

Segundo Amarille Salezzi Fiorani

LESÕES DOS ÓRGÃOS GENITAIS INTERNOS E DAS GÔNADAS
NA TRIPANOSOMÍASE AGUDA EXPERIMENTAL DO CAMUNDON-
GO E SUAS POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES PATOGENÉTICAS.

1 9 7 3

Segundo Amarille Salezzi Fiorani

LESÕES DOS ÓRGÃOS GENITAIS INTERNOS E DAS GÔNADAS
NA TRIPANOSOMÍASE AGUDA EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO
GO E SUAS POSSÍVEIS IMRLICAÇÕES PATOGENÉTICAS.

Tese de Doutorado apresenta
tada ao Instituto de Biolo-
gia da Universidade Estadual
de Campinas.

1 9 7 3

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais

André e Ida

à minha esposa

Maria Helena,

ao André e à Paula

Queremos consignar os nossos agradecimentos:

- Ao Professor Dr. Fritz Köberle pela preciosa atenção e pelo verdadeiro espírito universitário de colaboração;
- Ao Professor Dr. Affonso Luiz Ferreira pela orientação;
- Ao Professor Dr. Aureo José Ciconelli pelo constante estímulo científico-profissional;
- Ao Professor Dr. José Mello de Oliveira pelo auxílio na confecção das fotomicrografias;
- Ao Dr. Júlio Sudário Guimarães pelo comando do nosso Serviço nas horas de nossa ausência;
- Ao Bacharel Hélio Romualdo Rocha, pelo competente auxílio técnico.

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	04
1. Animais	04
2. Inoculação e controle parasitêmico	04
3. Sacrifício dos animais e colheita do material para estudo histológico	05
4. Técnicas histológicas	05
RESULTADOS	07
1ª) Lesões do tecido adiposo justa-epi didimário	07
2ª) Lesões e parasitismo do epidídimo	11
3ª) Lesões da próstata, vesículas semi nais, glândulas coaguladoras e con duto deferente	16
4ª) Lesões do testículo	30
5ª) Lesões dos neurônios do gânglio pélvico justa-prostático	34
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

I N T R O D U Ç Ã O

A revisão da literatura especializada a respeito dos diferentes aspectos relacionados com a Moléstia de Chagas e sobre a sua patogenia, revelou, surpreendentemente uma acentuada discrepância entre o número de trabalhos referentes a órgãos do aparelho digestivo, nervoso e cardiovascular e os trabalhos sobre órgãos do aparelho genital. As lesões dos órgãos do aparelho reprodutor no homem ou experimentalmente induzidas em animais de laboratório foram pouco investigadas e são, também, escassos os nossos conhecimentos sobre sua patogenia.

Desde a descrição pioneira de GASPAR VIANNA (1911) que assinalou o parasitismo e as lesões do trato genital em cobaias infectados com Trypanosoma cruzi, poucos pesquisadores se preocuparam com o problema.

FERREIRA e MEIRA DE OLIVEIRA (1965) observaram uma significativa diminuição do volume do sêmem de ratos, inoculados experimentalmente.

FERREIRA (1968), demonstrou as lesões testiculares e epididimárias em cobaias, na fase tardia da Moléstia de Chagas experimental.

OKUMURA (citado por HADDAD e RAIA, 1969), refere que a inoculação experimental de Trypanosoma cruzi em camundongos determina "alterações plexulares ao nível dos plexos prostáticos e das vesículas seminais", pelo encontro de ninhos de leishmâ

nias nesses órgãos.

Na espécie humana existe apenas uma referência específica de orquite em um caso de autópsia de portador de cardiopatia chagásica.

HARTZ e TOLEDANO (1954), referem orquite específica em autópsia de um caso de cardiopatia chagásica.

As outras referências à respeito de alterações funcionais da esfera genital em portadores de megacolon adquirido são presuntivas de que estejam relacionadas quer a problemas de ordem cirúrgica quer à própria moléstia de Chagas.

HADDAD e cols. (1959), investigaram a atividade sexual de 40 indivíduos com megacolon adquirido e submetidos à retosigmoidectomia abdomino-perineal.

Os autores evidenciaram que a Moléstia determina, em vários casos, alterações na fisiologia sexual, não imputáveis à cirurgia. Admitem, como causa, alterações do sistema nervoso autônomo que seriam semelhantes às encontradas nos plexos intestinais, como a causa das disfunções.

HADDAD e RAIÁ (1969), em trabalho sobre alterações sexuais após o tratamento cirúrgico do megacolon congênito e adquirido, admitem que diferentes técnicas operatórias poderiam ser responsabilizadas por alterações funcionais dos órgãos geni

tais, bem como a Doença de Chagas.

A literatura aqui relacionada corresponde ao montante de trabalhos realizados sobre o assunto!

Pode-se verificar assim, que GASPAR VIANNA demonstrou pela primeira vez o parasitismo do testículo e do epidídimo em cobaias, na fase aguda; FERREIRA e MEIRA DE OLIVEIRA, a redução do volume do sêmem em ratos, também na fase aguda. Além desses trabalhos, nos quais a patogenia não é referida como relacionada à destruição neuronal, acrescenta-se o trabalho de FERREIRA, na fase tardia, em cobaias, demonstrando a lesão de neurônios do plexo pélvico justa-prostático, bem como a degeneração de fibras nervosas autônomas do epidídimo.

Faltaria, pois, demonstrar, na fase aguda, as lesões neuronais e o parasitismo de maneira sistematizada, dos órgãos genitais.

Evidentemente seria desejável que esses problemas fossem estudados na espécie humana. Entretanto, por razões de ordem prática, ética e técnica torna-se imperativo o emprego da experimentação em animais.

Em face do exposto, concluimos pela necessidade de um estudo experimental detalhado do parasitismo dos órgãos genitais e das estruturas nervosas periféricas com eles relacionados, na fase aguda da Moléstia de Chagas, visando elementos que permitam esclarecer de maneira definitiva a patogenia das alterações genitais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Na presente pesquisa utilizamos 25 camundongos machos, de 50 dias de idade, com cerca de 31 g de peso.

Desse grupo, 18 animais foram infectados experimentalmente com Trypanosoma cruzi e se constituíram no grupo inoculado. Os restantes (7 animais), foram mantidos nas mesmas condições de alimentação e ambientais e se constituíram no grupo controle.

2. INOCULAÇÃO E CONTROLE PARASITÊMICO

A inoculação dos animais foi feita pela via intraperitoneal recebendo cada animal, 0,4 ml de sangue, obtido por punção cardíaca de camundongos mantidos para replicagem da cepa, na secção de Patologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A cepa de Trypanosoma cruzi empregada foi a cepa Y, isolada através de xenodiagnóstico de um caso agudo de Moléstia de Chagas, por FREITAS e cols., (1953).

O número de tripanosomas por inóculo, calculado pela técnica de BRENER (1961), foi estimado em cerca de 150.000.

Durante o período subsequente à inoculação, os animais foram observados diariamente e o controle parasitêmico foi feito no 8º dia após a inoculação, o qual variou,

entre 3.330 a 7.280 tripanosomas por 5mm^3 de sangue.

3. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E COLHEITA DO MATERIAL PARA ESTUDO HISTOLÓGICO

Os animais foram sacrificados a partir do 8º dia, até o 18º dia após a inoculação, tendo sido sacrificados 2 animais no 8º dia, 7 animais no 12º dia, 3 animais no 14º dia, 5 animais no 15º dia e 1 animal no 18º dia.

Os animais controles foram sacrificados a intervalos de tempo iguais, sendo 1 animal no 8º dia, 2 no 12º dia, 3 no 15º dia, e 1 no 18º dia. Os animais foram sacrificados por luxação da coluna cervical sendo os órgãos genitais internos, testículos e epidídimos retirados, fixados em formol a 10% durante 48 horas e pesados em balança de torção. Na pesagem foram computados os valores de pesos dos testículos, dos epidídimos direito e esquerdo mais a gordura justa-epididimária e o peso do conjunto de genitais internos constituído pela próstata, vesículas seminais, glândulas coaguladoras e ampolares.

Após a pesagem, os órgãos foram convenientemente reduzidos para o estudo histológico.

4. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Após fixação, o material foi submetido aos tratamentos habituais para inclusão em parafina, executados em aparelho automático.

O estudo histológico das diferentes estruturas foi

feito sob microscópio óptico, em numerosos cortes de 7μ de espessura, corados pelo hemalumem-eosina, pelo Tricrômico de Masson e pela reação do PAS (ácido periódico - Reativo de Schiff), segundo McMANUS (LISON, 1960) e os núcleos corados pelo Hemalumem de Ehrlich.

R E S U L T A D O S

Para facilitar a exposição dos nossos resultados, iremos apresentá-los relacionando-os aos diferentes órgãos estudados e obedecendo à seguinte ordem:

- 1º) - Lesões do tecido adiposo justa-epididimário
- 2º) - Lesões do epidídimo e suas variações ponderais
- 3º) - Lesões da próstata, vesículas seminais, glândulas accessórias e do ducto deferente
- 4º) - Lesões dos testículos e suas variações ponderais
- 5º) - Lesões dos neurônios do gânglio pélvico justa-prostático.

1º) - LESÕES DO TECIDO ADIPOSEO JUSTA-EPIDIDIMÁRIO

Junto ao polo superior do testículo, onde se localiza a cabeça do epidídimo, encontra-se, no camundongo, grande quantidade de gordura a qual, nos animais inoculados, se apresentava alterada. Macroscopicamente se pode distinguir dois tipos de gordura, uma mais escura, gordura marrom e uma mais clara. Nos animais inoculados ambos os tipos de gordura, reconhecidas macroscopicamente apresentaram alterações de consistência, adquirindo característica lenhosa e friável.

A gordura marrom (gordura jovem), examinada ao microscópio mostrou em todos os animais acentuado parasitismo com esteato-necrose e reação proliferativa celular predominando a presença de histiócitos. Porém, nessa gordura

existem zonas de cito-esteato, necrose inflamatória associada a um intenso parasitismo. Este é caracterizado por numerosos pseudo cistos com formas leishmanioides do *Trypanosoma cruzi* no interior de células adiposas alguns dos quais podem ser evidenciados na figura 1. Na figura 2, temos, para comparação, o aspecto da gordura marrom de um animal controle.

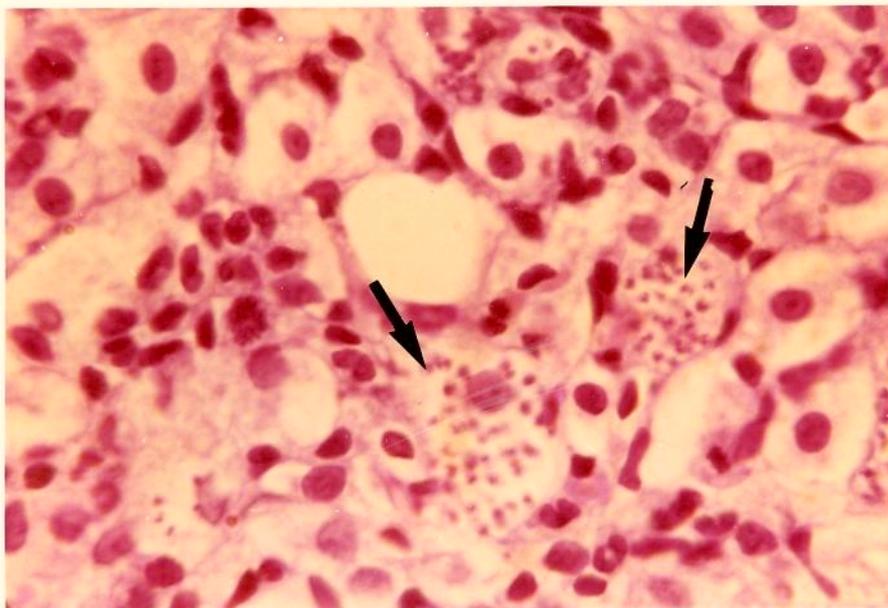


Fig. 1. Gordura marrom de animal inoculado, após 14 dias.

As setas assinalam ninhos de leishmânias, no interior da gordura marrom, com perda do seu típico aspecto vacuolado junto à proliferação histiolitária focal. Cortes de 7μ corado pela reação PAS e hemalumem.

