência de infecção natural pelo *T. cruzi* nesses marsupiais considerada alta pelos autores. Já os estudos de infecção experimental foram realizados com a inoculação de variadas cepas de *T. cruzi* por meio de diferentes vias de contaminação: oral, intraperitoneal e subcutânea.

Assim sendo, verificou-se que os gambás podem eliminar seletivamente algumas cepas de *T. cruzi*, tendo sido observado alto grau de infecção por esta via. Isto mostra que as glândulas anais podem funcionar como câmara de difusão para antígenos do parasito, ou seja, neste local, *T. cruzi* está protegido dos mecanismos desenvolvidos pelo hospedeiro para controlar sua população<sup>20</sup>.



Essas características fizeram com que os gambás fossem considerados pelos autores de todos os artigos referidos como disseminadores em potencial do *T. cruzi*, mostrando grande importância no contexto epidemiológico da doença de Chagas, pois seus hábitos altamente sinantrópicos constituem importante ligação entre o ambiente silvestre e o ambiente domiciliar.

## **Conclusão**

Constatou-se, por meio desta pesquisa, a carência de literatura a respeito da temática abordada, visto que, de acordo com a metodologia adotada, apenas um artigo científico correspondeu aos objetivos preestabelecidos. Entretanto, a análise dos dados levantados pela revisão sistemática da literatura mostrou-se relevante, pois apontou a importância da cana-de-açúcar como meio viável de sobrevivência do *T. cruzi*, constituindo veículo de transmissão da patologia, assim como indicou *Didelphis* sp como hospedeiros colaboradores na epidemiologia de Chagas.

Os resultados encontrados sugerem a necessidade de produção de novos estudos referentes a esta temática, principalmente relacionando cana-de-açúcar, *Didelphis* sp e *T. cruzi*. Considerando a associação dos resultados obtidos e a ocorrência de surtos de transmissão oral ao longo dos anos, propomos o desenvolvimento de estudo experimental referente à contaminação da cana-de-açúcar por *T. cruzi* por intermédio da inoculação direta de cepas deste protozoário provenientes das glândulas perianais de *D. albiventris*.

## **Resumo**

*Os surtos da doença de Chagas por ingestão de alimentos contaminados, como caldo de cana-de-açúcar (Saccharum spp), adquiriram maior importância recentemente, embora não se possa descartar a possibilidade de contaminação de reservatórios silvestres do Trypanosoma cruzi, como os gambás (Didelphis sp). Conduziu-se revisão sistemática da literatura analisando-se artigos científicos disponíveis na Biblioteca Cochrane, LILACS, MEDLINE e SciELO acerca da contaminação da cana-de-açúcar e/ou gambás por T. cruzi, publicados no continente americano entre 1909 e outubro de 2008. Após leitura e discussão da literatura escolhida, selecionaram-se os artigos científicos integrantes desta revisão, que corroboram a importância dos gambás e da cana-de-açúcar na epidemiologia da doença de Chagas. Entretanto, apenas um estudo aborda diretamente o objeto desta pesquisa, enquanto*

os demais descrevem contaminações experimentais de *Didelphis sp* com diferentes cepas de *T. cruzi*. Os resultados encontrados destacam a importância da cana-de-açúcar e *Didelphis sp* na transmissão oral da doença de Chagas, sugerindo a condução de estudos adicionais sobre a temática.

*Trypanosoma cruzi*; *Didelphis sp*; Cana-de-açúcar; Transmissão oral; Doença de Chagas

## Colaboradores

E. S. M. Sousa e M. R. S. Barbosa conceberam esta revisão e seu design, bem como acompanharam a aquisição, análise e interpretação dos dados componentes deste artigo científico. I. C. C. Gomes participou na aquisição dos dados para a concepção do artigo científico. M. T. A. García-Zapata elaborou a revisão crítica deste artigo e foi responsável pela aprovação final da versão para publicação.

## Referências

1. Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, editores. Parasitologia humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu; 2004. Capítulo 11; p. 73-96.
2. Dias JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade AZ, Barral-Neto M, organizadores. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. Capítulo 5; p. 48-74.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6. ed. Brasília, DF; 2005. [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia\\_Vig\\_Epid\\_novo2.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf) (acessado em 22/out/2008).
4. Dias, JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 39(4): 370-375 jul-ago de 2006.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica - 24/3/2005. Doença de Chagas Aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina. Brasília, DF; 2005. [http://189.28.128.100/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21266](http://189.28.128.100/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21266). (acessado em 12/nov/2008).
6. Roque ALR, Xavier SCC, Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. Am J Trop Med Hyg 2008; 79: 742-9.

7. Gontijo ED, Santos SE. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Ministério da Saúde, Fiocruz; 2008. <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=173>. (acessado em 20/out/2008).
8. BIREME. Biblioteca Virtual em Saúde. São Paulo: Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. <http://www.bireme.br> (acessado em 13/out/2008).
9. Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 513-5.
10. Ribeiro RD, Garcia TAR, Bonomo WC. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. Rev. Saúde Pública 1987; 21: 51-4.
11. Fernandes AJ, Chiari E, Rodrigues RR, Dias JCP, Romanha AJ. The importance of the opossum (*Didelphis albiventris*) as a reservoir for *Trypanosoma cruzi* in Bambuí, Minas Gerais state. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86: 81-5.
12. Jansen AM, Madeira FB, Deane MP. *Trypanosoma cruzi* infection in the opossum *Didelphis marsupialis*: absence of neonatal transmission and protection by maternal antibodies in experimental infections. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 41-5.
13. Conti O, Schweigman NJ, Pietrokovsky S, Botazzi V, Wisnivesky-Colli C. Search for *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of wild *Didelphis albiventris* from Santiago del Estero, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 1995; 90: 687.
14. Carreira JCA, Jansen AM, Deane MP, Lenzi HL. Histopathological study of experimental and natural infections by *Trypanosoma cruzi* in *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 609-18.
15. Urdaneta-Morales S, Nironi I. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums. I- Isolation and experimental infections. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 399-403.
16. Ruiz-Piña HA, Cruz-Reyes A. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: 613-20.
17. Cardoso AVN, Lescano SAZ, Amato Neto V, Gakiya E, Santos SV. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. Rev Inst Med Trop São Paulo 2006; 48: 287-9.
18. Jansen AM, Leon L, Machado GM, Silva MH, Souza-Leão SM, Deane MP. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: parasitological and serological follow-up of the acute infection. Exp Parasitol 1991; 73: 249-59.
19. Pinho AP, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 509-14.
20. Deane MP, Jansen AM. Another *Trypanosoma*, distinct from *T. cruzi*, multiplies in the lumen of anal glands of the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 81: 131-2.

**Experimental contamination of sugarcane (*Saccharum* spp)  
by *Trypanosoma cruzi* through direct contact with  
*Didelphis* sp perianal secretion**

E.S.M. Sousa<sup>a</sup>, M.R.S. Barbosa<sup>a</sup>, A. Mendes Júnior<sup>b</sup>, A.R. Macedo<sup>c</sup>, E.P. Silveira-Lacerda<sup>c</sup>, M.T.A. Garcia-Zapata<sup>a,5</sup>

<sup>a</sup> *Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brazil*

<sup>b</sup> *Parque Zoológico de Goiânia, Goiânia-GO, Brazil*

<sup>c</sup> *Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brazil*

---

<sup>5</sup> Corresponding author. Tel.: + 55 62 3269-8219; fax: + 55 62 3521839. *E-mail* address: [zapata@iptsp.ufg.br](mailto:zapata@iptsp.ufg.br), [mctulian@yahoo.com.br](mailto:mctulian@yahoo.com.br) (M.T.A. Garcia-Zapata).

