



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO CLONAL DA CEPA COLOMBIANA DO
TRYPANOSOMA CRUZI: ESTUDO DO COMPORTAMENTO
BIOLÓGICO, BIOQUÍMICO E DA RESPOSTA TERAPÊUTICA
DOS CLONES ISOLADOS**

EDSON LUIZ PAES CAMANDAROBA

**Salvador - Bahia - Brasil
1999**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**CARACTERIZAÇÃO CLONAL DA CEPA COLOMBIANA DO
TRYPANOSOMA CRUZI: ESTUDO DO COMPORTAMENTO
BIOLÓGICO, BIOQUÍMICO E DA RESPOSTA TERAPÊUTICA
DOS CLONES ISOLADOS**

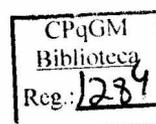
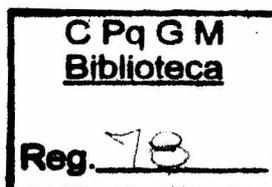
EDSON LUIZ PAES CAMANDAROBA

Professor-orientador: Dr^a. SÔNIA GUMES ANDRADE

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de mestre em
Patologia, área de concentração
em Patologia Experimental.

Salvador- Bahia

1999



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /
FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Camandaroba, Edson Luiz Paes
C172 Caracterização clonal da cepa Colombiana do *Trypanosoma*
Cruzi: estudo do comportamento biológico, bioquímico e da
resposta terapêutica dos clones isolados / Edson Luiz Paes
Camandaroba. _ Salvador: Faculdade de Medicina da UFBA /
CPqGM, 1998.
159p. : il.
Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal
da Bahia, 1998.
1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Clones. 3. Fenótipo. 4. Quimioterapia.
I. Título.
CDU 593.161:575.21:615.28

15281

1.129

1712

MTN 12-7
001635

593.161:575.21:615.28
CAMANDAROPA, EDSON LUIZ PAES
CARACTERIZAÇÃO CLONAL DA CEPA COLOMBIANA DO
Trypanosoma cruzi: ESTUDO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO, BIOQUÍMICO E DA
RESPOSTA TERAPÊUTICA DOS CLONES ISOLADOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Tania Cremonini de Araújo-Jorge

Dra. Tania Cremonini de Araújo-Jorge
Pesquisadora Titular
FIOCRUZ

Marilda de Souza Gonçalves

Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Adjunta
CPqGM-FIOCRUZ

Sonia Gumes Andrade

Dra. Sonia Gumes Andrade
Pesquisadora I-A
CNPq

A Ciência é a última fase de aprendizado do homem no Reino Hominal. Ela abrange todo o conhecimento no campo do saber, quando enquadrado nos itens estabelecidos pelas Leis Universais.

A Ciência Natural é despertada no homem quando ele se conscientiza de suas obrigações perante o Criador, compreendendo a lógica da vida e fazendo de si um instrumento das Leis.

O .CI. D. E. M. NT.E- 7 º C.D.E

**Ao irmão Jair Tércio, que me ensina
o verdadeiro sentido da vida, e a Herberg, meu filho,
pelo seu amor.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sônia Gumes Andrade, pela oportunidade que me foi concedida e pela orientação durante toda a realização do trabalho;

À Loja Universidade Biologia da O.C.I.D.E.M.N.T.E-7º C.D.E., que despertou em mim o interesse pelo estudo da doença de Chagas;

À Profa. Dra. Rozália Figueira Campos, pela orientação na técnica de clonagem e análise dos resultados das isoenzimas;

Ao biólogo Juracy Magalhães pela orientação na técnica de isoenzimas;

Ao Dr. Edson Moreira Duarte Jr., pelas sugestões na análise estatística dos resultados;

À pesquisadora Eliana Galvão dos Reis e à Dr^a. Marilda Gonçalves, pela realização e orientação da técnica do PCR ;