(Aumento 1064 x)

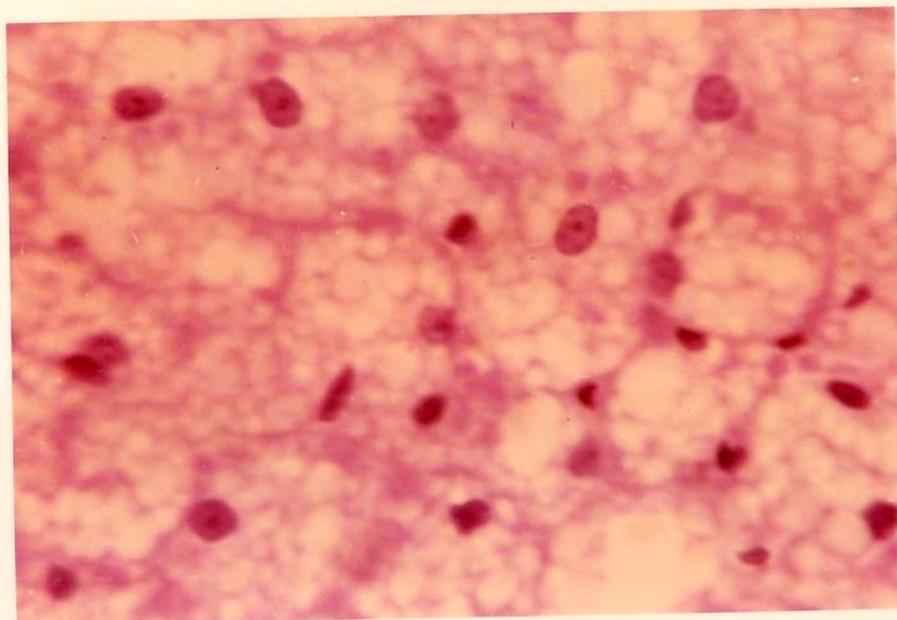


Fig. 2. Gordura marrom de animal controle. Ausência de infiltrado celular e aspecto vacuolar da gordura normal, tratada por solvente. Corte de 7 μ , corado pela reação de PAS e hemalumem. (Aumento 1064 x)

As figuras 3 e 4 ilustram as alterações da gordura clara, respectivamente em um animal infectado e em um animal controle.

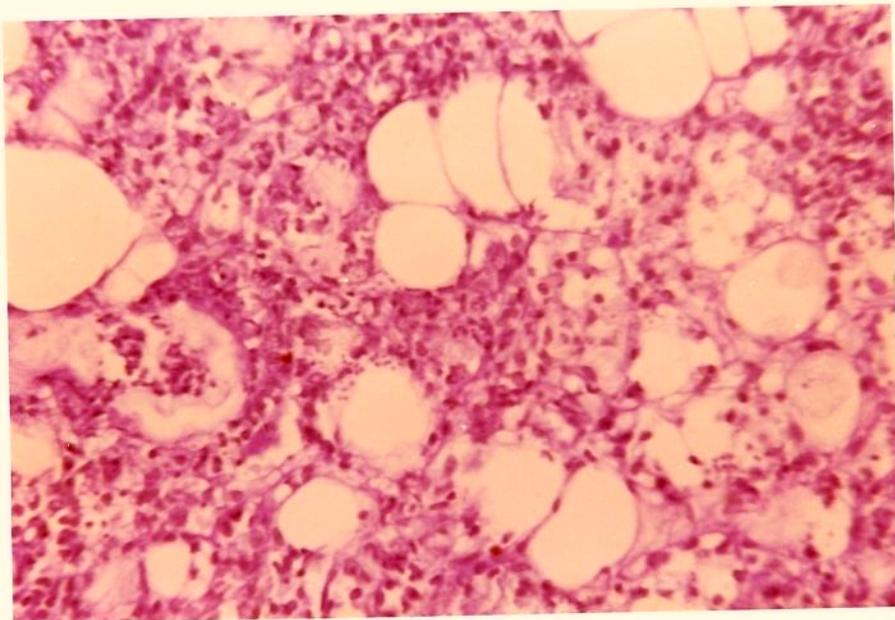


Fig. 3. Gordura clara de animal infectado, após 15 dias.

Áreas de cito-esteato-necrose inflamatória. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS e hemalumem.

(Aumento 424 x)

Pode-se constatar que neste tipo de gordura a cito-esteato-necrose é caracterizada por um tipo de infiltrado inflamatório diferente daquele encontrado na gordura jovem. Enquanto que neste tipo encontramos predominância de linfócitos e plasmócitos, na gordura jovem predominam os histiócitos.

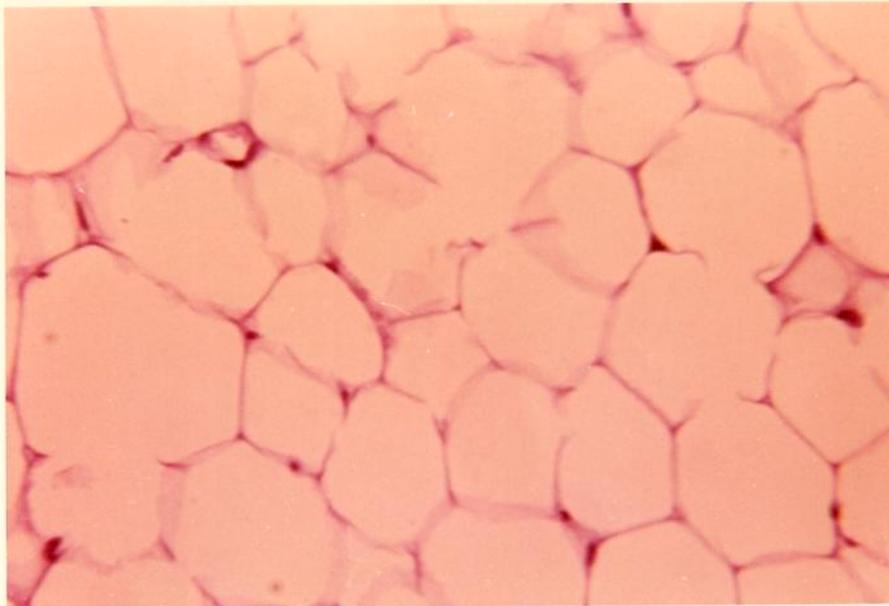


Fig. 4. Gordura clara de animal controle.
Aspecto da gordura normal. Corado pela
reação do PAS-hemalumem.
(Aumento 1064 x)

Maiores detalhes, além dos relacionados e decorrentes do parasitismo demonstrado na fase aguda, poderiam ser acrescentados, porém necessitariam fixação e coloração específica para gordura, a qual não fizemos.

2ª) - LESÕES E PARASITISMO DO EPIDÍDIMO

O epidídimo de alguns animais inoculados mostrava ao exame macroscópico, nítida atrofia. A média do peso dos epidídimos D e E juntamente com a gordura, nos ani-

mais inoculados foi, respectivamente: $177,2 \pm 28,47$ mg e $169,3 \pm 28,10$ mg. Para os 7 animais controles essas médias foram, respectivamente para o epidídimo D e E: $269,6 \pm 30,44$ mg e $316,0 \pm 42,55$ mg.

No tocante ao aspecto histopatológico do epidídimo, encontramos até o 12º dia pós-inoculação, um parasitismo intenso do interstício e da membrana basal.

Pode-se constatar que no 8º dia já existem formas em leishmânias parasitando a gordura bem como algumas células musculares lisas da membrana basal do ducto. Nos animais com mais tempo de inoculação o parasitismo é intenso no interstício e na membrana basal, respeitando, porém, o epitélio. Em nenhum animal foram encontradas formas em leishmânias na luz do ducto. Nos animais inoculados era característica, a pobreza de espermatozóides na luz do epidídimo e quando estes eram encontrados, frequentemente associavam-se a eles descamação de células imaturas da linhagem germinativa, tais como, espermátócitos de primeira ordem paquiteno, leptoteno e espermátides jovens.

O parasitismo inicial do interstício e da membrana basal, por leishmânias especialmente em células musculares lisas, não é acompanhado de infiltrado celular. As rupturas dos pseudo cistos levariam, mais tarde, ao aparecimento de intenso infiltrado inflamatório e necrose, como se constata na figura 5, onde se vê em restos de uma secção do ducto do epidídimo e áreas de necrose.

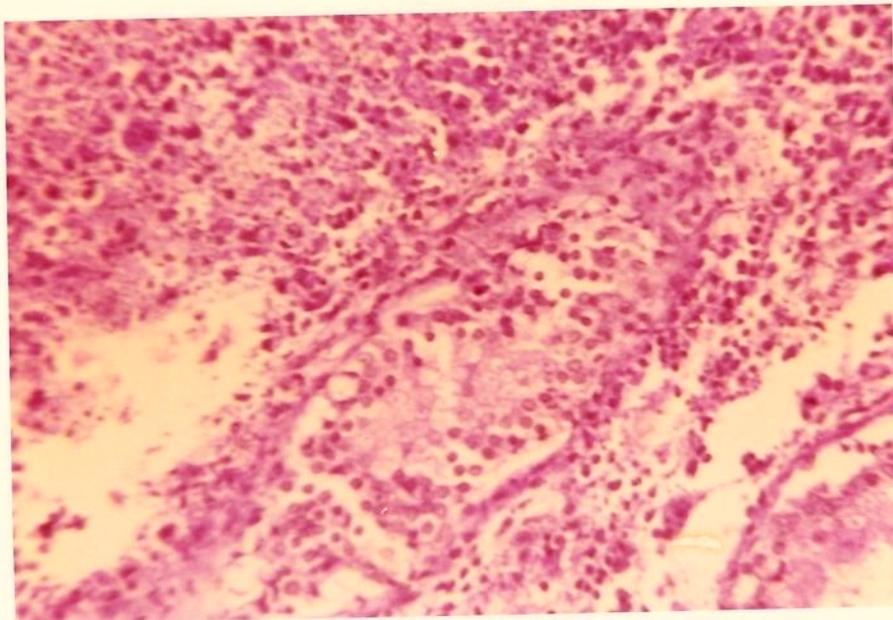


Fig. 5. Epidídimo de animal inoculado (15^o dia), mostrando uma área de necrose. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalumem.
(Aumento 424 x)

Outro aspecto constatado é aquele caracterizado por raras leishmânias, associadas a um infiltrado celular intersticial constituído de linfócitos e histiócitos. O epitélio do epidídimo nunca se evidenciava povoado de leishmânias. Em todas as formas do parasitismo o epitélio apresentava alterações caracterizadas pela presença de vacuolos e as células cilíndricas anormalmente altas e com poucos estereocílios. Embora o epitélio não seja parasitado diretamente, o parasitismo do interstício ou da membrana

basal seriam suficientes para direta ou indiretamente afetar a integridade do mesmo. Este último aspecto está caracterizado na figura 6, a qual deve ser comparada ao da figura 7, de um epidídimo controle.

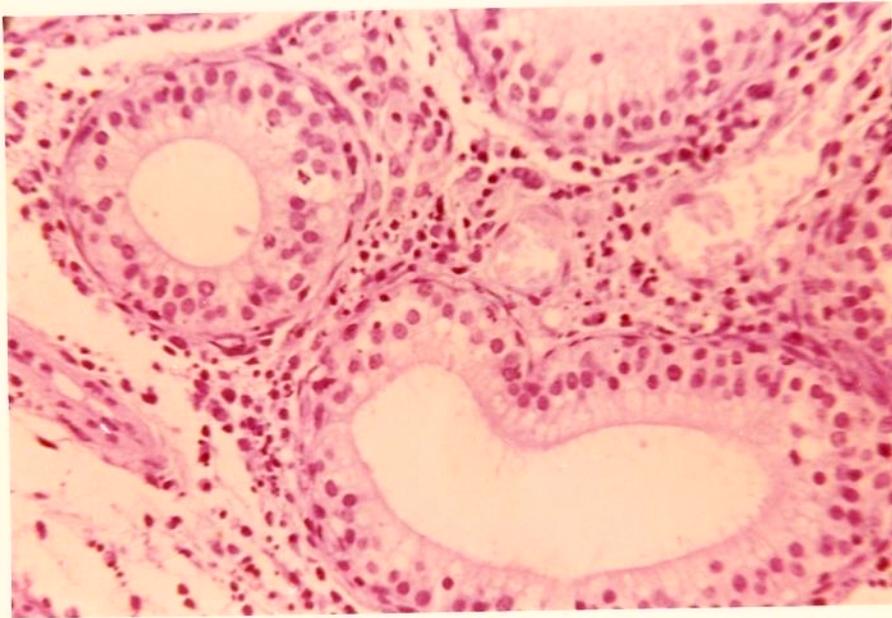


Fig. 6. Epidídimo de animal inoculado (13^o dia), com infiltrado inflamatório intersticial e raras leishmânias. Corte de 7 μ corada pelo hemalum-eosina.
(Aumento 424 x)

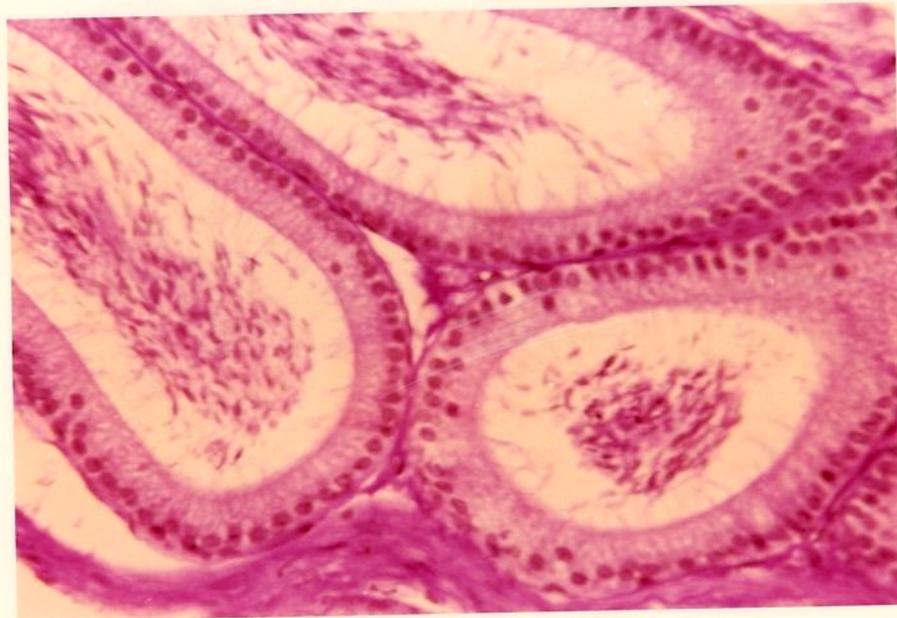


Fig. 7. Epidídimo normal, interstício sem infiltrado inflamatório, epitélio exibindo estereo-cílios e a luz do ducto com numerosos espermatozóides. Corte de 7 μ , corado pela reação do PAS-hemalumem.