## ABSTRACT

Chagas disease outbreaks in Brazil due to ingestion of contaminated food and contamination of sylvatic reservoirs with *Trypanosoma cruzi* have been calling the attention in the last few years. This study aimed at: a) evaluating sugarcane contamination by *T. cruzi* isolated from the perianal glands of opossums (*Didelphis* sp) inoculated with Y and sylvatic P12 strains of the parasite by direct examination and experimental inoculation of mice; b) elucidating *in vitro* penetration of *T. cruzi* through the natural layers of sugarcane stalks; c) assessing *in vivo* penetration of *T. cruzi* through sugarcane roots by examining histological sections of stalks using optical microscope. We observed: mice infected by *T. cruzi* 6 h and 4 h after administration of sugarcane juice inoculated with Y and sylvatic P12 strains, respectively; mice infected by sugarcane juice when the tips of sugarcane internode fragments were inoculated, but not when their surface was contaminated; lack of *T. cruzi* in histological sections of sugarcane internodes; no sugarcane contamination through the roots. Our results indicate that oral transmission of *T. cruzi* by ingestion of sugarcane juice contaminated by secretion of opossum perianal glands is possible. We suggest the use of other methods for assessing *T. cruzi* penetration in sugarcane and its contamination through the roots.

*Keywords:* *Trypanosoma cruzi*, opossum, sugarcane.

## 1. Introduction

Outbreaks of orally transmitted *Trypanosoma cruzi* have been registered in Brazil since 1968, when the ingestion of vegetables possibly contaminated by secretion of opossum infected by this parasite was reported in Teotônia, in the state

of Rio Grande do Sul (Silva et al., 1968). Also, ingestion of sugarcane (*Saccharum* spp) juice contaminated by *T. cruzi* was detected in 1991 in Catolé do Rocha, in the state of Paraíba (Yasuda, 1987) and in 2005 in Navegantes, in the state of Santa Catarina (Brasil, 2005), where the contaminated juice was produced on a stand located on BR 101 highway and sylvatic reservoirs (*Didelphis* sp) and vectors (*Trypanosoma tibiamaculata*) infected by *T. cruzi* were captured (Brasil, 2005).

Between January 2005 and August 2007, the Brazilian Secretary of Health Surveillance received the notification of 22 outbreaks of the acute form of Chagas disease in several states. Most of them proved to be associated with the ingestion of raw food, such as sugarcane juice in Santa Catarina and Bahia, bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) in Maranhão and Pará, soup in the municipality of Redenção in the state of Ceará, and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) in Pará and Amazonas (Brasil, 2005; Gontijo and Santos, 2008). However, in none of these outbreaks the route of contamination was clearly determined, although triatomines and sylvatic reservoirs infected by *T. cruzi* have been found in the regions and their feces and/or urine could have been the source of raw food contamination (Brasil, 2005).

Considering opossums the main sylvatic reservoir hosts of *T. cruzi* (Jansen et al., 1994; Schweigmann et al., 1995) and the occurrence of several orally transmitted outbreaks of Chagas disease in the last few years in Brazil, especially involving these mammals and/or sugarcane, we experimentally evaluated the possibility of *T. cruzi* transmission through sugarcane juice contaminated by this parasite isolated from the perianal glands of *Didelphis albiventris*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Area of study

This study was carried out from 2007 to 2009 in Goiânia, state of Goiás, Midwestern Region of Brazil. The laboratory exams, manipulation of *T. cruzi* strains, and culture were performed at Núcleo de Pesquisa em Parasitas Emergentes e Re-emergentes of the Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (Universidade Federal de Goiás – UFG); sugarcane plants were collected and prepared for the tests at the Agronomy School (UFG); opossums were inoculated and kept at the public Zoo of Goiânia; experiments with sugarcane and inoculation of mice were conducted in the Laboratório de Genética Molecular e Citogenética of Instituto de Ciências Biológicas (UFG); histological sections of sugarcane internodes were analyzed in the Laboratório de Anatomia Vegetal of the Instituto de Ciências Biológicas (UFG).

### 2.2. *Didelphis sp* obtention and analysis of natural infection by *T. cruzi*

The protocol of the procedures was approved by the Human and Animal Research Ethics Committee of the UFG. To verify the hypothesis of natural infection by *T. cruzi*, samples of blood and secretion from opossum perianal glands were collected from eight animals, identified as *Didelphis albiventris*. All the animals, previously captured by firefighters in different residential areas of Goiânia and sent to Centro de Tratamento de Animais Silvestres, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (CETAS/IBAMA), were donated by this institute to the public Zoo of Goiânia to participate in this experiment. The blood samples were

collected through tail vein puncture after shaving the skin and disinfecting the site with alcohol 70%. After this procedure, we collected the secretion from the animals perianal glands, which are located below the anus.

The blood samples were evaluated by microscopic observation of the capillary tube after centrifugation (microhaematocrit) (Woo, 1969; Ramirez et al., 2002), culture in liver infusion tryptose medium supplemented with 20% fetal bovine serum, processed according to Chiari et al. (1989), and PCR using the technique described by Britto et al. (1993) and Santos et al. (1993).

### 2.3. *Experimental infection of D. albiventris by T. cruzi*

The animals did not present natural infection by *T. cruzi* and were therefore experimentally infected with Y and sylvatic P12 strains of the parasite, the former obtained at the laboratory of Chagas disease at the Hospital das Clínicas de Goiânia, and the latter isolated from perianal glands of naturally infected opossums captured in the region of Perdizes, state of Minas Gerais (Ramirez et al., 2002), kindly donated by Prof. Luiz Eduardo Ramirez of the Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

We inoculated six opossums intraperitoneally with 5000 f/g of body weight, three with Y strain and three with sylvatic P12 strain of *T. cruzi*, and two animals were not treated to be used as negative control. Microhaematocrit and PCR were performed in blood samples collected from these animals 72 h, 7, 15, and 30 days after inoculation.



#### 2.4. Experimental in vitro contamination of sugarcane by *T. cruzi*

We prepared two suspensions with the same inoculum concentration ( $4 \times 10^4$  f/mL) with the secretion collected from the perianal glands of two groups of opossums, one experimentally infected with Y strain of *T. cruzi* and the other with sylvatic P12 strain.

Plants of *Saccharum* spp variety RB 867515, collected at the Agronomy School (UFG) in Goiânia, had their internodes divided into 5-cm long fragments ( $n = 25$ ), which were distributed in individual plastic containers. Using a pipette, we treated them as follows: 12 fragments inoculated with 1 mL each of the inoculum suspension containing Y strain of *T. cruzi*, 6 on the tip and 6 on the surface; 12 fragments inoculated with 1 mL each of the inoculum suspension containing sylvatic P12 strain, 6 on the tip and 6 on the surface; and one non-inoculated fragment used as negative control. At times 0, 1, 4, 6, 12, and 24 h after inoculation, sugarcane juice was extracted from each fragment using a manual grinder and its contamination was assessed by direct examination and experimental inoculation of mice.

#### 2.5. Experimental infection of mice by *T. cruzi*

We treated 135 isogenic male BALB/c mice, distributed in groups of 5 animals each, as follows: 24 groups intraperitoneally inoculated with 500  $\mu$ L of contaminated sugarcane juice ( $\cong 1000$  parasites) according to the strain of *T. cruzi* (Y and sylvatic P12), place of inoculation (6 on the tip and 6 on the surface), and time after sugarcane inoculation (0, 1, 4, 6, 12, and 24 h); two groups intraperitoneally inoculated with 500  $\mu$ L of sugarcane juice, one contaminated with Y strain and the

other with sylvatic P12 strain of *T. cruzi*, used as positive controls; and one group intraperitoneally inoculated with 500 µL of non-contaminated sugarcane juice, used as negative control. The animals were evaluated by direct examination of blood samples collected from the tail tip 5, 10, 15, and 30 days after inoculation.

Simultaneously, four sugarcane fragments were contaminated with Y and sylvatic P12 strains of *T. cruzi*, two on the tip and two on the surface, and prepared for histological examination 24 h after inoculation.

#### 2.6. *Experimental in vivo contamination of sugarcane by T. cruzi*

A sugarcane plant was cultivated in a plastic container (80 cm diameter and 25 cm depth), kept in greenhouse, protected against external contamination for approximately one year, up to the aerial part emergence. After this period, the plant was transferred to the Laboratório de Anatomia Vegetal (UFG) and 200 mL of inoculum suspension containing Y strain of *T. cruzi* ( $3 \times 10^5$  f/mL) were applied on its superficial roots near the stalk. Root, sheath, and stalk samples were collected 24 h after inoculation for histological examination.