Ao Dr. Mittermayer Galvão dos Reis, pelo apoio institucional;

Ao Dr. Manoel Barral Netto, pela dedicação e orientação como coordenador do curso de pós-graduação em Patologia Humana;

À Bibliotecária Rosália Meires Oliveira da Silva, pela orientação acadêmica;

Às Bibliotecárias Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, e Ana Christina Caldeira de Campos pelo auxílio na obtenção de artigos científicos e pela revisão bibliográfica; e aos seus demais funcionários;

Aos Funcionários do Centro de Comunicação Visual, Itamar Bastos Crispim e Tânia Farias, pelo auxílio e colaboração na computação gráfica

À Técnica Dinalva França de Jesus, pelo auxílio cotidiano na condução da preparação de cultura das formas do *T. cruzi*, trabalho imprescindível para a realização da técnica de isoenzimas;

Às Biólogas Ariane Pimentel e Ana Cristina Gonzalez, pela ajuda na técnica de imunofluorescência;

Às Biólogas Elianita Suzart, Márcia Souza e Luciana Silva, pelo apoio técnico, e solidariedade;

Aos Técnicos do biotério, Presciano da Silva Correia, Antonia Salustiana da Silva, Oswaldo Gomes pela manutenção dos camundongos, utilizados nesse trabalho;

Ao CNPQ, Conselho Nacional de Pesquisas Científicas e à FIOCRUZ pela concessão da bolsa de estudo durante a realização do mestrado.

Sumário

LISTA DE ANEXOS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais.....	2
1.2. Conceito de cepas/ biodemas/ zimodemas/ esquizodemas.....	2
1.3 Estudo dos biodemas	3
1.4. Clonagem de cepas/ conceito de clones.....	6
1.5. Análise dos zimodemas.....	10
1.6. Análise dos esquizodemas.....	14
1.7. Caracteres da cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	14
1.8. Quimioterapia experimental.....	19
1.8.1. Mecanismos de ação dos quimioterápicos.....	19
1.8.2. Relação entre os tipos de cepas e a resposta aos quimioterápicos.....	22
2. OBJETIVO GERAL	28
3. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Cepa do <i>T. cruzi</i>	29
4.2. Clonagem da cepa colombiana do <i>T. cruzi</i>	29
4.3. Obtenção do inóculo de formas tripomastigotas.....	30
4.4. Grupos experimentais para caracterização morfológica, histopatológica e isoenzimática dos clones.....	31
4.5. Parasitemia.....	31
4.6. Mortalidade.....	32
4.7. Estudo morfológico.....	33
4.8. Estudo histopatológico.....	33
4.9. Isoenzimas.....	34
4.9.1. Obtenção de cultura do <i>T. cruzi</i> (cepa parental e os seus clones).....	34
4.9.2. Extrato enzimático.....	35
4.9.3. Enzimas.....	35
4.9.4. Eletroforese em gel de amido.....	35
5. Grupos experimentais de quimioterapia.....	37
5.1. Tratamento quimioterápico.....	38
6. Testes de cura.....	38
6.1. Testes parasitológicos.....	38
6.1.1. Exame direto da parasitemia.....	38
6.1.2. Subinoculação.....	39
6.1.3. Hemocultura diagnóstica.....	39
6.2. Testes sorológicos.....	39
6.3. (PCR) Reação em cadeia da polimerase.....	41
6.3.1. Coleta das amostras	41
6.3.2. Extração do DNA	41
6.3.3. Amplificação da região variável dos minicírculos do DNA do Cinetoplasto	