(Aumento 424 x)

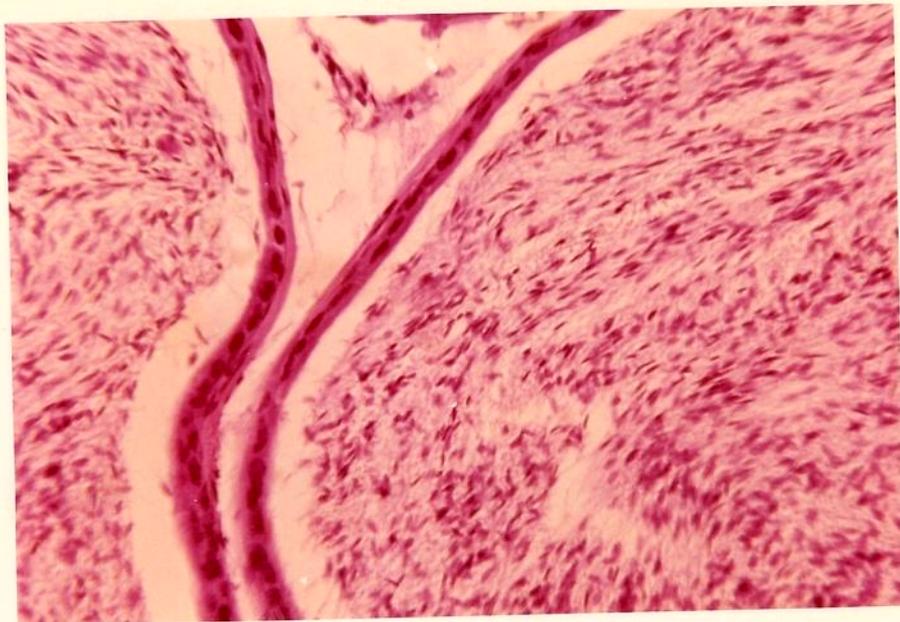


Fig. 8. Epidídimo normal, região do corpo, com epitélio baixo. Luz cheia com espermatozóides. Corte de 7μ corado com a reação do PAS-hemalumem. (Aumento 424 x)

3º) - LESÕES DA PRÓSTATA, VESÍCULAS SEMINAIS, GLÂNDULAS COAGULADORAS E CONDUTO DEFERENTE

Macroscopicamente chama a atenção a grande atrofia dos órgãos genitais internos (próstata) e das glândulas anexas (vesículas seminais, glândulas coaguladoras e glândulas ampulares), dos animais inoculados, quando confrontados com os mesmos órgãos dos animais controles.

O conjunto da próstata e glândulas anexas pesou nos animais inoculados, $87,5 \pm 50,31$ mg em média; enquanto

que nos animais controles o peso médio dos órgãos foi de 237,6 ± 28,5 mg.

Quanto aos aspectos histo-patológicos, chama a atenção inicialmente a diferença na quantidade de produtos secretados dentro da luz das estruturas glandulares, de maneira geral. Tanto a próstata quanto as glândulas anexas secretam material corável em vermelho pela reação do PAS, o qual está escassamente acumulado nas glândulas dos animais inoculados.

Associado a esse aspecto chama atenção o intenso parasitismo das estruturas envolventes das glândulas, isto é, membrana basal conjuntiva, camada de musculatura lisa e adventícia. O parasitismo dessas estruturas é tão acentuado que há um grande espessamento das mesmas intensamente "habitadas" pelas leishmânias com destruição da musculatura lisa. No conjuntivó frouxo intersticial, há um infiltrado inflamatório de linfócitos, histiócitos e plásmocitos.

Esses aspectos estão indicados na figura 9.

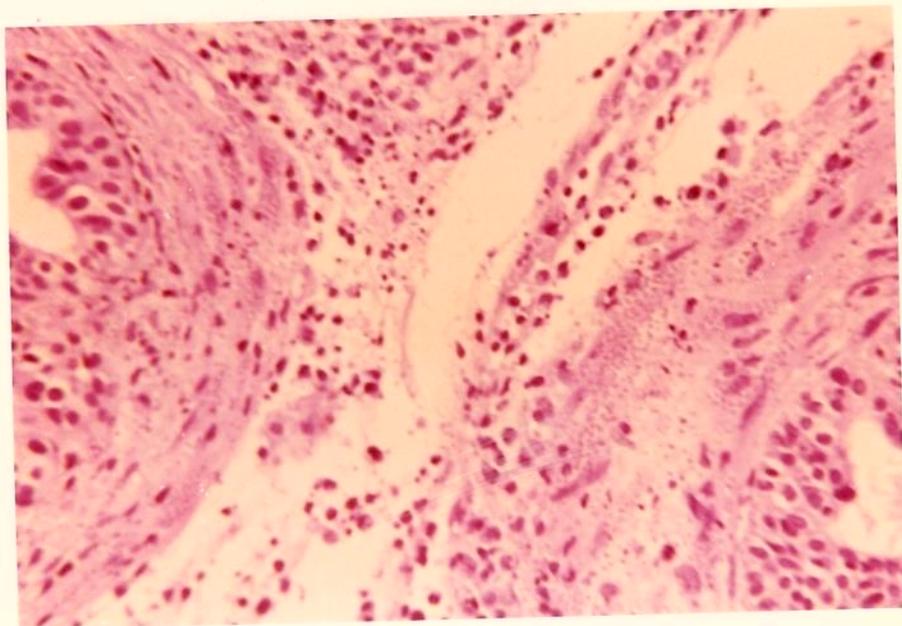


Fig. 9. Próstata de animal inoculado mostrando o parasitismo das estruturas envolventes dos ácinos-glandulares. Corte de 7 μ corado pela hemalum-eosina. (Aumento 424 x)

As figuras 10 e 11 correspondem a aspectos de um corte de próstata de animal controle e de um animal inoculado.

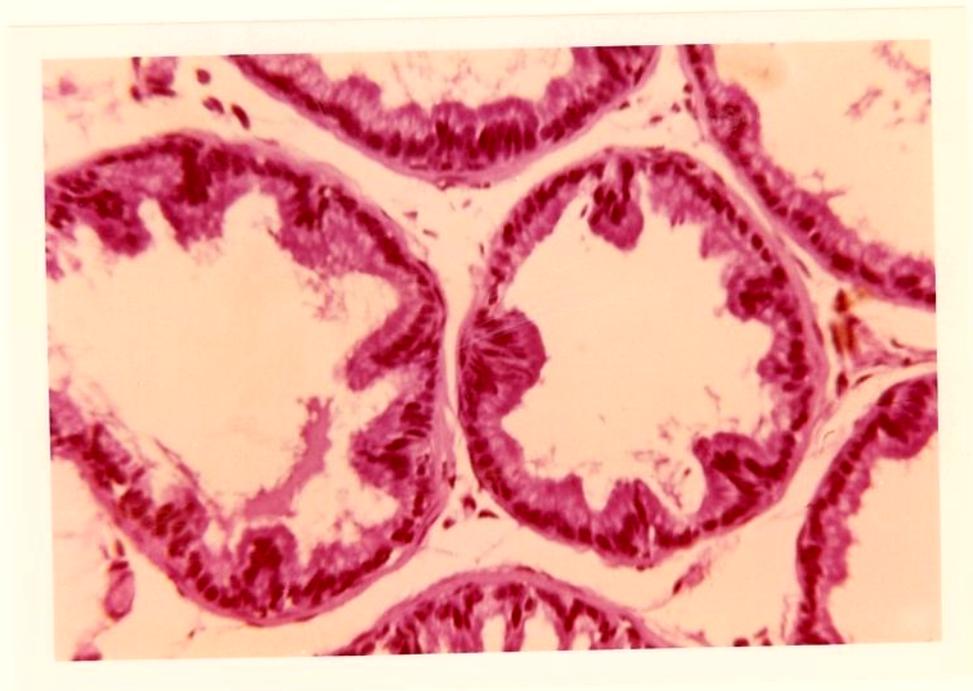


Fig. 10. Próstata de animal controle mostrando a integridade do epitélio e da lâmina conjuntiva-muscular envolvente. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalumem. (Aumento 106 x).

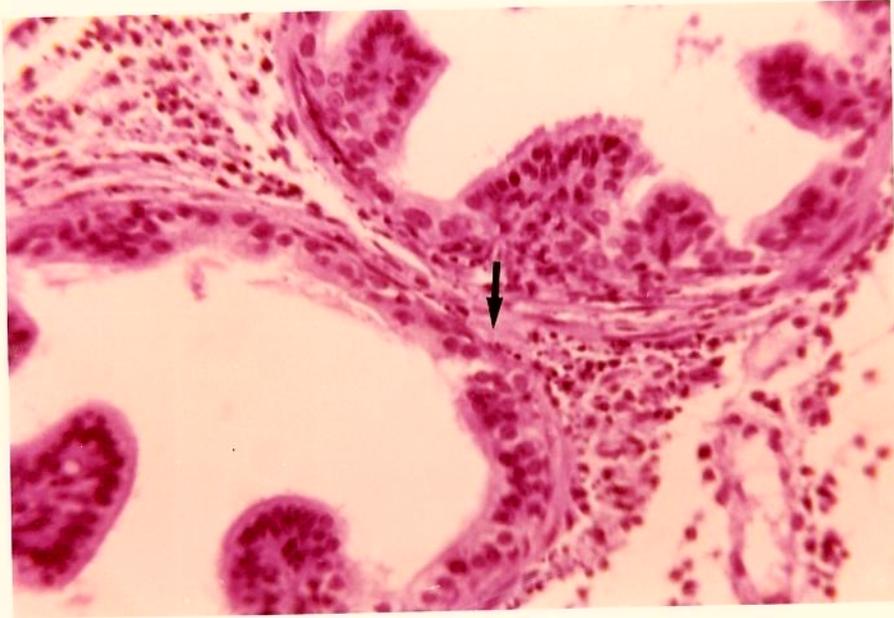


Fig. 11. Próstata de animal inoculado. Parasitismo da lâmina conjuntiva basal e da musculatura lisa envolvente assinalados. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalumem.
(Aumento 424 x)

O parasitismo da fase aguda atinge igualmente as glândulas anexas, vesículas seminais e glândulas ampulares, as quais estão também intensamente parasitadas.

As figuras 12 A e B representam cortes de vesículas seminais normal e parasitada.

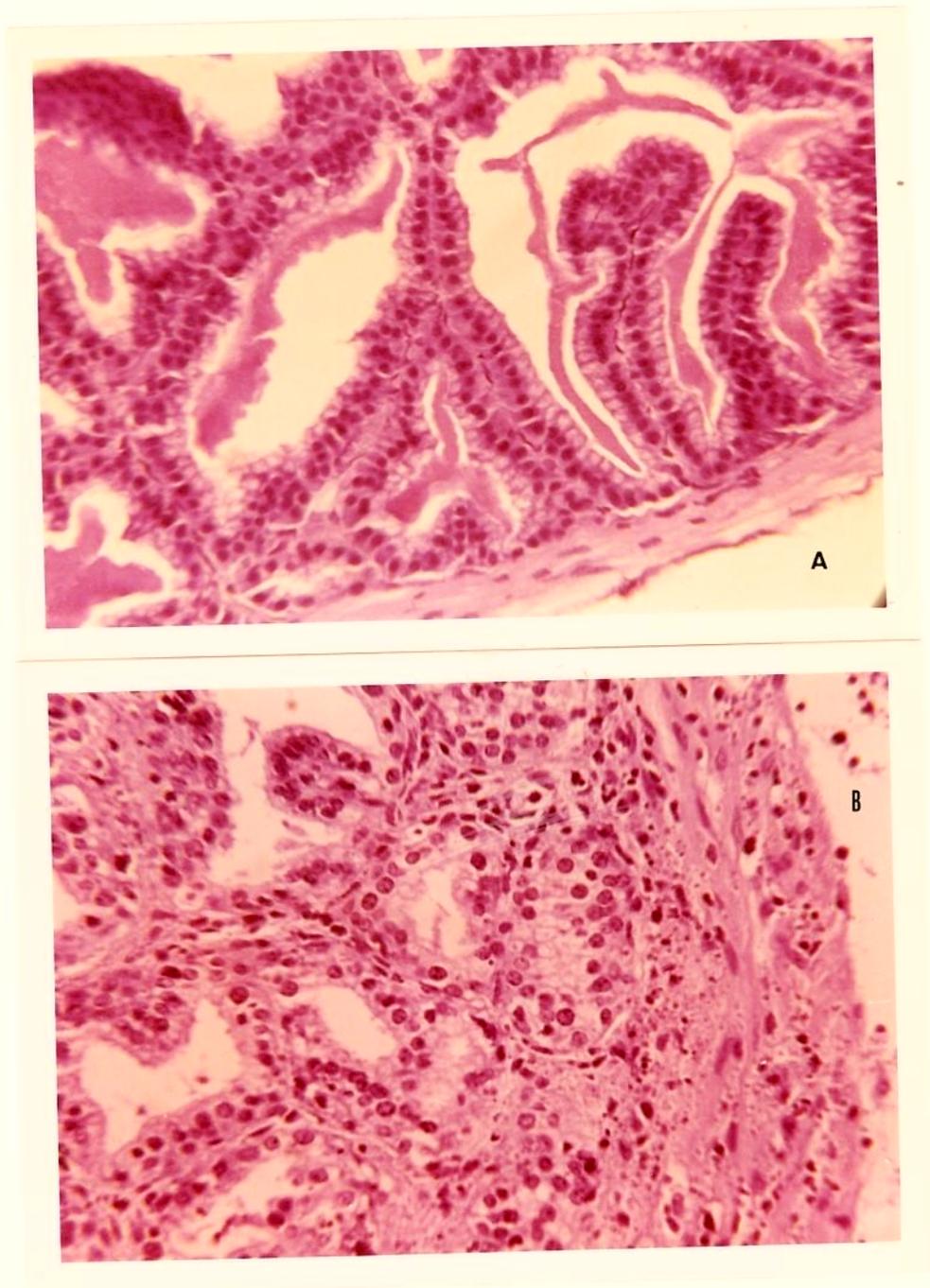


Fig. 12 A e B. Aspectos da vesícula seminal de animal controle e inoculado. Corte de 7 μ corados pela reação do PAS-hemalum. (Aumento 424 x)

Na figura B nota-se, além do parasitismo da musculatura lisa, um espessamento do epitélio e ausência de produto de secreção.