#### 2.7. *Histological analysis of sugarcane*

Hand-cut transverse and longitudinal histological sections were performed in sugarcane internode fragments, starting in the region of inoculation (tip or surface), and in sugarcane sheath, root, and stalk by removing fragments from the first to the third internode 24 h after *in vitro* and *in vivo* inoculation with *T. cruzi*, respectively,

processed according to Johansen (1940), and embedded between glass slides and cover slips as recommended by Paiva et al. (2006).

### 3. Results

#### 3.1 Parasitological diagnosis of *Didelphis albiventris*

The eight blood and secretion samples collected from the opossums before inoculation were negative and the blood and secretion samples collected from the six opossums experimentally infected were positive for *T. cruzi* using three techniques (microhaematocrit, culture, and PCR).

#### 3.2 Analysis of sugarcane contamination by *T. cruzi*

The juice obtained from sugarcane inoculated on the tip with Y strain of *T. cruzi* produced infection in mice up to 6 h after plant contamination, showing 100% positivity up to 4 h and 80% up to 6 h (Table 1).

The juice extracted from sugarcane inoculated on the tip with sylvatic P12 strain of *T. cruzi* caused infection in mice up to 4 h after plant contamination, presenting 100% positivity at time zero, 60% up to 1 h, and 40% up to 4 h (Table 1).

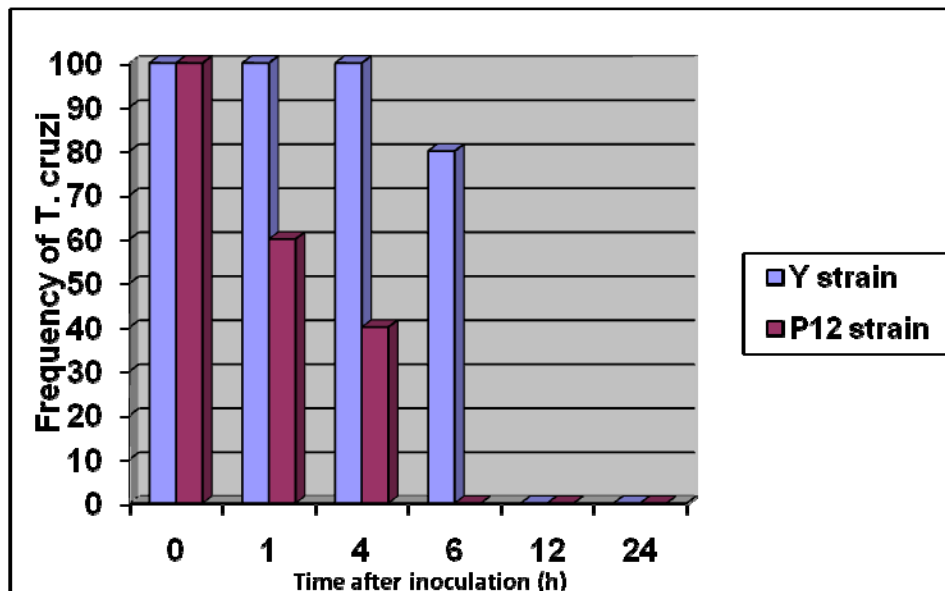
The juice obtained from sugarcane inoculated on the surface by Y and sylvatic P12 strains of *T. cruzi* did not produce infection in mice.

Y strain of *T. cruzi* presented higher infection rates than sylvatic P12 strain. Although both strains produced 100% infection in mice at time zero, Y strain continued presenting 100% infection in mice up to 4 h after plant inoculation and 80% up to 6 h, and sylvatic P12 strain showed 60% infection up to 1 h and 40% up to 4 h, not producing infection after this time (Fig. 1).

**Table 1**

Mice infected with juice obtained from sugarcane directly inoculated on the tip with Y and sylvatic P12 strains of *Trypanosoma cruzi*.

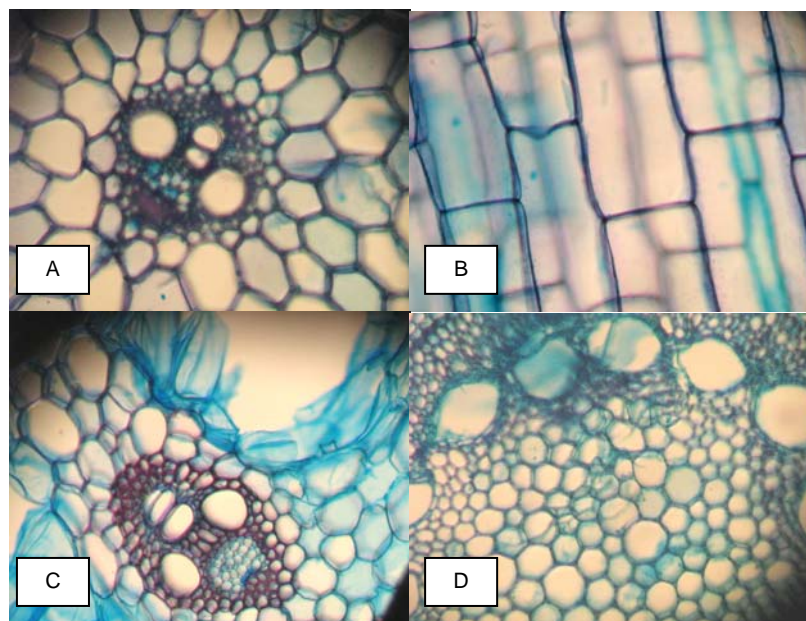
Time after sugarcane inoculation (h)	Y strain				Sylvatic P12 strain			
	Direct exam	Intraperitoneal inoculation in mice		Direct exam	Intraperitoneal inoculation in mice			
		Mice (no.)	Posit. (%)		Mice (no.)	Posit. (%)		
0	Positive	5	100	Positive	5	100		
1	Positive	5	100	Positive	5	60		
4	Positive	5	100	Positive	5	40		
6	Positive	5	80	Negative	5	0		
12	Negative	5	0	Negative	5	0		
24	Negative	5	0	Negative	5	0		



**Fig. 1.** Frequency of infection in mice contaminated with juice obtained from sugarcane directly inoculated on the tip with Y and sylvatic P12 strains of *Trypanosoma cruzi*.

### 3.3 Microscopic analysis of histological sections

The microscopic analyses of hand-cut transverse and longitudinal sections of sugarcane internode fragments, sheath, root, and stalk 24 h after *in vitro* and *in vivo* inoculation with *T. cruzi* did not show the presence of this parasite in any samples (Fig. 2).



**Fig. 2.** Hand-cut sections of sugarcane: A) Stalk – transverse section; B) Stalk – longitudinal section; C) Sheath – transverse section; D) Root – transverse section.

## 4. Discussion

The present results, showing 100% experimental infection by *T. cruzi* and high degree of opossum adaptation to this parasite, since all the experimentally infected animals survived, reinforce the importance of these marsupials as sylvatic reservoirs that can spread Chagas disease. Opossums are synanthropic animals, which are

frequently in contact with residential areas, and connect the sylvatic cycle of this disease to the parasite peridomicile areas.

To the best of our knowledge, this is a pioneer relevant study, since it is the first time mice infection has been reported after intraperitoneal administration of sugarcane juice directly inoculated on the tip with *T. cruzi* suspension prepared with secretion collected from the perianal glands of infected opossums.

The intraperitoneal contamination of mice employed in the present study does not compromise the importance of the results herein obtained when compared to the oral transmission of *T. cruzi*. Not only did this research prove that this parasite penetrates the stomach mucosa, but it also revealed high similarity between the oral and intraperitoneal infection, as already suggested by Comandaroba et al. (2002). Nonetheless, further experiments should be carried out to test different infection pathways.

As the juice obtained from sugarcane inoculated on the surface with both strains of *T. cruzi* did not produce infection in mice, we can conclude that the plant husk provided physical protection against this parasite penetration.

Although the tests performed during our study in order to elucidate *in vitro* penetration of *T. cruzi* through the natural layers of sugarcane stalks as well as *in vivo* penetration of this parasite through sugarcane roots did not present conclusive data, these hypotheses cannot be discarded without further investigations employing other methods.