pelo PCR.....	42
6.3.4. Oligonucleotídeos sintéticos (“primers”)	43
6.3.5. Eletroforese.....	43
6.4. Hibridização.....	44
6.4.1. Transferência do DNA para a membrana.....	44
6.4.2. Sondas.....	44
6.4.3. Pré-hibridização e hibridização.....	45
6.4.4. Lavagem da membrana e detecção de sinais.....	45
7. RESULTADOS.....	47
7.1. Grupos de estudos experimentais.....	47
7.2. Caracteres biológicos dos clones.....	47
7.2.2. O curso da infecção.....	47
7.3. Parasitemias.....	47
7.4. Mortalidade.....	48
7.5. Morfologia das formas sanguícolas.....	49
7.6. Enzimas.....	49
7.7. Histopatologia.....	50
7.7.1. cepa Colombiana parental (controle).....	50
7.7.2. Estudo dos clones.....	50
7.8. Quimioterapia.....	52
7.8.1. Parasitemia.....	52
8. Testes de cura.....	53
8.1. Testes parasitológicos.....	53
8.2. Testes sorológicos.....	54
8.3. PCR.....	54
9. DISCUSSÃO.....	56
10. CONCLUSÕES.....	69
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
11. ANEXOS.....	87

LISTA DE ANEXOS

Anexo I- Tabelas (Comportamento biológico).....	87
Anexo II- Tabelas (Quimioterapia)	91
Anexo III- Tabelas (Testes de cura)	93
Anexo IV- Figuras (Comportamento biológico)	103
Anexo V- Figuras (Quimioterapia).....	112
Anexo VI- Pranchas (Isoenzimas)	118
Anexo VII- Pranchas (Histopatologia).....	134
Anexo VIII- Pranchas (PCR)	149
Anexo IX- Substâncias químicas das reações de isoenzimas	155

RESUMO

Caracterização clonal da cepa Colombiana do *T. cruzi*: estudo do comportamento biológico, bioquímico e da resposta terapêutica dos clones isolados. A cepa Colombiana do *T. cruzi*, protótipo do biodema III e do zimodema 1, apresenta caracteres bem definidos quanto à sua patogenicidade e tropismo tissular. Foi investigada a estrutura clonal dessa cepa, com o objetivo de caracterizar as suas populações e investigar a relação entre a resposta aos quimioterápicos e as características dos seus clones. Foram isolados sete clones. Oito grupos de camundongos albinos Swiss foram infectados com a cepa parental e seus clones, com inóculos que variaram entre 5×10^4 a 1×10^5 , e analisados os caracteres biológicos (índices parasitêmicos, mortalidade, morfologia das formas sangüícolas) e isoenzimáticos (PGM, GPI, ASAT, ALAT), e realizado o estudo histopatológico para investigação do tropismo tissular e da patogenicidade. Resposta à quimioterapia: Oito grupos de camundongos infectados com a cepa parental e com os clones foram tratados com o Benzonidazol durante 90 dias, a partir do 20º dia de infecção. Os animais tratados, foram submetidos aos testes de cura parasitológicos, ao teste sorológico e ao teste molecular realizado pelo PCR do sangue periférico. Os resultados mostraram que, tanto a cepa Colombiana parental, como os sete clones, apresentam as características básicas das cepas do Tipo III e perfil isoenzimático do Zimodema 1, embora com variações no número de bandas em ALAT e ASAT. A cepa parental mostrou virulência elevada, com índice de mortalidade alto até 30 dias (100%), também observado em quatro dos clones, com índices de 78 a 100%. Em três clones a mortalidade foi baixa (7% a 23%). As lesões histopatológicas foram características das cepas de Tipo III, com predominância de parasitismo de músculo esquelético e, em menor grau, do miocárdio, com lesões necrótico- inflamatórias extensas, entre 20 e 30 dias de infecção. Os resultados da quimioterapia mostraram alta resistência da cepa e dos clones, ao tratamento com o Benzonidazol. Em conclusão, a estrutura clonal da cepa Colombiana, na amostragem estudada, é homogênea, com variações de virulência, mantendo os perfis parasitêmicos, o padrão Z1 do zimodema, alta patogenicidade e resistência ao tratamento quimioterápico.