Além das estruturas acima referidas, o parasitismo estende-se também ao duto deferente e à musculatura estriada pré-uretral.

O parasitismo da musculatura lisa do deferente leva a uma destruição de fibras musculares bem como a uma dissociação das mesmas, normalmente compactadas.

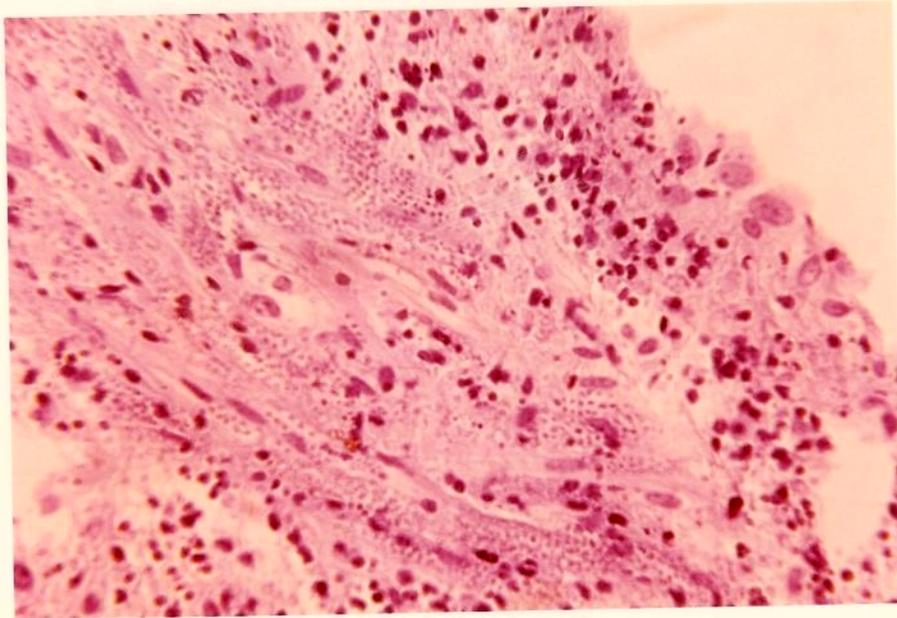


Fig. 14. Duto deferente de animal inoculado. Parasitismo e destruição de fibras musculares lisas. Corte de 7μ corado pela reação do PAS-hemalum. (Aumento 424 x)

Pudemos constatar ainda o parasitismo de ramos dos vasos deferenciais, com sérias alterações na parede dos mesmos.

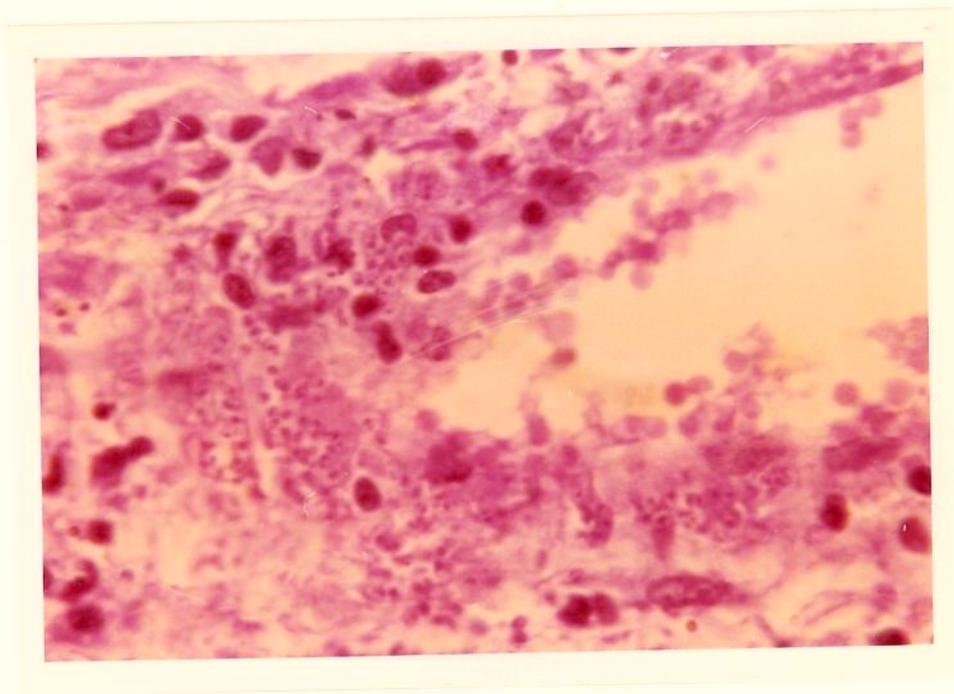


Fig. 15. Vaso da parede do ducto deferente, com intenso parasitismo de suas estruturas constituintes. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalum.
(Aumento 1064 x)

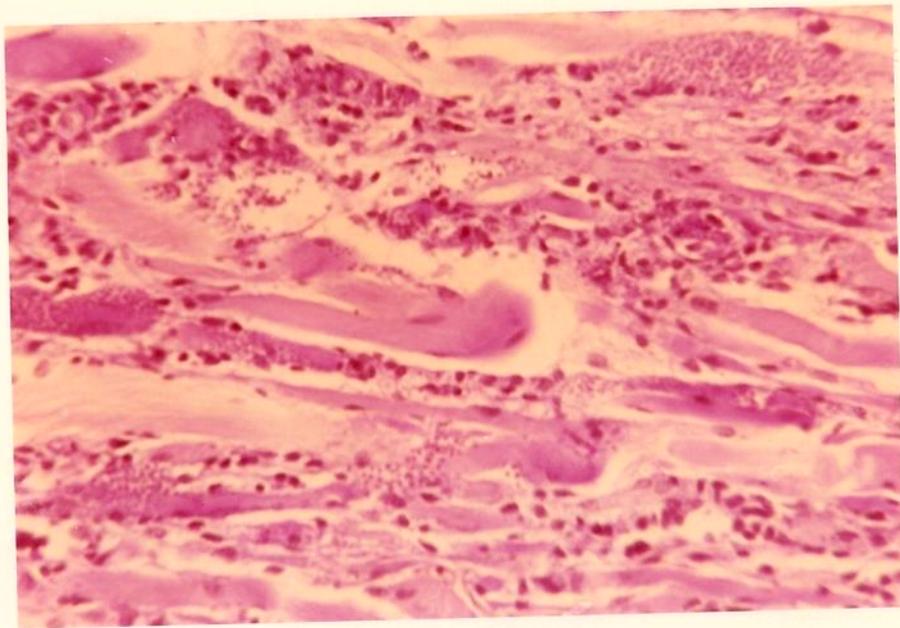


Fig. 16. Parasitismo das fibras musculares estriadas da região pré-uretral. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalumem.
(Aumento 424 x)

Todas as glândulas acessórias sofrem o mesmo processo de invasão parasitária de suas estruturas, especialmente da camada conjuntiva-muscular envolvente. Aqui, como nas outras estruturas, o epitélio é respeitado não apresentando leishmânias. É patente o efeito do parasitismo sobre a atividade secretora das glândulas parecendo interferir na mesma, levando a uma miopragia com consequente diminuição da secreção.

Outro fato flagrante é a atrofia dessas estruturas glandulares acessórias. Esses aspectos podem ser evidenciados na sequencia das figuras de números 17 a 20.

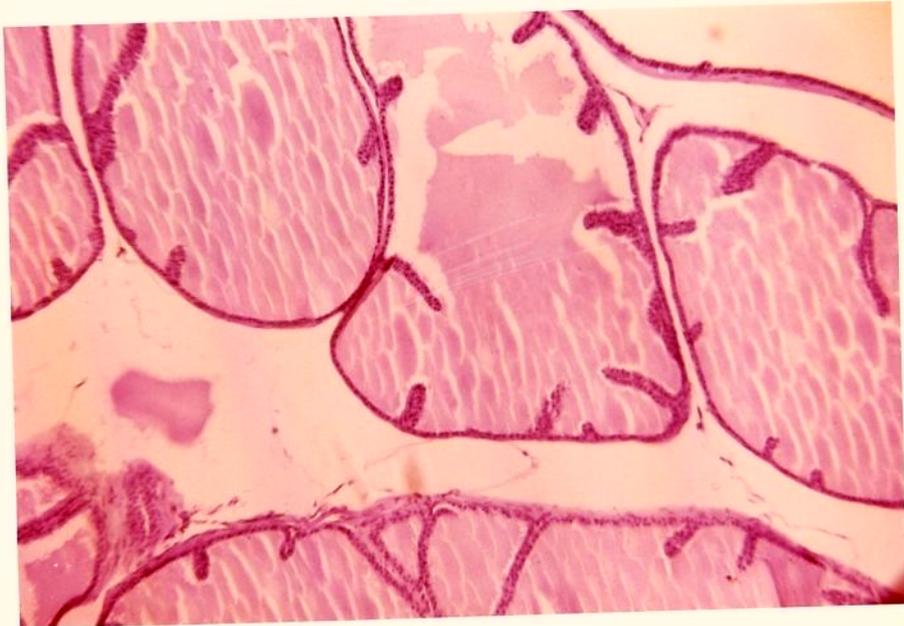


Fig. 17. Glândula coaguladora de animal controle, apresentando à luz glandular cheia de secreção. Corte de 7μ corado pela reação do PAS-hemalumem. (Aumento 106 x)

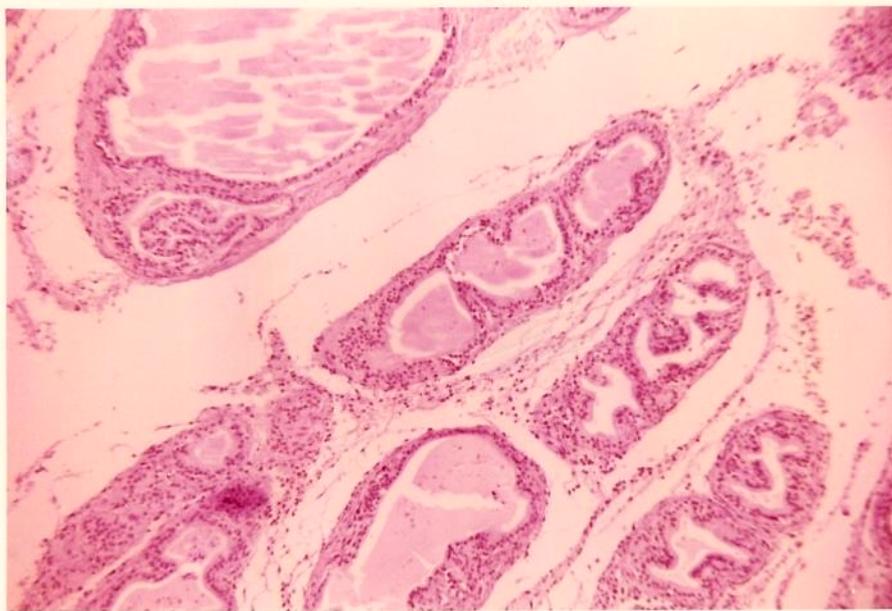


Fig. 18. Glândula coaguladora de animal inoculado, apresentando atrofia, espessamento da camada conjuntiva-muscular envolvente, parasitada e com infiltrado inflamatório. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalumem. (Aumento 106 x)



Fig. 19. Glândulas ampolares de animal controle. Epitélio cúbico baixo. Corte de 7 μ de espessura corado pela reação do PAS-hemalumem.
(Aumento 106 x)