Our results show that the oral transmission of *T. cruzi* by ingestion of sugarcane juice contaminated by secretion of opossum perianal glands is likely to happen and might be a public health threat. Due to this finding, we recommend that sugarcane used to produce juice must be carefully stored, mainly aiming at protecting

its tips against possible contacts with opossum secretions, especially in regions where Chagas disease is endemic.

## **Acknowledgements**

We are grateful to all the teams from: Laboratório de Parasitas Emergentes e Re-emergentes of the Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG); Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas I (UFG); Laboratório de Anatomia Vegetal ICB I (UFG); Escola de Agronomia (UFG); Laboratório de Chagas from Hospital das Clínicas de Goiânia (UFG); and Laboratório de Parasitologia of the Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

## **References**

- Brasil, 2005. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica, 4/4/05. Doença de Chagas Aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina. Brasília, DF. December 2006. Available from [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21270](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=21270).
- Britto, C., Cardoso, M.A., Wincker, P., Morel, C.M., 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88, 171–172.

- Chiari, E., Dias, J.C.P., Lana, M., Chiari, C.A., 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22, 19–23.
- Comandaroba, E.L.P., Pinheiro Lima, C.M., Andrade, S.G., 2002. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo* 44, 97–103.
- Gontijo, E.D., Santos, S.E., 2008. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Ministério da Saúde, Fiocruz. October 2008. Available from <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=173>.
- Jansen, A.M., Madeira, F.B., Deane, M.P., 1994. *Trypanosoma cruzi* infection in the opossum *Didelphis marsupialis*: absence of neonatal transmission and protection by maternal antibodies in experimental infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 41–45.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- Paiva, J.G.A., Fank-De-Carvalho, S.M., Magalhães, M.P., Graciano-Ribeiro, D., 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Bot. Bras.* 20, 257–264.
- Ramirez, L.E., Lages-Silva, E., Alvarenga-Franco, F., Matos, A., Vargas, N., Fernandes, O., Zingales, B., 2002. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop.* 84, 189–198.
- Santos, F.R., Pena, S.D.J., Epplen, J.T., 1993. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.* 90, 655–656.



- Schweigmann, N.J., Peitrokovsky, S., Bottazzi, V., Conti, O., Wisnivesky-Colli, C., 1995. Interaction between *Didelphis albiventris* and *Triatoma infestans* in relation to *Trypanosoma cruzi* transmission. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90, 679–682.
- Silva, N.N., Clausell, D.T., Núbilos, H., Mello, A.L., Ossanai, J., Rapone, T., Snell, T., 1968. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo 10, 265–276.
- Woo, P.T.K., 1969. The haematocrit centrifuge technique for the detection of trypanosomes in blood. Can. J. Zool. 47, 921–923.
- Yasuda, M.A.S., 1987. Surto epidêmico de doença de Chagas aguda em Catolé do Rocha, Paraíba. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 20, M14–M16.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

### 5.1 Conclusões

a) Constatou-se, por meio de revisão sistemática da literatura, a carência de estudos acerca da temática abordada, visto que, de acordo com a metodologia adotada, apenas um artigo científico correspondeu aos objetivos preestabelecidos;

b) Por meio do estudo experimental, constatou-se transmissão de *T. cruzi* por cana-de-açúcar contaminada através da administração intraperitoneal em camundongos, os quais mostraram positividade até 6 h após a inoculação com a cepa Y e até 4 h após a inoculação com a cepa P12 silvestre deste protozoário;

c) Por meio do estudo experimental, constatou-se também que houve transmissão de *T. cruzi* quando a cana-de-açúcar foi inoculada na extremidade com solução deste parasito e ausência de transmissão quando inoculada na superfície;

d) Não foi possível observar, por intermédio do método empregado, o potencial de penetração de *T. cruzi* nos tecidos da cana-de-açúcar *in vivo* ou a contaminação pela via radicular;

e) Os resultados obtidos permitem concluir que a transmissão de *T. cruzi* por cana-de-açúcar contaminada por secreções das glândulas perianais de gambás é possível.

### 5.2 Sugestões e recomendações

Embora constatada a carência de literatura a respeito da temática abordada, a análise dos artigos componentes da revisão sistemática foi relevante por ter mostrado a importância da cana-de-açúcar como meio viável à sobrevivência de *T. cruzi*, que constitui um veículo de transmissão da doença, assim como dos *Didelphis* sp, os quais são hospedeiros que colaboram para a disseminação da doença de Chagas.

Assim, os resultados aqui mostrados sugerem a necessidade de produção de novos estudos acerca desta temática, principalmente relacionando os termos cana-de-açúcar, *Didelphis* sp e *T. cruzi*.

O fato de os gambás (*D. albiventris*) utilizados no presente estudo não terem sido infectados naturalmente por *T. cruzi* contrasta com os altos índices de infecção relatados por outros autores, variando entre 18,7% a 91,6% em diferentes regiões da América do Sul e Central (BARRETO, 1979; FERNANDES et al., 1989; SCHWEIGMANN et al., 1995; URDANETA-MORALES; NIRONI, 1996). Essas variações nas prevalências encontradas podem ser decorrentes da sazonalidade e época em que foram realizadas as pesquisas.

Em estudo acompanhando a contaminação de *D. albiventris* por *T. cruzi* ao longo do ano, Schweigmann et al. (1999) verificaram que as taxas de infecção no fim da seca foram maiores que as da estação chuvosa, evidenciando maior intensidade de transmissão do parasito em períodos quentes da estação seca. Resultados semelhantes foram obtidos com *D. virginiana* no México (RUIZ-PIÑA; CRUZ-REYES, 2002), mostrando a existência de sazonalidade na transmissão de *T. cruzi* e contaminação dos reservatórios, o que pode estar relacionado com picos de transmissão por haver maior reprodução e dispersão dos vetores em certas épocas do ano.

Neste trabalho, a ausência de infecção natural nos gambás estudados pode ser atribuída ao fato de a região de Goiânia, em que foram capturados estes animais, ser considerada região não-endêmica para *T. cruzi*, ao pequeno número de indivíduos analisados e à época de captura dos animais, que foram obtidos na estação chuvosa (novembro a dezembro). Dessa forma, é recomendável que sejam conduzidos estudos com maior número de indivíduos, no fim da estação chuvosa e início da estação seca, para confirmar os padrões de sazonalidades obtidos nos estudos citados.

Por outro lado, o resultado de infecção experimental de 100% somado à alta adaptação dos gambás ao parasita, com sobrevivência de todos os animais infectados, reforçam a importância destes marsupiais na manutenção de focos silvestres e na disseminação de *T. cruzi*, sobretudo quando se considera que estes são animais sinantrópicos, os quais realizam incursões frequentes no ambiente doméstico e atuam como elo entre o ciclo silvestre e o peridomicílio do parasito.

Portanto, mesmo nas áreas não-endêmicas para a doença de Chagas, com baixa infestação de triatomíneos domésticos, recomenda-se que sejam tomadas certas precauções ao capturar e manipular esses mamíferos (entre eles *D. albiventris*), seus refúgios e ninhos, de modo a evitar a contaminação acidental, no campo ou no laboratório. Também faz-se necessário adotar medidas de higiene para a manipulação de alimentos que porventura possam ser contaminados por secreção, fezes ou urina desses marsupiais, o que pode levar à transmissão de *T. cruzi* por via oral.

Várias pesquisas experimentais abordando a transmissão oral do *T. cruzi* foram realizadas com gambás e outros animais utilizando alimentos, tais como caldo de cana. Todos os estudos envolvendo gambás mostraram a grande importância desses marsupiais na epidemiologia da doença. Do mesmo modo, todos os estudos com caldo da cana mostraram que este constitui um meio extremamente propício à sobrevivência do protozoário. Porém, nenhum estudo havia sido realizado correlacionando esses dois elementos: cana-de-açúcar e *T. cruzi* provenientes das glândulas perianais de *Didelphis* sp.

Assim, os resultados do presente trabalho, mostrando infecção de camundongos até 6 h (cepa Y) e 4 h (cepa P12 silvestre) por caldo de cana-de-açúcar contaminada por inoculação direta em sua extremidade com solução de *T. cruzi* proveniente de secreção recém-colhida das glândulas perianais de gambás infectados, são relevantes, visto que este estudo é pioneiro e seus dados são inéditos, sendo esta a primeira vez em que são registrados na literatura.