ABSTRACT

The Colombian strain of *T. cruzi*, prototype of biodeme III and zymodeme 1, presents well defined characters with reference to its pathogenicity and tissue tropism. The clonal structure of this strain was studied in order to characterize its populations and to investigate the relationship between chemotherapeutic response and its clonal characteristics. Seven clones were isolated. Eight groups of Swiss mice were infected with parental strain and clones, respectively with inocula from 5×10^4 to 1×10^5 blood forms; their biological (parasitemic rates, mortality, morphology of blood forms) and isoenzymic (PGM, GPI, ASAT, ALAT) characters were analysed; histopathological study was performed in order to investigate tissue tropism and pathology. Response to the chemotherapy: eight groups of mice, infected with parental strain and clones, were treated with Benznidazole during 90 days, from the 20th day of infection. Treated animals were submitted to parasitological tests of cure and to serologic test. Examination of peripheral blood by the PCR (Polymerase chain reaction) method was performed as cura test, to detect parasite positive cases post treatment. Results indicated that, both the parental Colombian strain and the seven clones, exhibit the Type III strain basic characteristics and zymodeme 1 isoenzymic profile, although presenting variations in ALAT and ASAT bands quantities. The Parental strain presented elevated virulence, with high mortality rate until 30 days (100%), that was also observed in four of the studied clones, with percentages ranging from 78 to 100%. Mortality was low (7% to 23%) in the other three clones. Histopathological lesions were characteristics of Type III strains, with predominance of skeletal muscle parasitism and, to a minor degree, in myocardium, exhibiting necrotic-inflammatory extensive lesions from 20th to 30th day of infection. Chemotherapeutic results have shown strain and clonal resistance to Benznidazole treatment. In conclusion, clonal structure of Colombian strain is homogeneous, although presenting virulence variations but maintaining zymodeme profiles, high pathogenicity and resistance to treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

O *Trypanosoma cruzi* descrito por Carlos Chagas em 1909, com a designação de *Schizotripanum cruzi*, é um protozoário da Ordem Kinetoplastida, da Família Trypanosomatidae e Gênero *Trypanosoma*, apresentando um ciclo evolutivo alternado, entre o hospedeiro vertebrado e o inseto vetor da Subfamília Triatominae.

Incluído na Seção Stercoraria por HOARE (1964) (PESSOA, 1988), o parasito evolui no intestino posterior do inseto hemíptero hematófago, onde atinge a forma tripomastigota metacíclica infectante, e no sangue e tecidos do hospedeiro vertebrado, onde também completa o seu desenvolvimento até as formas tripomastigotas sangüícolas, também infectantes. HOARE classificou a espécie no Subgênero *Schizotripanum* em razão das suas características peculiares, como a forma tipicamente recurvada em C, e cinetoplasto volumoso, próximo da extremidade posterior que é pontiaguda.

Esses parasitos, após isolados dos hospedeiros, por meio de xenodiagnóstico, hemocultura ou outros métodos, são mantidos no laboratório por passagens sucessivas, em culturas axênicas, em culturas de células, em vetores ou em animais de laboratório. Esses isolados foram designados por LUMSDEM (1977) como sendo cepas. Deste modo, cepa constitui uma população de parasitos de uma mesma origem, podendo ser homogênea ou heterogênea. Tanto cepas (segundo conceito já firmado), como clones, que são populações isoladas de cepas, podem

ser caracterizados sob vários aspectos, isto é, sob critérios biológicos (biodemas), bioquímicos (enzimáticos) ou análise molecular (esquizodema).

Desse modo, com objetivo de dar continuidade, no Laboratório de Doença de Chagas Experimental, aos estudos de populações que se constituem em cepas, realizou-se a clonagem da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, que é o protótipo do Biodema III, isolando-se sete clones, que foram analisados quanto ao seu comportamento biológico, zimodêmico, e resposta quimioterápica.