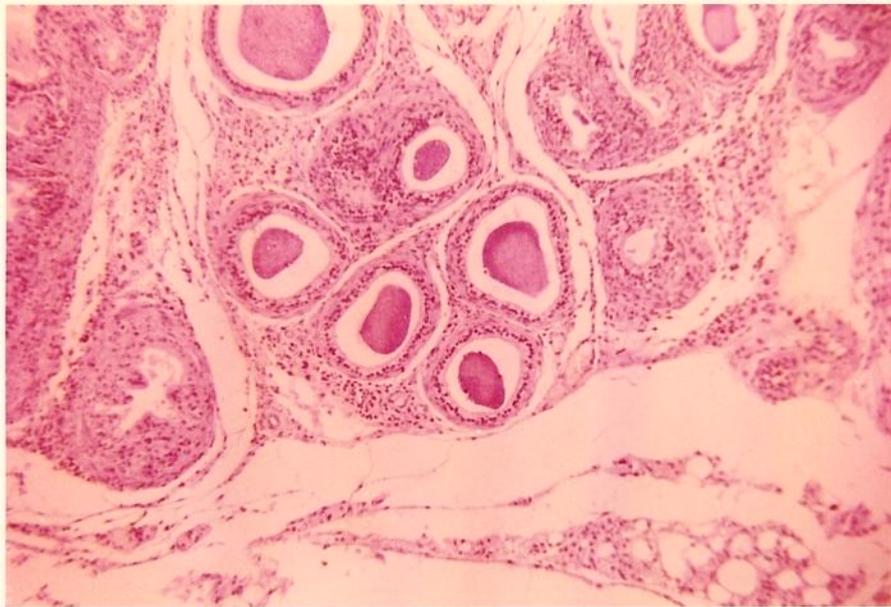


Fig. 20. Glândula ampolar de animal inoculado. Espessamento do epitélio cúbico e das camadas envolventes, infiltradas por células inflamatórias e leishmânias. Corte de 7 μ , corado pela reação do PAS-hemalumem. (Aumento 106 x)

Quando nos referimos ao parasitismo do epidídimo e das glândulas anexas, constatamos sempre que o parasitismo respeita o epitélio. Fato surpreendente, entretanto, foi o encontro de ninhos de leishmânias no epitélio da bexiga. Além de surpreendente seria de se supor que nesses casos, em vista do comportamento dos outros epitélios o parasitismo pudesse ter ocorrido de dentro para fora, isto é, a partir da luz da bexiga, o que implicaria em admitir a presença de forma Metacíclica do protozoário na

urina ou que o parasita tivesse "tropismo" para este tipo de epitélio.

A figura 21 mostra células do epitélio de transição da bexiga, intensamente parasitadas.

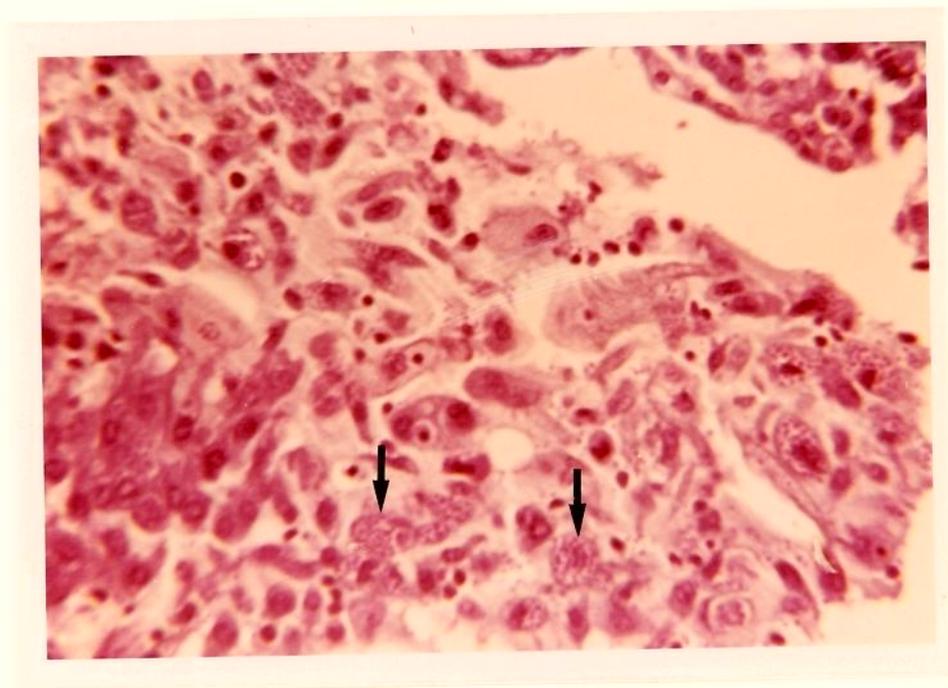


Fig. 21. Epitélio da bexiga de animal inoculado; células intensamente parasitadas, assinaladas. Corte de 7 μ corado pelo tricrômico de Masson.
(Aumento 424 x)

4º) - LESÕES DO TESTÍCULO

Ao exame macroscópico dos animais inoculados, constatou-se uma evidente atrofia dos testículos, quando comparados aos dos animais controles. Essa atrofia macroscópica é confirmada pela pesagem dos testículos os quais apresentaram nos animais inoculados os pesos médios de $61,4 \pm 6,79$ mg e $58 \pm 6,32$ mg, respectivamente para o testículo direito e esquerdo. Os valores ponderais dos testículos direito e esquerdo dos animais controles foram respectivamente: $86 \pm 7,85$ mg e $82,6 \pm 8,16$ mg.

O exame microscópico das preparações de testículos demonstrou, nos animais controles uma espermatogênese franca na qual se pode constatar as diferentes etapas da espermatogênese. Reconhecem-se os diferentes estágios da espermiogênese, as divisões meióticas bem como as mitoses de espermatogônias. Cada secção transversa de um túbulo seminífero apresenta um estágio definido da espermatogênese na qual se pode reconhecer as diferentes gerações celulares.

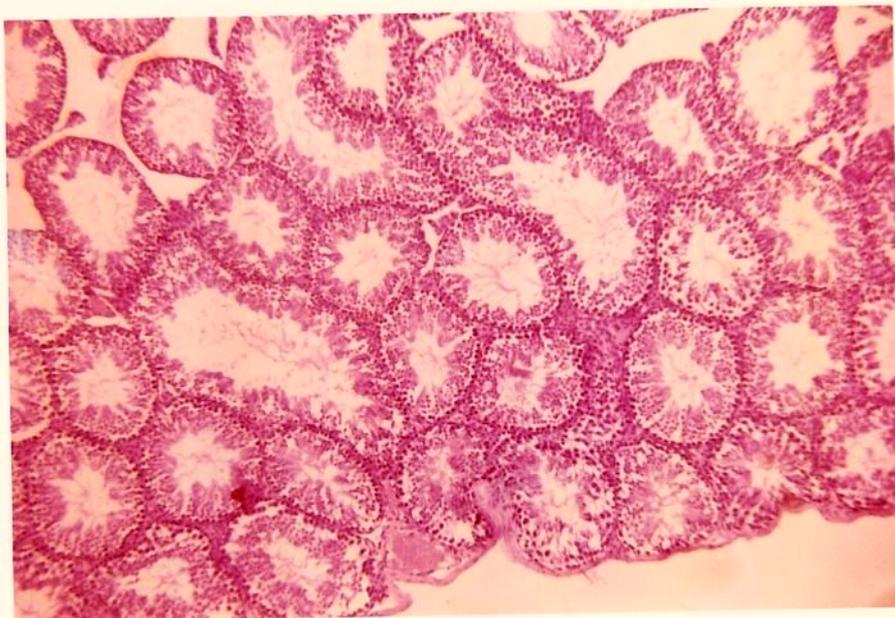


Fig. 22. Testículo de animal controle, na qual se pode constatar diferentes estadios da espermatogênese. Corte de 7μ corado pela reação do PAS-hemalumem. (Aumento 106 x)

A figura 22 representa uma secção de um túbulo seminífero de um animal controle, no qual se pode observar os espermatozóides maduros, prontos para serem expulsos na luz tubular.

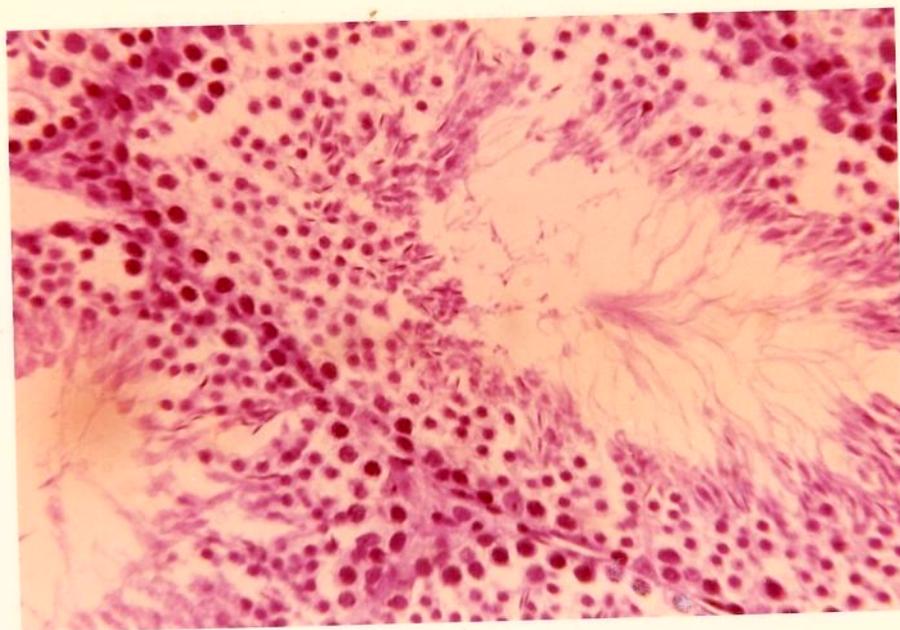


Fig. 23. Testículo de animal controle, mostrando estágio caracterizado pela presença de espermatozoides maduros. Corte de 7μ corado pela reação do PAS-hemalumem.
(Aumento 424 x)

Os testículos dos animais inoculados caracterizavam-se pela diminuição da espermiogênese, associada a uma desorganização das diferentes gerações celulares, com descamação de células germinativas (espermatócitos I) na luz dos túbulos seminíferos. Era frequente verificar-se que o epitélio germinativo em várias secções de túbulos estava reduzido a poucas espermatogônias, células de Sertoli e apenas a uma geração de espermatócitos I. Encontravam-se ainda mitoses de gônias, bem como divisões meióticas. O aspecto geral entretanto, era de atrofia do epitélio ger-

minativo.

Em nenhum animal pudemos constatar a presença de leishmânias além da membrana tubular. Esse achado condiz com a possibilidade da membrana tubular representar uma barreira, a qual impediria a penetração do tripanosoma na sua forma invasora. Entretanto, pode-se constatar o intenso parasitismo da albugínea, que se apresenta com vasos congestos, edemaciadas e grandemente espessada. Os aspectos descritos são mostrados nas figuras 24 e 25.

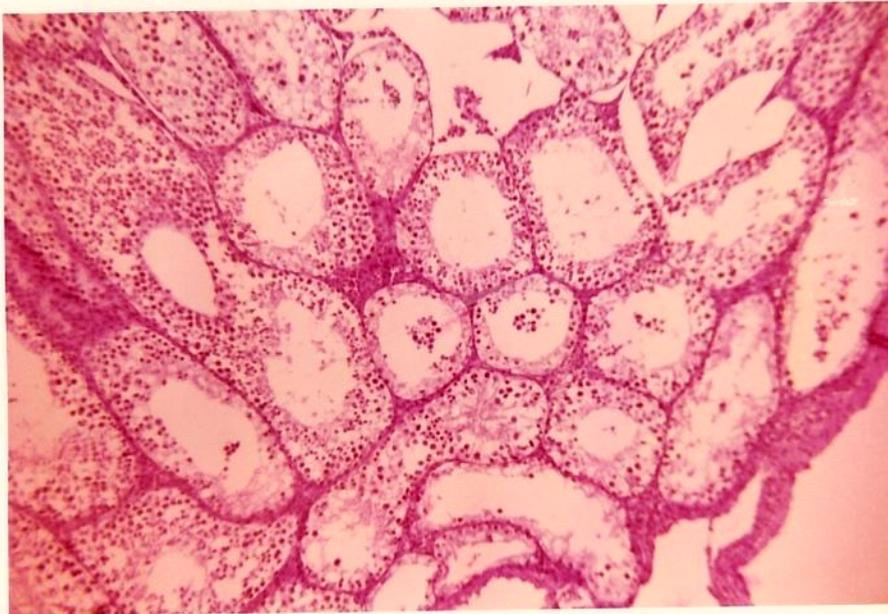


Fig. 24. Testículo de animal inoculado, mostrando alterações em diferentes túbulos seminíferos: descamação celular na luz, redução do epitélio germinativo e ausência de espermiogênese. Corte de 7μ corado pela reação do PAS-hemalum. (Aumento 106 x)