A ausência de infecção pelo caldo de cana-de-açúcar inoculada na superfície com as cepas Y e P12 silvestre de *T. cruzi* mostra que a casca pode servir de proteção, constituindo barreira física contra a penetração do parasito.

Os experimentos realizados na tentativa de elucidar o potencial de penetração de *T. cruzi* pelos tecidos do colmo da cana-de-açúcar (feixe fibroso do córtex, feixe fibrovascular e medula), bem como sua absorção por via radicular, não tiveram êxito com o método empregado. Possivelmente, a técnica utilizada para análise histológica não tenha sido apropriada. Sugere-se o emprego de outros métodos para avaliar a penetração de *T. cruzi* em cana-de-açúcar e verificar a possibilidade de contaminação por via radicular.

A princípio, pretendia-se realizar inclusões dos fragmentos de cana-de-açúcar em parafina nos diferentes intervalos de tempo após contaminação por *T. cruzi* (0, 1, 4, 6, 12 e 24 h) e, em seguida, obter cortes micrométricos utilizando um micrótomo. No entanto, considerando-se dificuldades imprevistas no decorrer da pesquisa, e levando-se em conta principalmente o fator tempo, tornou-se inviável o uso da referida técnica, uma vez que esta demanda maior disponibilidade de tempo, equipamento específico e pessoal qualificado. Assim, a técnica empregada neste estudo foi utilizada como a alternativa considerada mais viável no momento. Portanto, sugere-se o emprego de outras técnicas, como mencionado anteriormente, assim como a utilização de coloração específica para *T. cruzi*, tal como Giemsa, de modo a aumentar as possibilidades de sucesso da análise proposta.

Os resultados aqui apresentados mostram que a transmissão de *T. cruzi* por contaminação do colmo da cana-de-açúcar com secreções das glândulas perianais de gambás é possível. Desse modo, recomenda-se mais cautela no armazenamento da cana-de-açúcar para preparo do caldo, em especial protegendo suas extremidades (cortes transversais) contra possível contato com secreção de gambás, pois o armazenamento inadequado, principalmente nas áreas endêmicas da doença de Chagas, pode representar um risco à saúde pública.

Assim sendo, se fez válida a condução do presente estudo, pois representa uma importante contribuição para o conhecimento acerca dos mecanismos de transmissão da doença e até mesmo para os órgãos do governo quanto a possíveis decisões para a adoção de novas medidas de prevenção e controle da doença de Chagas. Diante dessas evidências, há necessidade de reavaliar a estratégia de vigilância que vem sendo aplicada nos últimos anos e de visitar as áreas em que há histórico de invasão de triatomíneos e reservatórios silvestres.

Entretanto, no momento, não são esperadas melhorias na vigilância entomológica, com maior frequência de visitas domiciliares, estudos de ambientes domésticos e silvestres e associações entre os órgãos do governo e pesquisadores da área, pois os recursos financeiros para o controle da doença de Chagas ficam cada vez mais escassos, havendo também carência de pessoal qualificado e de materiais de trabalho, o que prejudica quaisquer ações de vigilância.

## REFERÊNCIAS

---

ALHO, C. J. R.; PEREIRA, L. A.; PAULA, A. C. Patterns of habitat utilization by small mammal populations in Cerrado biome of Central Brazil. **Mammalia**, Paris, v. 50, n. 4, p. 447–460, 1986.

ALVARENGA, N. J.; MARSDEN, P. D. Estudos sobre a persistência da infectividade do *Trypanosoma cruzi*. I. Efeito da temperatura sobre a infectividade de flagelados da amostra peruana de *T. cruzi* obtidas de fezes de triatomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 9, p. 283–287, 1975.

AMATO NETO, V.; LEONHARDT, H.; SOUZA, H. B. W. T. Liofilização de plasma: medida capaz de evitar a transmissão da doença de Chagas em bancos de sangue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 122–124, 1960.

AMATO NETO, V.; PASTERNAK, J.; MATSUBARA, I.; HAMMERSCHLAK, N.; CARIGNANI, F. L. Tentativas de uso de raios gama para prevenir a infecção transfusional pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 29, p. 613–614, 1996.

AMATO NETO, V.; SANTOS, R. R.; GIOIA, I. Estudo experimental sobre o congelamento do plasma e implicações referentes à transmissão da doença de Chagas em serviços de hemoterapia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 9, p. 129–132, 1975.

BAR, M. E.; ALVAREZ, B. M.; OSCHEROV, E. B.; DAMBORSKY, M. P.; JÖRG, M. E. Contribución al conocimiento de los reservorios del *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) en la Provincia de Corrientes, Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 3, p. 271–276, 1999.

BARRETTO, M. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. (Org.). ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p 89–151.

BIREME. **Biblioteca Virtual em Saúde**. São Paulo: Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde, 2008. Disponível em: <<http://www.bireme.br>>. Acessado em: 13 out. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília, DF, 2005. Disponível em:

<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia\\_Vig\\_Epid\\_novo2.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf)>. Acesso em: 22 out. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica - 24/3/2005. **Doença de Chagas Aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina**. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <[http://189.28.128.100/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21266](http://189.28.128.100/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21266)>. Acesso em: 12 nov. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica, 29 de julho de 2006. **Surto de Doença de Chagas Agudo (DCA) em Santarém/Pará - junho de 2006**. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=24541](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24541)>. Acesso em: 12 nov. 2008.

BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. 1961. 90 f. Tese (Livre Docência)–Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1961.

BRENER, Z. O parasito: relações hospedeiro-parasito. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. (Org.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 1–41.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; WINCKER, P.; MOREL, C. M. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 1, 171–172, 1993.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 6, p. 93–100, 1964.

CERISOLA, J. A.; RABINOVICH, A.; ALVAREZ, M.; DI CORLETO, C. A.; PRUNEDA, J. Enfermedad de Chagas y la transfusion de sangre. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, Washington, DC, v. 73, p. 203–223, 1972.

CHAGAS, C. 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schozotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M.; CHIARI, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 22, n. 1, p. 19–23, 1989.

CHOUDHARY, D.; JANSSON, I.; STOILOV, I.; SARFARAZI, M.; SCHENKMAN, J. B. Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 436, n. 1, p. 50–61, 2005.

COMANDAROBA, E. L. P.; PINHEIRO, L. M.; ANDRADE, D. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, p. 97–103, 2002.

CUNHA-NETO, E.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; KALIL, J. Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 5, p. 217–229, 1995.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 513–515, 1984.

DEDET, J. P.; CHIPPAUX, J. P.; GOYOT, P.; PAJOT, F. X.; TIBAYRENC, M.; GEOFFROY, B.; GOSSELIN, H.; JACQUET-VIALET, P. Natural hosts of *Trypanosoma cruzi* in French Guiana. High endemicity of zymodeme 1 in wild marsupials. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, Paris, v. 60, n. 2, p. 111–117, 1985.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 81–111.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. (Ed.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 48–74.

DIAS, J. C. P. Epidemiology of Chagas disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. (Org.). **Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. São Paulo: ISBT, 1992. p. 49–80.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, Supl. 1, p. S13–S22, 2007.



DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 370–375, 2006.

DÍAZ-UNGRÍA, C. Estúdio experimental del *Trypanosoma cruzi* em el perro y otros vertebrados. El problema de la transmisión. **Kasmera**, Maracaibo, v. 3, p. 73–88, 1968.

DIOTAIUTI, L. A.; PEREIRA, S.; LOIOLA, C. F.; FERNANDES, A. J.; SCHOFIELD, J. C.; DUJARDIN, J. P.; DIAS, J. C. P.; CHIARI, E. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 4, p. 443–448, 1995.

DVORAK, J. *T. cruzi*-vertebrate cell interaction. In: PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **New approaches in American trypanosomiasis research**. Washington, DC, 1976. p. 109–120. (PAHO. Scientific Publication, 318).

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. Chicago: University of Chicago, 1990.

ESTADO DO CEARÁ. Secretaria da Saúde, Coordenadoria de Políticas em Saúde, Núcleo de Epidemiologia, Núcleo de Controle de Endemias. Nota técnica 14.mar.2006. **Surto de doença de Chagas em Redenção**. Fortaleza, 2006.