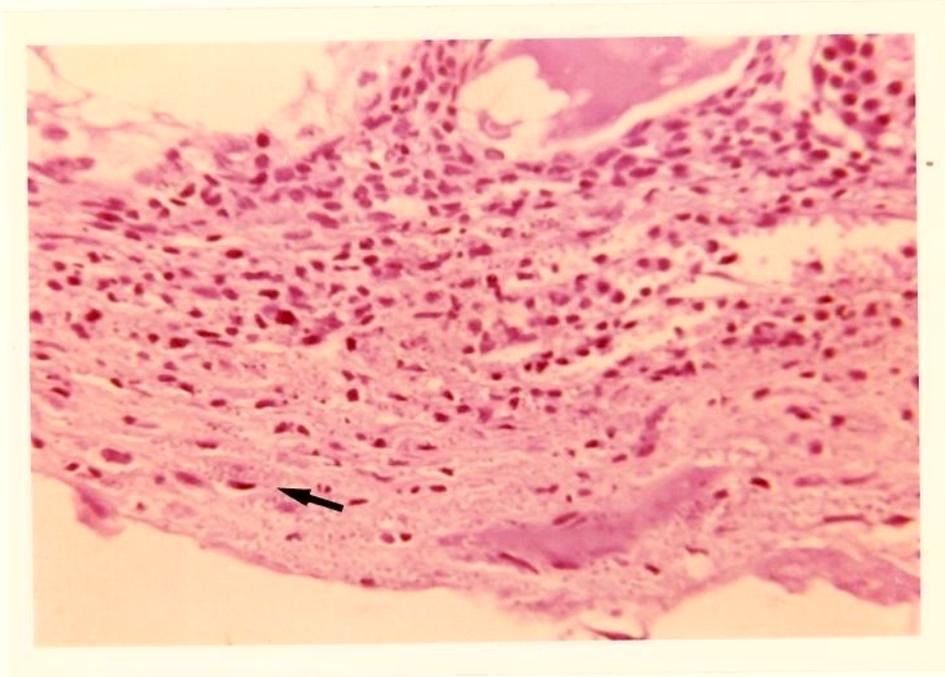


Fig. 25. Albugínea de testículo de animal inoculado. Parasitismo pelas leishmânias, assinalado; congestão, espessamento e infiltrado inflamatório. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalumem. (Aumento 424 x)

5º) - LESÕES DOS NEURÔNIOS DO GÂNGLIO PÉLVICO JUSTA-PROSTÁTICO.

O exame do gânglio justa-prostático foi executado de maneira sistemática, com a finalidade de constataremos possíveis alterações detectáveis na fase aguda da tripanosomíase. Nos animais controles o gânglio pélvico justa-prostático não apresentou alterações nos seus neurônios, nem infiltrados inflamatórios. Na figura 26, abaixo, pode-se verificar a integridade dos neurônios autônomos e das

estruturas genitais entre as quais esses neurônios se localizam; próstata e vesícula seminal.

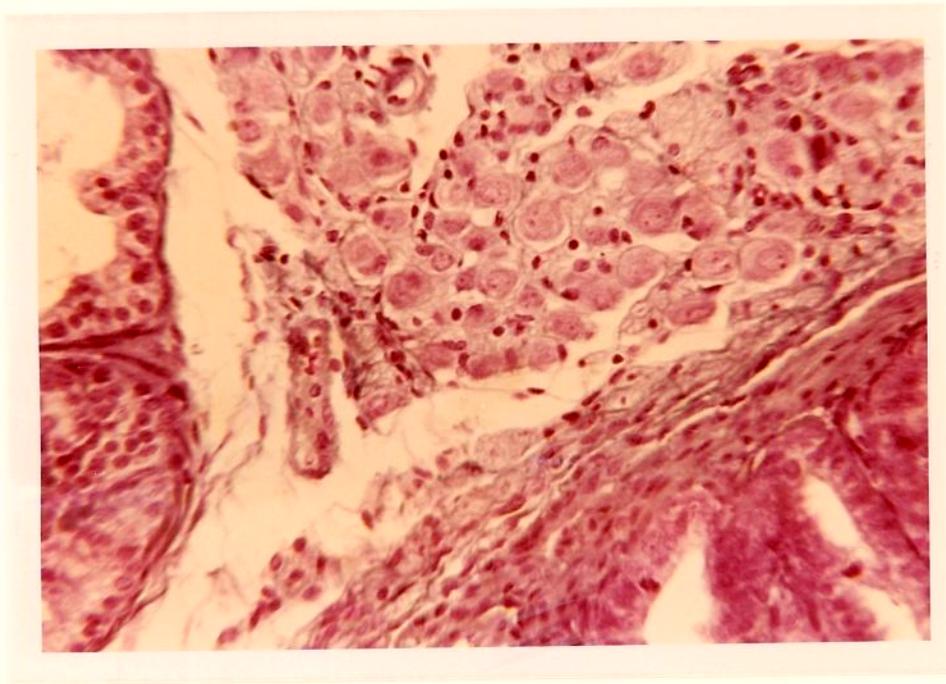


Fig. 26. Aspecto dos neurônios do gânglio pélvico-justa-prostático de animal controle. Corte de 7 μ corado pelo tricrômico de Masson.
(Aumento 424 x)

O exame dos neurônios constituintes do gânglio justa prostático nos animais inoculados mostrou vários aspectos, os quais serão relatados separadamente, embora acreditemos que se constituam em fases evolutivas do parasitismo neural na fase aguda.

Nos animais inoculados e decorridos 8 a 12 dias en-

contram-se neurônios íntegros ao lado de neurônios intensamente parasitados ou de gânglios nos quais o parasitismo predomina nas células ganglionares satélites. Esse parasitismo é surpreendentemente isento de reações inflamatórias (ganglionite).

As figuras 27 e 28 são demonstrativas desses fatos.

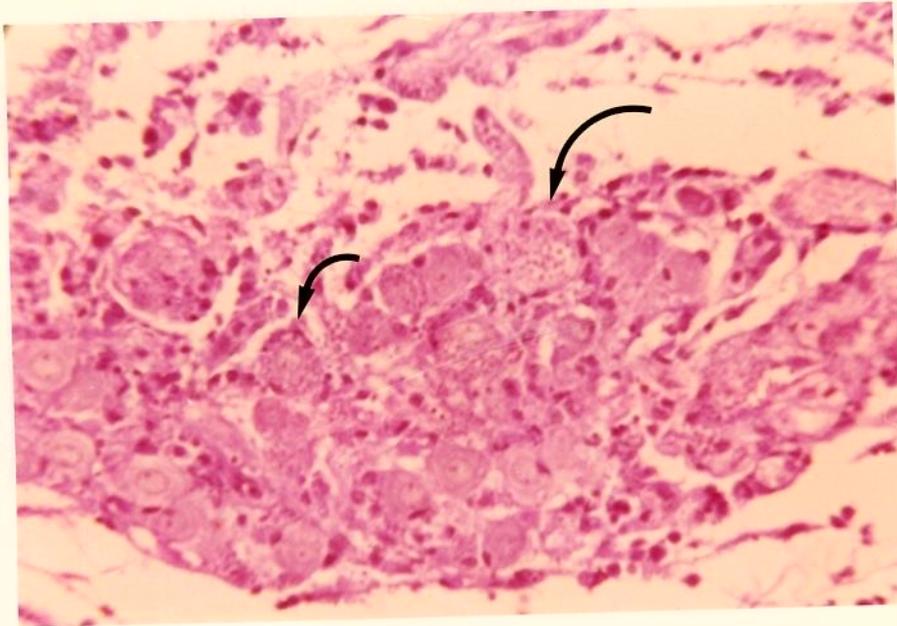


Fig. 27. Corte de gânglio pélvico justa-prostático de animal inoculado (12 dias), apresentando intenso parasitismo e neurônios (assinalados), sem infiltrados inflamatórios. Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalumem. (Aumento 424 x)

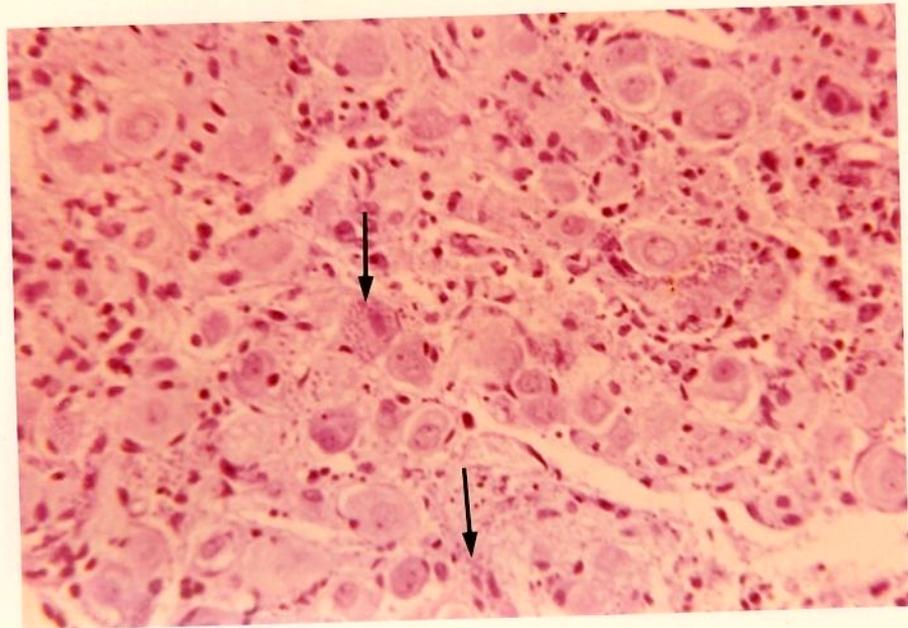


Fig. 28. Gânglio pélvico justa-prostático de animal inoculado apresentando parasitismo de neurônios e de células satélites, sem reação inflamatória. Corte de 7μ corado pela hemalum-eosina.

(Aumento 424 x)

A presença de leishmânias no citoplasma dos neurônios está associada à alterações degenerativas das células.

Na figura 29, além das células satélites parasitadas pode-se verificar o parasitismo de um neurônio exibindo sinais de degeneração.

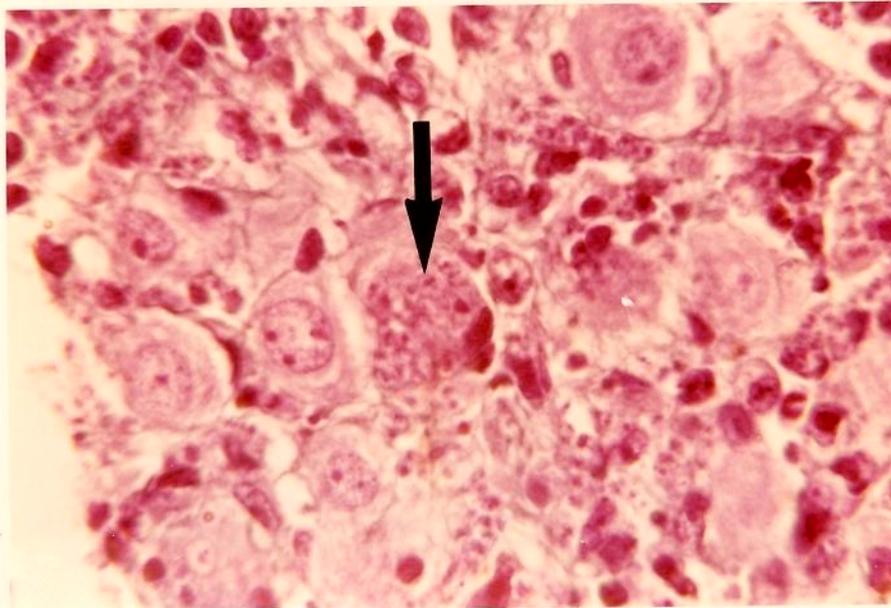


Fig. 29. Neurônio parasitado, exibindo sinais de degeneração. Corte de 7 μ corado pelo tricrômico de Masson. (Aumento 1064 x)

Embora não tenham sido feitos cortes seriados do material, o parasitismo neuronal foi um achado frequente.

Esse parasitismo atinge aleatoriamente os neurônios, acarretando ora o parasitismo simultâneo de numerosos neurônios do mesmo gânglio, ora de apenas alguns ou mesmo não atingindo nenhum neurônio.

Achado também frequente é o parasitismo das células satélites.

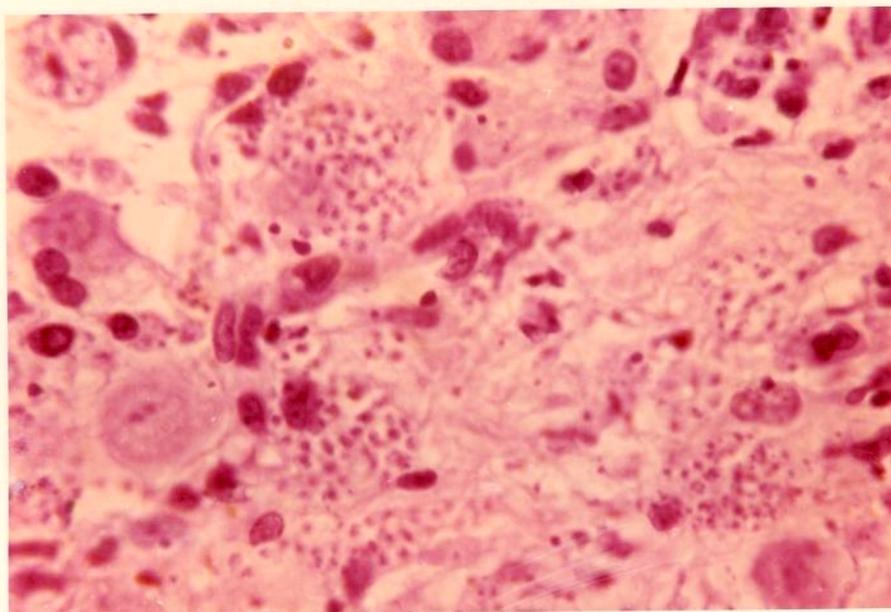


Fig. 30. Gânglio pélvico justa-prostático de animal inoculado, exibindo vários neurônios parasitados. Corte de 7 μ corado pelo tricrômico de Masson. (Aumento 1064 x)

Nos animais inoculados com mais de 14 dias de evolução o gânglio exibia além de grande número de neurônios com evidentes sinais de degeneração, restos de leishmânia associado a um infiltrado inflamatório composto de linfócitos e histiócitos, predominantemente. A essas características somava-se congestão vascular intra-ganglionar.

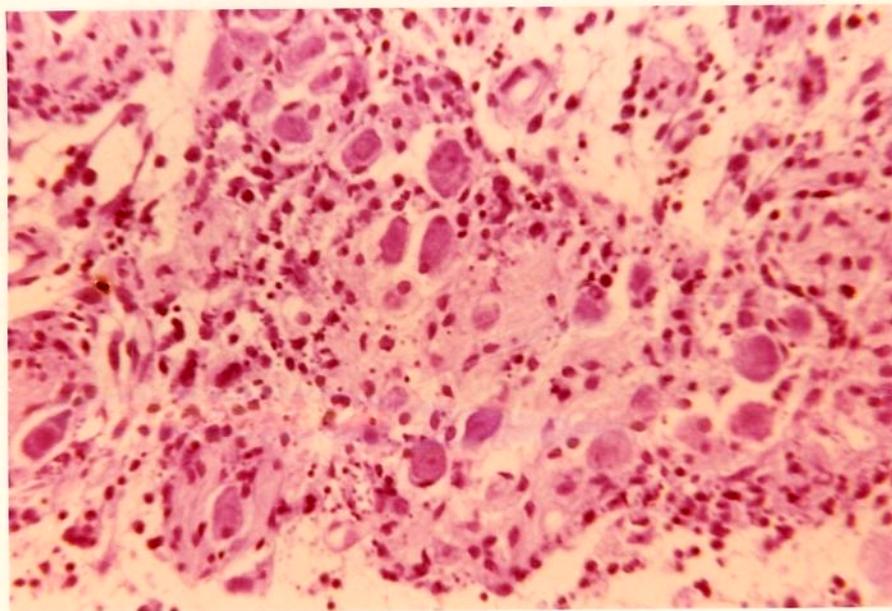


Fig. 31. Gânglio de animal inoculado (após 18 dias), exibindo inúmeros neurônios em vias de degeneração e infiltrado inflamatório (ganglionite). Corte de 7 μ corado pela reação do PAS-hemalum.
(Aumento 424 x)

D I S C U S S Ã O

Antes de passarmos à discussão dos nossos resultados propriamente ditos, queremos enfatizar mais uma vez a grande discrepância entre os estudos até agora feitos sobre a patogenia da Moléstia de Chagas em diferentes órgãos da economia, comparada àqueles relacionados ao aparelho reprodutor. Tirante o resultado pioneiro de GASPAR VIANNA (1911), os resultados experimentais de FERREIRA e MEIRA DE OLIVEIRA (1965) e o de FERREIRA (1968), nada mais foi realizado no sentido do esclarecimento das alterações e da patogenia da Moléstia de Chagas sobre órgãos do aparelho reprodutor. Merecem destaque as investigações realizadas por HADDAD e cols. (1959) e mais recentemente a de HADDAD e RAIA (1969), as quais, motivadas mais pelas possíveis repercussões que as diferentes variantes técnicas, propostas para a cirurgia do megacolon, pudessem ter sobre o aparelho reprodutor, estudaram, no homem, as alterações sexuais após o tratamento cirúrgico do megacolon congênito e adquirido. O grande mérito desses AA, embora não tivessem provado definitivamente a relação entre alterações funcionais sexuais e a Moléstia de Chagas, foi o de serem os primeiros a suspeitarem dessas relações. Para nós não interessam as conclusões relacionadas aos problemas cirúrgicos, mas em relação à interação Moléstia de Chagas e complicações sexuais, são conclusões de HADDAD e RAIA: "a doença de Chagas pode determinar lesão dos plexos simpáticos e parassimpáticos durante a evolução do megacolon, com conseqüente diminuição ou abolição da ejaculação e até mesmo impotência sexual total. Deve-se, pois, procurar determinar as complicações já existentes

no pré-operatório para uma melhor avaliação desta seqüela nas diferentes técnicas de tratamento cirúrgico dessa doença".

Embora a justificativa invocada por esses autores para admitir a possibilidade de lesões em órgãos sexuais em face da Moléstia de Chagas tenha sido uma "comunicação pessoal" de OKUMURA (1969), que encontrou "alterações plexulares ao nível dos plexos prostáticos e das vesículas seminais" não citam entretanto, trabalho experimental de FERREIRA e MEIRA DE OLIVEIRA (1965) que demonstraram acentuada diminuição no volume do sêmem elétroejaculado em ratos chagásicos. Posteriormente, FERREIRA (1970), estudando a patogênese das lesões testiculares e epididimárias em cobaias infectados experimentalmente, demonstrou que a destruição neuronal observada no gânglio pélvico justa-prostático é o principal fator responsável pelas alterações morfológicas e tróficas encontradas no testículo e no epidídimo desses animais. O estudo desses problemas, na espécie humana, é difícil em face de dificuldades técnicas e éticas. Evidentemente não seria fácil de se obter biópsias e mesmo amostras para avaliação indireta da espermatogênese, através de espermiograma. Apesar disso, já temos evidências em alguns casos humanos, de azoospermia. Do exposto até aqui, acreditamos ter acumulado razões suficientes para o estudo que ora empreendemos. Passando agora à discussão dos nossos achados, propriamente ditos, vamos iniciá-la obedecendo a mesma ordem da apresentada em nossos resultados.

Assim, no que concerne à gordura justa-epididimária nossos resultados mostraram um acentuado parasitismo das

células gordurosas acompanhado de esteato-necrose. O parasitismo da gordura marrom e clara, não mostra comportamento semelhante. Enquanto que o parasitismo da gordura jovem (marrom) é acompanhado do aparecimento de numerosos histiócitos, aquele da gordura clara acompanhava-se de um infiltrado de linfócitos e plasmócitos, predominantemente. Infelizmente não tínhamos quando iniciamos este trabalho, conhecimentos sobre os trabalhos de MAZZA e FREIRE (1940) e o de ALVARENGA (1960), autores que se preocuparam com os problemas relacionados com as lesões do tecido adiposo na Doença de Chagas. Este fato é aqui assinalado porque paradoxalmente nem esses autores tiveram o cuidado de examinar as gorduras sob o aspecto histoquímico, fato que estamos atualmente investigando.

Somente após os nossos achados é que igualmente tivemos que nos penitenciar de não termos fixado convenientemente esse material, que seguramente teria nos dado outras informações a respeito do parasitismo e lesão da gordura na fase aguda da Moléstia de Chagas experimental. Quanto à esteato-necrose ALVARENGA mostra evidências (inoculando intraperitonealmente suspensão de homogenizados de tripanosoma), de que se trata de ação tóxica local associada ao aumento de lipase dos linfócitos e monócitos. Não concorda com PIZZI (1953), que admite ser a esteato-necrose devido à lesão pancreática. OKUMURA e cols. (1960) admitem a necrose da gordura peritoneal na fase aguda como conseqüente à pancreatite aguda, esposando as idéias de PIZZI. Nós encontramos, como ALVARENGA, a esteato-necrose em locais apenas onde existiam leishmânias livres ou em desintegração. Não examinamos, entretanto, o pâncreas, mas em comunicação pessoal de BECKER (1973), em ca-

soos humanos, há frequentemente focos de esteato-necrose, sem sinais evidentes de pancreatite e esse autor também admite esteato-necrose como fenomeno local. O exame do epidídimo nos animais inoculados mostra uma característica comum a quase todos os animais, aliás, relacionada não ao epidídimo propriamente, mas à miopragia do testículo, qual seja, a pobreza de espermatozóide na luz do ducto epididimário. Associado a esse fato comum, diminuição do número de espermatozoides acumulados no epidídimo, era frequente o aparecimento na luz do epidídimo de células da linhagem germinativa imaturas, quase sempre espermátides em várias fases da espermiogênese e mesmo espermátocitos em diferentes fases da pró fase. Além dessas características, pode-se constatar lesões variadas do próprio epidídimo. Encontramos em animais com 15 dias de infecção, áreas de necrose do epidídimo na qual há além da destruição do órgão, restos de leishmânias e infiltrado inflamatório (vide figura 5). Embora a necrose tivesse sido constatada em alguns animais e fosse de caráter focal, as lesões mais frequentes dizem respeito ao parasitismo da parede do ducto, caracterizada pela presença de leishmânias nas células musculares lisas e no conjuntivo envolvente, quase sempre sem infiltrado inflamatório. Essa característica é encontrada até o 12º dia pós-inoculação. Em animais com mais tempo de evolução é frequente a diminuição do parasitismo das estruturas pelas leishmânias (lise ? ruptura ?) e o aparecimento de infiltrado inflamatório intersticial constituído de linfócitos e histiócitos, predominantemente. Outra característica digna de nota é o comportamento do epitélio do ducto em quaisquer dos seus segmentos (cabeça, corpo e cauda), qual seja vacuolização, desarranjo do epitélio, cujas células se apresentam ligei

ramente aumentadas. Não encontramos, como refere GASPAR VIANNA, parasitismo quer das células epiteliais, quer leishmânias ou tripanosomas livres na luz ou outras células parasitadas, que não fibrócitos ou células musculares lisas. Seria aqui o momento de se discutir, não o valor em sí da experiência de VIANNA, mas de arguir das características que envolveram a mesma naquela época, no que concerne ao número de tripanosomas inoculados, a idade dos cobaios bem como à época do sacrifício dos animais. É fato corriqueiro, para quem trabalha experimentalmente, que as características das lesões evoluem com o tempo após a inoculação e tem às vezes, características inusitadas dependendo do inóculo, da cepa e da idade dos animais. Outro elemento de destaque, embora o número de animais controle por nós utilizados fosse relativamente pequeno são as variações ponderais constatadas, que atestam uma atrofia geral dos epidídimos e da gordura. Assim, tivemos para os valores ponderais do epidídimo e da gordura justa-epididimária uma diminuição de 52% e 87%, respectivamente para o epidídimo e gordura D e E. Caberia agora, uma especulação de ordem geral, a qual pudesse talvez ter explicação. - Não admitimos a possibilidade de um trabalho que não levante hipóteses ou permita suposições válidas. - Assim, pelos tipos de lesões encontradas, tanto na gordura quanto no epidídimo, poderíamos admitir a possibilidade de que seriam suficientes para desencadear possivelmente reações imunitárias. Sabe-se que tanto o testículo quanto o epidídimo são órgãos que respondem facilmente a tipos de reações imunitárias (CHASE, M.W., 1972). Além disso, pelo que se constata no trabalho de FERREIRA, (1968), a atrofia do epidídimo no cobaio, não se refaz, permanecendo, embora sem sinais de infecção ou reação in-

flamatória, atróficos. Por outro lado sabe-se que a maturação completa, nutrição e armazenamento do espermatozóide depende da integridade do epidídimo em especial das secreções dos órgãos anexos e da integridade do epitélio que recobre a via espermática. Todos os fatos são concordes no sentido de que as lesões da fase aguda não são totalmente reparadas ou não são convenientemente reparadas, com repercussões variadas para o transporte e a vitalidade do espermatozóide.

Além da acentuada atrofia da próstata e das glândulas anexas, as quais computadas em conjunto, apresentaram uma diminuição de cerca de 170% em relação ao peso dos mesmos órgãos dos animais controles. Sua atrofia pode ser bem aquilatada em nossos resultados, pelo confronto das figuras 17-18 e 19-20.

Associado ao parasitismo intenso da musculatura lisa de todas as estruturas glandulares ocorre uma grande alteração na quantidade e possivelmente na qualidade dos produtos secretados por essas glândulas anexas. É de se supor que na qualidade também ocorram alterações embora não tenhamos elementos objetivos para afirmar categoricamente, mas pelas características apresentadas pelo epitélio, admitimos essa possibilidade. Os núcleos das células epiteliais quase sempre mostram uma cariopicnose associada a um aumento de espessura da camada epitelial. Essas alterações epiteliais foram, especialmente constatadas nas vesículas seminais (vide figuras 12 A e B).

Não encontramos, entretanto, o parasitismo do epitélio. O acentuado parasitismo do ducto deferente com des-

truição de células musculares lisas, de suas diferentes camadas, leva a supor, que mesmo após uma reparação não deva esse segmento da via espermática funcionar perfeitamente no transporte de espermatozoides.

Apenas no deferente pudemos notar o parasitismo de células epiteliais bem como o acentuado parasitismo da parede e do endotélio de vasos deferenciais. No tocante às possíveis alterações de transporte estaria também implicada a musculatura estriada pré-uretral, a qual igualmente apresentou intenso parasitismo. Mais difícil é a interpretação do parasitismo do epitélio de transição da bexiga. É possível que o parasitismo tenha se perpetrado através da parede do órgão bem como pela via urinária. Neste particular convem lembrar o achado de VIANNA que, em 6 cobaios encontrou parasitas vivos no ejaculado de 2 animais.