Disponível em:

<[http://www.saude.ce.gov.br/internet/publicacoes/notastecnicas/nota\\_tecnica\\_chagas.pdf](http://www.saude.ce.gov.br/internet/publicacoes/notastecnicas/nota_tecnica_chagas.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2008.

FERNANDES, A. J.; DIOTAIUTI, L.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Infecção natural de gambás (*Didelphis albiventris*) pelo *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí-MG. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 87–93, 1989.

FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, F. F. Perspectiva de vacinação contra a moléstia de Chagas. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 16., Ribeirão Preto, 1964. **Anais...** São Paulo: SBPC, 1964.

FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, London, v. 118, p. 161–166, 1999.

GARCIA-ZAPATA, M. T. A; MARSDEN, P. D. Chagas' disease. **Clinics in Tropical Medicine and Communicable Diseases**, Eastbourne, v. 1, p. 557–585, 1986.

GONZÁLES, C. S.; DURANTE, E. I. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. In: STORINO, R.; MILEI, J. (Org.). **Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Doyma Argentina, 1994. p. 31–40.

GRISARD, E. C.; CARVALHO-PINTO, C. J.; SCHOLZ, A. F.; TOMA, H. K.; SCHLEMPER JÚNIOR., B. R.; STEINDEL, M. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis marsupialis* in Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 6, p. 795–800, 2000.

GUTTERIDGE, W. E. Biochemistry of *Trypanosoma cruzi*. In: PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **New approaches in American trypanosomiasis research**. Washington, DC, 1976. p. 135–140. (PAHO. Scientific Publication, 318).

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 85–108.

LUZ, Z. M. P.; COUTINHO, M. G.; CANÇADO JÚNIOR, R., KRETTLI, A. U. L. Hemocultura: técnica sensível na detecção de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 27, n. 1, p. 134–138, 1994.

MARCONDES, C. B. Surto de doença de Chagas, de provável contaminação oral, em Catolé do Rocha (Paraíba): encontro de *Didelphis albiventris* naturalmente infectado. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 21, Supl. 1, p. 31, 1988.

MELLO, D. A. Aspectos do ciclo silvestre do *Trypanosoma cruzi* em regiões do cerrado (Município de Formosa, Goiás). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 3, p. 227–246, 1981.

OLIVEIRA, F. C. G. **Avaliação preliminar de impacto ambiental sobre a fauna de pequenos mamíferos e suas taxas de infecção por *Trypanosoma cruzi* e hantavírus na área de influência da usina hidrelétrica Espora, Aporé – GO**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde)–Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2008.

PAIVA, J. G. A.; FANK-DE- CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 257–264, 2006.

PAIVA, M. G. S.; CHAPLIN, E. L.; STOBBE, N. S.; ARAÚJO, F. A. P.; SILVA, N. R. S. Utilização do *Didelphis marsupialis* como animal de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 213–216, 1992.

PINHO, A. P.; CUPOLILLO, E.; MANGIA, R. H.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, n. 5, p. 509–514, 2000.

PINTO, A. Y. N.; HARADA, G. S.; VALENTE, V. C.; ABUD, J. E. A.; GOMES, F. S.; SOUZA, G. C. R.; VALENTE, S. A. S. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 5, p. 413–419, 2001.

RAMIREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E.; ALVARENGA-FRANCO, F.; MATOS, A.; VARGAS, N.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 84, n. 3, p. 189–198, 2002.

RASSI, A.; AMATO NETO, V.; RASSI, G. G.; AMATO, V. S.; RASSI JÚNIOR, A.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, S. G. Busca retrospectiva da transmissão materna da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 6, p. 485–489, 2004.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, R. D.; GARCIA, T. A. R.; BONOMO, W. C. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 51–54, 1987.

RIVERA, E. A. B.; AMARAL, M. H.; NASCIMENTO, V. P. **Ética e bioética aplicada à medicina veterinária**. Goiânia: Gráfica da UFG, 2006.

RUIZ-PIÑA, H.; CRUZ-REYES, A. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatan, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 613–620, 2002.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetics**, Berlin, v. 90, n. 6, p. 655–656, 1993.

SCHWEIGMANN, N. J.; PEITROKOVSKY, S.; BOTTAZZI, V.; CONTI, O.; BUJAS, M. A.; WISNIVESKY-COLLI, C. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in opossum (*Didelphis albiventris*) in Santiago del Estero, Argentina. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, DC, v. 6, n. 6, p. 371–377, 1999.

SCHWEIGMANN, N.J., PEITROKOVSKY, S., BOTTAZZI, V., CONTI, O., WISNIVESKY-COLLI, C. Interaction between *Didelphis albiventris* and *Triatoma infestans* in relation to *Trypanosoma cruzi* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 6, p. 679–682, 1995.

SILVA, N. N.; CLAUSELL, D. T.; NÚBILOS, H.; MELLO, A. L.; OSSANAI, J.; RAPONE, T.; SNELL, T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 10, p. 265–276, 1968.

SILVEIRA, A. C.; ARIAS, A. R.; SEGURA, E.; GUILLÉN, G.; RUSSOMANDO, G.; SCHENONE, H.; DIAS, J. C. P.; PADILHA, J. V.; LORCA, M.; SALVATELLA, R. **El control de la enfermedad de Chagas em los países del Cono Sur de América: historia de una iniciativa internacional, 1991/2001**. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 2002.

SOLIS-FRANCO, R. R.; ROMO-ZAPATA, J. A.; MARTINEZ-IBARRA, J. A. Wild reservoirs infected by *Trypanosoma cruzi* in the ecological park El Zapotal, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 2, p. 163–164, 1997.

STORINO, R.; JÖRG, M. E. Vias de infeccion y aspectos clínicos. In: STORINO, R.; MILEI, J. (Org.). **Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Doyma Argentina, 1994. p. 132–141.

URDANETA-MORALES, S.; NIRONI, I. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums. Isolation and experimental infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, p. 399–403, 1996.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. I, p. 395–398, 1999.

WISNIVESKY-COLLI, C.; SCHWEIGMANN, N. J.; ALBERTI, A.; PIETROKOVSKY, S. M.; CONTI, O.; MONTOYA, S.; RIARTE, A.; RIVAS, C. Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 86, n. 1, p. 38–41, 1992.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the detection of trypanosomes in blood. **Canadian Journal of Zoology**, v. 47, n. 5, p. 921–923, 1969.

YASUDA, M. A. S. Surto epidêmico de doença de Chagas aguda em Catolé do Rocha, Paraíba. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 20, Supl. 2, p. M14–M16, 1987.

## APÊNDICE

### Apêndice 1 – Parecer do Comitê de Ética

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG N.º 159/2007

Goiânia, 21/11/2007

**INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES):** Dr. Marco Túlio A. Garcia Zapata

**TÍTULO:** “Avaliação experimental da contaminação da cana de açúcar pelo trypanossona cruzi”

**Área Temática:** Grupo III

**Local de Realização:** IPTSP/UFG


Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas **aprovou sem restrições** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

→ Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

→ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

→ O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*)

  
**Farm. José Mário Coelho Moraes**  
**Coordenador do CEPMHA/HC/UFG**

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74 605-050 - FONE: 3269 8338 - FAX: 3269 8426  
GOLÂNIA - GOIÁS

## ANEXOS

---

### Anexo 1 – Normas de publicação do periódico Cadernos de Saúde Pública



CADERNOS DE SAÚDE PÚBLICA  
REPORTS IN PUBLIC HEALTH

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

ISSN 0102-311X *printed*  
*version*

ISSN 1678-4464 *online*  
*version*

[Escope and policy](#)

[Format and preparation of manuscripts](#)

[Sending manuscript for submission](#)

#### Escope and policy

**Cadernos de Saúde Pública/Reports in Public Health (CSP)** publishes original articles of superior scientific merit that contribute to the study of public health in general and related disciplines.

#### Format and preparation of manuscripts

We recommend that authors read the following instructions carefully before submitting their manuscripts to **Cadernos de Saúde Pública**.