Em OKUMURA (1963), encontramos citações a respeito de parasitismo epitelial atribuída a LUCENA e col. (1962). Entretanto, baseados na indicação de OKUMURA, procuramos verificar as referencias sobre parasitismo do epitélio, em especial, do epitélio vesical e, surpreendentemente, não encontramos no referido trabalho nenhuma referência sobre parasitismo do epitélio vesical.

Além do parasitismo e das lesões dos órgãos genitais demonstrados, achamos lícitas as suposições levantadas. O conjunto de suposições feitas no decorrer desta discussão poderia ser enfocado na hipótese global de que as lesões e o parasitismo, na fase aguda, determinam uma acentuada atrofia e disfunção quer dos órgãos secretores, quer dos

órgãos condutores (vias). Isto parece ter ficado evidenciado no trabalho de FERREIRA e MEIRA DE OLIVEIRA, (1965) quando demonstraram uma diminuição no volume do sêmem de rato através da eletroejaculação. Não temos elementos para admitir que todas as lesões sejam reparadas integralmente. É mais seguro, entretanto, admitir que a reparação integral não ocorra, restando seguramente várias sequelas estruturais. Quanto às funcionais, efetivamente permanecerão como "patias", para sempre, como veremos adiante, quando da discussão das lesões nervosas. No tocante às gônadas existem vários aspectos, até certo ponto, paradoxais. Em primeiro lugar o confronto entre nossos achados e aqueles de VIANNA. A rigor, poderíamos nos estribar em uma saída muito cômoda, admitindo simplesmente que as experiências não são comparáveis por terem sido feitas em animais diferentes. Mas não é nossa intenção utilizar essa saída. Enquanto que nos cobaios, VIANNA encontra um parasitismo franco, do testículo, nos camundongos isso não ocorre. Já dissemos anteriormente que vários fatores (inóculo, cepa, espécie animal e idade, tempo decorrido da inoculação) são intervenientes no que tange aos aspectos do parasitismo e inflamação da fase aguda. Ficou patente, para nós, que tanto a albuginéa quanto a membrana tubular desempenham um papel de barreira ao tripanosoma. Este fato está estribado na ausência completa do parasitismo dos túbulos seminíferos e das células germinativas. Esta constatação é contrária à de GASPAR VIANNA no coelho. R.B. HEISCH e cols. (1968), inoculando diferentes espécies de tripanosomas (gambiense, brucei, rhodesiense) diretamente no testículo do coelho, coelho e rato observaram um comportamento diferente conforme a espécie de tripanosoma. Admitem que o Trypanosoma cruzi quando inocula-

do dentro do testículo do Hamster, pode ser encontrado dentro dos túbulos e que as formas em leishmânias, podem ser encontradas dentro das células de Sertoli. O aspecto das lesões por nós constatada nos testículos poderiam ser con-
dizentes com alterações decorrentes quer do estado da infecção aguda, quer por efeito tóxico dos parasitas ou por efeito das alterações tróficas, as quais seriam decorrentes de lesões nervosas, causando alterações por falta de condução ou modificações na pressão intra-canicular. De qualquer maneira é flagrante, nos animais inoculados, a atrofia testicular de cerca de 30%, em peso. As lesões histo-patológicas mais características se traduzem por danos da cinética da espermatogênese (ausência de espermiogênese), associados à lesões das células mais diferenciadas da linhagem germinativa até o estágio do espermatócito I pré-leptotênico. Alguns túbulos apresentam como células germinativas apenas raras espermatogônias tipo A (pó-eirentas). Outros túbulos tem o epitélio germinativo completamente desaparecido, restando apenas as células de Sertoli. Os danos cinéticos são mais gerais, enquanto que as lesões celulares ficam confinadas a poucos túbulos em áreas focais. A figura 25, que documenta o parasitismo da albugínea pode servir de argumento, para a sugestão de uma ação tóxica de leishmânia sobre o epitélio germinativo, tal a intensidade do parasitismo. Finalmente resta a discussão a respeito do fato mais óbvio e evidente da patogênese da Moléstia de Chagas experimental, a lesão dos neurônios autônomos, relacionados com os genitais internos. A relação funcional dos mesmos, embora não muito bem estabelecida, tem merecido segundo OWMAN e SJÖBERG(1972), mais atenção ultimamente. A área do trígono vesical incluindo o colo da bexiga e a uretra proximal tem grande quan-

tidade de catecolaminas o que é consistente com uma rica inervação adrenérgica dessa musculatura lisa. Essa inervação não é reduzida quando da desnervação alta (hipogástrica), indicando que ela se origina de gânglios periféricos, constituindo-se em neurônios adrenérgicos curtos. A remoção desses gânglios ou seu influxo simpático mais proximal resulta para esses Autores, em deficiência motora permanente da musculatura lisa e das estruturas relacionadas com o mecanismo da emissão do esperma, bem como do mecanismo de fechamento do colo vesical. Portanto, fica evidenciada a influencia desses neurônios do plexo justaprostático no mecanismo da dinamica da ejaculação. Por outro lado, FERREIRA (1968), demonstrou a diminuição do número de neurônios desse mesmo plexo, no cobaio, com lesões das fibras pós-ganglionares e lesões tróficas do testículo. Nós pudemos, no presente trabalho demonstrar que esses neurônios são destruídos na fase aguda da Moléstia de Chagas. Essa destruição ocorre em primeiro lugar em consequencia do parasitismo neuronal direto (vide figuras 27 a 30). Em um animal cerca de 25 leishmânias foram contadas dentro de um neurônio! Aspecto também característico é o de parasitismo das células satélites. O parasitismo de neurônios ou de células satélites, nunca era acompanhado de reação inflamatória dentro do gânglio (ganglionite). Por outro lado, quando a maioria dos neurônios apresentavam características de células lesadas ou em vias de degeneração era frequente a concomitância do infiltrado inflamatório e do desaparecimento de leishmânias, quer livres, quer dentro das células, caracterizando uma possível destruição neuronal por ação tóxica ou por reação imunológica. Este aspecto seria sugestivo de uma discussão sobre o problema mais importante e menos esclarecido

da Moléstia de Chagas, qual seja, o mecanismo íntimo da destruição neuronal. Não nos cabe a discussão desse problema, porque não é o nosso desiderato atual, mas seguramente dois mecanismos deverão estar implicados: o tóxico (por substâncias "neuro-tóxicas"), possivelmente associado a um mecanismo imunológico. Achamos lícito assinalar aqui, que para futuras investigações do mecanismo de destruição neuronal ou celular o gânglio justa-prostático ou a gordura justa-epididimária se constituiriam nas estruturas de escolha para investigações dessas naturezas. Partindo do princípio que uma vez, desenvolvida a defesa imunológica orgânica, o parasitismo "praticamente" seria abolido e supondo que as sequelas estruturais fossem mínimas, restará certamente a seqüela trófica e funcional decorrente das lesões neuronais, da fase aguda, caracterizando uma "patia" chagásica.

Portanto, o destino do chagásico dependerá do número de neurônios que ele terá destruído na fase aguda da Moléstia.

Não concordamos com afirmações tergiversas como as de OKUMURA (1963), quando diz: "as alterações neurovegetativas do chagásico crônico parecem-nos depender da maior ou menor destruição de células nervosas periféricas por parasitismo direto".

Evidentemente para tal afirmação seria necessário admitir-se que os neurônios só seriam lesados através do parasitismo direto, fato que realmente ocorre, porém atingindo apenas um número limitado de neurônios e só na fase aguda. Concomitantemente a esse parasitismo direto, ocor-

rem lesões neuronais sem o parasitismo da célula neuronal. Estas seriam explicadas por mecanismo tóxico (porque coincide com o aparecimento de células inflamatórias e a lise das leishmânias) ou imunológico. Portanto, nada é mais evidente na patogenia da Moléstia de Chagas do que admitir-se o preceito de KÜBERLE (1957), quando diz: o destino do chagásico se cumpre na fase aguda.

A evidência reside no fato de que na fase aguda da Moléstia os neurônios autônomos são destruídos aleatoriamente, quer por parasitismo direto quer por quaisquer outro meio, incluindo o tóxico, até provas em contrário.

Finalmente podemos inferir, com certa segurança, que no megacolon adquirido as lesões sexuais porventura associadas ou são também "patias" chagásicas ou poderão ser consequência de lesões operatórias.

-----oOo-----

C O N C L U S ã O

Os fatos demonstrados no presente trabalho se coadunam com a hipótese de que as lesões e o parasitismo da fase aguda, associados à destruição dos neurônios autônomos seja por parasitismo direto ou por quaisquer outros mecanismos, são os elementos patogenéticos das alterações precoces ou tardias, da Moléstia de Chagas, na esfera genital.

-----o0o-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, R.J.: Lesões do tecido adiposo na fase aguda da Doença de Chagas experimental, em camundongos. Tese de Docência-Livre apresentada à Cadeira de Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais. - Belo Horizonte, 1960.
- BECKER, P.L.: Comunicação Pessoal, 1973.
- BRENER, Z.: Contribuição ao estudo da Terapêutica Experimental da Doença de Chagas. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1961.
- FERREIRA, A.L. e OLIVEIRA, J.S.M.: Volume do sêmem obtido por eletroejaculação de ratos chagásicos (inoculados experimentalmente). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 7 (3):127-150, 1965.
- FERREIRA, A.L.: Alterações do testículo e do epidídimo de cobaias infectados experimentalmente com Trypanosoma cruzi. Tese de Docência-Livre apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1968.
- FERREIRA, A.L.: Patogênese das lesões testiculares e epididimárias em cobaias infectados experimentalmente com Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 12 (1):69-87, 1970.
- FREITAS, J.L.P.; LION, M.F. e TARTARI, J.: Resultados de uma investigação sobre Moléstia de Chagas realizada

- no Município de Marília e outros, com estudo clínico de 2 casos de doença. Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.Univ. S.Paulo, 8:81-92, 1953.
- HADDAD, J.; RAIÁ, A. e ERHARDT, E.A.: Estudo das atividades sexuais nos pacientes portadores de megacólon, antes e após a retosigmoidectomia abdominoperineal. Rev. Paul.Med. 55(5):343-354, 1959.
- HADDAD, J. e RAIÁ, A.: Alterações sexuais após o tratamento cirúrgico do megacólon congênito e adquirido. Rev. Assoc.Med.Bras. 15:509-512, 1969.
- HARTZ, P.H. e TOLEDANO, D.: Specific Orchitis in Chaga's Disease. Documenta de Medicina Geográfica et Tropica, 6:124-129, 1954.
- HEWESCH, R.B.; KILLICK-KENDRICK, R., DORRELL, J. and MARIDEN, P.D.: The behaviour of trypanosomes in the testicles of laboratory animals. Tr.Roy.Soc.Trop.Med. and Hyg, 62(1):5, 1968.
- KÜBERLE, F.: Patogenia da Moléstia de Chagas; estudo dos órgãos musculares ócos. Rev.Goiiana Med. 3:155-180, 1957.
- LISON, L.: Histochemie et Cytochemie Animales. Principes et méthodes. 3eme ed. Gauthiers-Villars, Paris, 1960.
- LUCENA, D.T.; CARVALHO, J.A.M., ABATH, E.C. e AMORIM, N.: Terapêutica experimental da Doença de Chagas: I. Ação de uma S-Aminoquinoleína em ratos albinos. Hospital,

62:1278-1296, 1962.

McMANUS, J.F.A.: 1946 (Citado por LISON)

MERRIL, W.C.: Immunoreproduction: Concepts of Immunology. Biol. of Reprod. 6:335-357, 1972.

OKUMURA, M.; BRITO, T., PEREIRA DA SILVA, L.H.; CARVALHO DA SILVA, A.R., CORREIA NETTO, A.: The pathology of experimental Chaga's Disease in mice: I. Digestive tract changes, with a reference to necrotizing arterites. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 2(1):17-28, 1960.

OKUMURA, M.; CARVALHO DA SILVA, A. e CORREIA NETTO, A.: Estudo da patogenia das lesões vasculares na doença de Chagas experimental em camundongos. Nota prévia. Rev. Paul. Med. 61:265-266, 1962.

OKUMURA, M.; MATTOSINHO FRANÇA, L.C. e CORREIA NETTO, A.: Comentários sobre a patogenia da Moléstia de Chagas. Especial referencia à infecção experimental em camundongos. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, 18:151-164, 1963.

OKUMURA, M.: Citado por HADDAD e RAIA, 1969.

OWMAN, CH. and SJÖBERG, N.O.: The importance of short adrenergic neurons in the seminal emission mechanism of rat, Guinea-pig and man. J. Repr. Fert. 28:379-387, 1972.

PIZZI, T.P.: Localización pancreática predominante y fenó-

meno de esteato-necrosis en ratones experimentalmente infectados con Trypanosoma cruzi. Bol.de Inform. Parasit. Chilenas, 8:11-12, 1953.

VIANNA, G.: Contribuições para o estudo da Anatomia Patológica da "Moléstia de Carlos Chagas". Esquizotripanose Humana ou Tireoidite Parasitária. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 3(2):276-294, 1911.

-----o0o-----