##### 1. CSP accepts articles for the following sections:

- 1.1 **Literature reviews** – critical reviews of the literature on themes pertaining to public health (maximum 8,000 words and 5 figures);
- 1.2 **Articles** – results of empirical, experimental, or conceptual research (maximum 6,000 words and 5 figures);
- 1.3 **Notes** – advance notes reporting on partial or preliminary research results (maximum 1,700 words and 3 figures);
- 1.4 **Book reviews** – critical reviews of books related to the thematic scope of CSP, published in the previous two years (maximum 1,200 words);

**1.5 Letters** – critiques of articles published in previous issues of CSP (maximum 1,200 words and 1 figure);

**1.6 Debate** – theoretical articles accompanied by critical letters signed by authors from other institutions and invited by the Editor, followed by a reply from the author of the main article (maximum 6,000 words and 5 figures);

**1.7 Forum** – section that publishes sets of 2 to 3 interrelated articles by different authors, on a theme of current interest (maximum 12,000 words for the combined articles). Authors interested in submitting work to this section should consult the CSP Editorial Board.

## **2. Presentation of manuscripts**

**2.1** CSP only considers publishing original, previously unpublished manuscripts that are not being reviewed simultaneously for publication by any other journal. Authors must state these conditions in the submission process. In case previous publication or simultaneous submission to another journal is identified, the article will be rejected. Duplicate submission of a scientific manuscript constitutes a serious breach of ethics by the author(s).

**2.2** Submissions are accepted in Portuguese, Spanish, or English.

**2.3** Footnotes and attachments will not be accepted.

**2.4** The word count includes the body of the text and references as specified in item 12.13.

## **3. Publication of clinical trials**

**3.1** Manuscripts presenting partial or complete results of clinical trials must include the number and name of the agency or organization where the clinical trial is registered.

**3.2** This requirement complies with recommendations by BIREME/PAHO/WHO on the Registration of Clinical Trials to be published based on the guidelines of the World Health Organization (WHO), the [International Committee of Medical Journal Editors](#), and the ICTPR Workshop.

**3.3** Agencies and organizations that register clinical trials according to ICMJE criteria include:

a) [Australian New Zealand Clinical Trials Registry \(ANZCTR\)](#)



- b) [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov)
- c) [International Standard Randomised Controlled Trial Number \(ISRCTN\)](https://www.isrctn.com/)
- d) [Nederlands Trial Register \(NTR\)](https://www.trialregister.nl/)
- e) [UMIN Clinical Trials Registry \(UMIN-CTR\)](https://www.umin.ac.jp/)
- f) [WHO International Clinical Trials Registry Platform \(ICTRP\)](https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform/)

#### **4. Funding sources**

**4.1** Authors must disclose all sources of institutional or private funding or support for conducting the study.

**4.2** Suppliers of free or discount materials or equipment should be disclosed as funding sources, including the origin (city, state, and country).

**4.3** If the study has been performed without institutional and/or private funding, the authors should state that the research did not receive any funding.

#### **5. Conflicts of interests**

**5.1** Authors must disclose any potential conflicts of interest, including political and/or financial interests associated with patents or property and manufacturer's supply of materials and/or inputs and equipment used in the study.

#### **6. Authors**

**6.1** The various authors' individual contributions to the elaboration of the article should be specified.

**6.2** We emphasize that the authorship criteria should be based on the uniform requirements of the [International Committee of Medical Journal Editors](https://www.icmje.org/), which establish the following: recognition of authorship should be based on substantial contributions to the following: 1. conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3. final approval of the version to be published. Authors should meet all three conditions.

#### **7. Acknowledgements**

**7.1** Potential acknowledgements include institutions that in some way allowed or facilitated the research and/or persons that collaborated with the study but fail to meet the authorship criteria.

## **8. References**

**8.1** References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text. They should be identified by superscript Arabic numerals (e.g.: Silva <sup>1</sup>). References cited only in tables and figures should be numbered starting after the last reference cited in the text. Cited references should be listed at the end of article, in numerical order, following the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (<http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine/>).

**8.2** All references should be presented in correct and complete form. The veracity of the information contained in the list of references is the responsibility of the author(s).

**8.3** In case any reference management software like EndNote is used, the author(s) should convert the references to text.

## **9. Nomenclature**

**9.1** The manuscript should comply with the rules of zoological and botanical nomenclature, as well as with the abbreviations and conventions adopted in the specialized fields.

## **10. Ethics in research involving human subjects**

**10.1** The publication of articles with results of research involving human subjects is conditioned on compliance with the ethical principles contained in the [Helsinki Declaration](#) (1964, revised in 1975, 1983, 1989, 1996, and 2000), of the World Medical Association.

**10.2** In addition, the research must comply with the specific legislation (when existing) of the country in which the research was performed.

**10.3** Articles that present the results of research involving human subjects must contain a clear statement of this compliance (this statement should be the last paragraph of the manuscript's Methodology section).

**10.4** After the manuscript is accepted for publication, all the authors must sign a specific form, to be provided by the Editorial Secretariat of CSP, stating their full compliance with the ethical principles and specific legislations.

**10.5** The Editorial Board of CSP reserves the right to request additional information on the ethical principles adopted in the research.

## **Sending manuscript for submission**

### **11. On-line submission process**

**11.1** Articles should be submitted electronically through the System for Article Review and Management (SAGAS), available at: <http://www.ensp.fiocruz.br/csp/>. No other forms of submission will be accepted. The following are complete instructions for submission. In case of doubt, kindly contact the SAGAS support system at the following e-mail: [csp-artigos@ensp.fiocruz.br](mailto:csp-artigos@ensp.fiocruz.br).

**11.2** The author should begin by entering SAGAS at <http://www.ensp.fiocruz.br/csp/>. Next, key in the user name and password to go to the restricted article management area. New users of SAGAS should register through the "Register" link on the homepage. In case you have forgotten your password, request that it be sent automatically as follows: "Forget your password? Click here."

**11.3** For new users of SAGAS. After clicking on "Register", you will be directed to the SAGAS registry. Key in your name, address, e-mail, telephone, and institution.

### **12. Sending the article**

**12.1** On-line submission is done in the restricted article management area <http://www.ensp.fiocruz.br/csp/>. The author should access "Author Central" and select the link "Submit a new article".

**12.2** The first stage in the submission process consists of checking the CSP Instructions to Authors.

The manuscript will only be considered by the CSP Editorial Secretariat if it meets all the uniform requirements for publication.

**12.3** During the second stage, all data referring to the article will be keyed in: title, running title, field, key words, disclosure of funding and conflicts of interest, abstract in the original language and English, and acknowledgements when necessary. If they wish, authors may suggest potential consultants (name, e-mail, and institution) whom they consider capable of reviewing the manuscript.

**12.4** The complete title (in the original language and English) should be concise and informative, with a maximum of 150 characters with spaces.

**12.5** The running title (in the original language) may contain a maximum of 70 characters with spaces.

**12.6** The key words (minimum of 3, maximum of 5, in the article's original language) should appear in the Biblioteca Virtual em Saúde/Virtual Health Library (BVS), available at: <http://decs.bvs.br/>.

**12.7** *Abstract.* With the exception of contributions submitted to the Book Review or Letters sections, all articles submitted in Portuguese or Spanish should include an abstract in the original language and in English. Articles submitted in English should include an abstract in Portuguese or Spanish, in addition to the abstract in English. The abstract should have a maximum of 1,100 characters with spaces.

**12.8** *Acknowledgements.* The acknowledgements of institutions and/or individuals may contain a maximum of 500 characters with spaces.

**12.9** The third stage includes the full name(s) of the article's author(s) and respective institutions(s), with the complete address, telephone, and e-mail, as well as a specification of each author's contribution. The author that registers the article will automatically be included as an author. The order of the authors' names should be the same as in the publication.

**12.10** The fourth stage is the file transfer with the body of the text and references.

**12.11** The file containing the manuscript text should be formatted in DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format), or ODT (Open Document Text), and may not exceed 1 MB.

**12.12** The text should be formatted with 1.5 cm spacing, font Times New Roman, size 12.

**12.13** The text file should contain only the body of the article and the bibliographic references. The following items should be inserted in separate fields during the submission process: abstract in the original language and English; name(s) of the author(s), plus institutional affiliation or any other information that identifies the author(s); acknowledgments and contributions; illustrations (photographs, flowcharts, maps, graphs, and tables).

**12.14** The fifth stage includes transferring the files with the article's illustrations (photographs, flowcharts, maps, graphs, and tables), when necessary. Each illustration should be sent in a separate file, clicking on "Transfer".

**12.15** Illustrations. Illustrations should be kept to a minimum, allowing a maximum of five (photographs, flowcharts, maps, graphs, and tables).

**12.16** Authors will cover the costs of illustrations beyond the maximum number of five, as well as any extra costs for publishing color figures.

**12.17** Authors should obtain written authorization from any respective copyright holders to reproduce previously published illustrations.

**12.18** Tables. Tables may be 17cm wide, considering a size 9 font. They should be submitted in text file: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format), or ODT (Open Document Text). Tables should be numbered (Arabic numerals) according to the order in which they appear in the text.

**12.19** Figures. The following types of figures will be allowed by CSP: Maps, Graphs, Satellite Images, Photographs, Flow Diagrams, and Flowcharts.

**12.20** Maps should be submitted in vector format , and the following types of files are allowed: WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript), or SVG (Scalable Vectorial Graphics). Note: maps originally generated in raster or image format and later exported to vector format will not be accepted.

**12.21** Graphs should be submitted in vector format and will be allowed in the following types of files: XLS (Microsoft Excel), ODS (Open Document Spreadsheet), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript), or SVG (Scalable Vectorial Graphics).

**12.22** Satellite images and photographs should be submitted in the following types of files: TIFF (Tagged Image File Format) or BMP (Bitmap). Minimum resolution should be 300dpi (dots per inch), with a minimum width of 17.5cm.

**12.23** Flow diagrams and flowcharts should be submitted in text file or in vector format and will be allowed in the following types of files: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format), ODT (Open Document Text), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript), or SVG (Scalable Vectorial Graphics).

**12.24** Figures should be numbered (Arabic numerals) according to the order in which they appear in the text.

**12.25** Titles and legends of figures should be presented in a text file separate from the figure files.

**12.26** Vector format. A vector drawing is generated based on geometric descriptions of shapes and normally consists of curves, ellipses, polygons, text, and other elements, i.e., using mathematical vectors for its description.

**12.27** Completion of Submission. Upon completing the entire file transfer process, click on "Complete Submission".

**12.28** Confirmation of Submission. After completing the submission, the author will receive an e-mail message confirming receipt of the article by CSP. In case you do not receive the e-mail confirmation within 24 hours, contact the CSP Editorial Secretariat by e-mail: [csp-artigos@ensp.fiocruz.br](mailto:csp-artigos@ensp.fiocruz.br).

### **13. Monitoring the article review process**

**13.1** Authors can monitor the article's editorial flow through the SAGAS system. Decisions on the article will be communicated by e-mail and made available in the SAGAS system.

**13.2** Contacts with the CSP Editorial Secretariat should be via the SAGAS system.

### **14. Sending new versions of articles**

**14.1** New versions of the article may be submitted by using the restricted article management area in the SAGAS system, accessing the article and clicking on the "Submit New Version".

### **15. Electronic page proof**

**15.1** Following acceptance of the article, an electronic page proof will be sent to the corresponding author by e-mail. Adobe Reader is needed to view the proof. This software can be downloaded free of cost from:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

**15.2** The revised proof and properly signed declarations should be sent to the CSP Editorial Secretariat by e-mail ([cadernos@ensp.fiocruz.br](mailto:cadernos@ensp.fiocruz.br)) or fax +55(21)2598-2514 within 72 hours after receipt by the corresponding author.

## **Anexo 2 – Normas de publicação do periódico Acta Tropica**

### Guide for authors

*Acta Tropica* publishes original research papers, short communications and review articles. Original papers should normally not exceed 10 printed pages including Tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to *Acta Tropica* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to *Acta Tropica* carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

### Submission of articles

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the <http://authors.elsevier.com/> page of this journal you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. The above represents a very brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this "Guide for Authors" section from the site for reference in the subsequent stages of article preparation.

### Journal Scope.

The content of papers submitted must fall within the Journal Scope as stated on the website:

[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/506043/description#description](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506043/description#description)

Manuscripts based on parasite/microbe or vector inhibition experiments with crude extracts or fractions, where the active ingredients are not defined, will normally not be accepted.

Original papers should be organized as follows:

Abstract

Keywords

Introduction

Material (or Patients) and Methods

Results

Discussion

Acknowledgements, References.

(a) Manuscripts should be complete in all respects and be typewritten with double spacing and wide margins. The metric system is to be used throughout.

(b) Manuscripts must be checked carefully before submission. No changes will be allowed at the proof stage.

(c) The title page should be supplied as a separate sheet and include: title, the names, affiliations and complete postal addresses of all authors. One corresponding author is to be designated, with a telephone and/or telex (and FAX) number and (where appropriate) an e-mail number.

(d) An abstract, of not more than 5% of the length of the article, should be provided.

(e) Key words (indexing terms), normally 3.6 items, should be provided.

References should be assembled alphabetically on a separate sheet. In the text they should be referred to by name and year (Harvard System), the year being placed in parentheses, e.g., (Jones, 1970). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. Literature references must consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper.

Periodicals, books and multi-author books should be in accordance with the following examples.



Musaka, R.A., Nayambati, V.M., Nantulya, V.M., Majiwa, P.A.O., Molloo, S.K. and Musoke, A.J.; 1988. The chromosome profiles of Trypanosoma congolense isolates from Kilifi, Kenya and their relationship to serodeme identity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 105.112.

Garcia, L.S. and Bruckner, D.A.; 1988. *Diagnostic Medical Parasitology. Histological Identification of Parasites.* Elsevier Sci. Publ. Co. Inc., New York, NY, pp. 326.334.

Scorza, J.V., Medina, R., Pérez, H. and Hernández, A.G.; 1985. Leishmaniasis in Venezuela. In: K.-P. Chang and R.S. Bray (Eds.), *Human Parasitic Diseases, Vol. 1, Leishmaniasis,* Elsevier, Amsterdam, pp. 283.296.

Journal titles should be abbreviated according to the List of Serial Title Word Abbreviations (available from International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8). References concerning unpublished data should not be cited in the reference list; work accepted for publication should be referred to as in press. Incomplete references can result in publication delay.

Instructions for authors regarding GenBank/DNA sequence linking DNA sequences and GenBank Accession numbers Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. A1631510, A1631511, A1632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. A1631510, A1631511, A1632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Tables should be typed on separate sheets with double spacing, numbered consecutively, with Arabic numerals and not contain any vertical lines. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Figures must be suitable for high-quality reproduction. Line drawings should be in India ink on drawing or tracing paper, or be very sharp, well-contrasting prints on glossy paper suitable for immediate reproduction. Lettering should be complete, of professional quality and of a size appropriate to that of the illustration or drawing, taking into account the necessary reduction in size. Halftone illustrations must be presented as black and white prints, showing as much contrast as possible, in three complete sets. In the first two sets, labels and explanatory marks to be added should be indicated with black or white transfer letters. Photographs must be arranged into groups and mounted on white card in a camera-ready form (maximum size 12.5 × 20 cm). Figure numbers should not be placed on the photographs themselves, but at the side of the corresponding figure. The third set should comprise the photographs only, unmounted, with no additions at all and numbered on the back. Figure legends should be typed double-spaced on a separate sheet.

Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides.

Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that

these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

All figures should be clearly marked on the reverse side with the number, orientation (if necessary) and author's name; use a soft pencil or felt-tipped pen for marking photographs.

Page charges. There will be no page charges.

Proofs. One set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned to the Publisher within 3 days of receipt. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a 'watermarked' version of the published article and includes a coversheet with the journal cover image and a disclaimer outlining terms and conditions of use. An order form will be sent to the author enabling further offprints to be ordered at prices listed on the form.

Author enquiries: Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature at. <http://authors.elsevier.com/>

Full details for the electronic submission of artwork can be obtained from <http://authors.elsevier.com> .

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier Japan, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106; Tel. (03)-5561-5032; Fax: (03)-5561-5045.