1.2 Conceito de cepas/biodemas/zimodemas/esquizodemas

Cepas do *Trypanosoma cruzi* são isolados mantidos em laboratório por passagens sucessivas em culturas axênicas, culturas de células, em vetores ou em animais experimentais, de acordo com LUMSDEN (1977).

Os biodemas são tipos de cepas do *T. cruzi* agrupadas, de acordo com o seu comportamento biológico, em animais experimentais, pela análise da parasitemia, morfologia das formas sangüícolas, virulência, patogenicidade e histotropismo. Foram classificados de acordo com ANDRADE (1974) em Tipos I, II, III.

Os zimodemas são os padrões isoenzimáticos que, em conjunto, caracterizam o fenótipo das cepas, pela análise genética da mobilidade eletroforética de enzimas multilocus em gel de amido. Sua classificação foi

proposta por MILES et al. (1980) em três zimodemas (Z1, Z2b, Z2) e por ROMANHA (1982) em quatro zimodemas (A,B,C,D).

A análise do esquizodema é uma técnica para a caracterização de tripanosomatídeos, que se baseia na separação eletroforética de fragmentos produzidos por endonucleases de restrição do kDNA (DNA do cinetoplasto) e do único e abundante DNA mitocondrial que define a Ordem Kinetoplastida. O padrão eletroforético obtido, chamado DNA "fingerprint", é um marcador molecular do cinetoplasto que permite classificar cepas e clones em esquizodemas. Os esquizodemas correspondem a grupos de organismos que exibem padrão idêntico de minicírculos do kDNA (GONÇALVES & MOREL., 1984). Outras técnicas têm sido introduzidas para análise do DNA do *T. cruzi*, como RFLP (polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição), RAPD (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso), PFGE (eletroforese em campo pulsado) e SSR-PCR("Primers" âncora de seqüência repetida), utilizadas mais recentemente por OLIVEIRA et al. 1997; MACEDO & PENA, 1998.

1.3. Estudo dos biodemas

ANDRADE et al. (1970), visando estudar comparativamente os aspectos biológicos, morfológicos e lesões histopatológicas em animais experimentais infectados por cepas de diferentes procedências (cepas Peruana, São Felipe - Ba, Colombiana), mostraram que as mesmas, além de diferirem na patogenicidade, mortalidade e parasitemia, apresentaram também diferenças nos padrões morfológicos e nas lesões tissulares.

ANDRADE (1974), após fazer o estudo citado acima, classificou as cepas mantidas no laboratório em três tipos biológicos ou biodemas designados como Tipo I, II, III, sendo essa classificação adotada como modelo padrão pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1986).

As cepas do tipo I apresentam taxa de multiplicação rápida, com parasitemia máxima e mortalidade entre o 7º e o 12º dia de infecção, predominância de formas delgadas e macrofagotropismo na fase inicial da infecção, tendo como protótipos as cepas Y e Peruana;

As cepas do Tipo II apresentam multiplicação relativamente baixa, com picos parasitêmicos irregulares entre o 12º e 20º dias de infecção, quando a mortalidade atinge o máximo, predominância de formas largas com baixa percentagem de formas delgadas na fase inicial da infecção, miotropismo com envolvimento predominante do miocárdio, tendo como protótipos as cepas 12 SF e 21 SF(São Felipe - BA).

As cepas do Tipo III apresentam baixa multiplicação inicial, com picos parasitêmicos altos e tardios (20º e 30º dias após a infecção), baixas taxas de mortalidade até o 50º dia de infecção, predominância de formas largas ao longo de todo o curso da infecção e miotropismo com envolvimento predominante do músculo esquelético, tendo como protótipo a cepa Colombiana .

Cepas protótipos dos diversos biodemas como as cepas Y, 21 SF (São Felipe - BA) e Colombiana, dentre outras, acompanhadas em laboratório, têm mantido a sua estabilidade há mais de 20 anos, embora tenha se observado uma exaltação da virulência desta última, com mortalidade mais elevada e mais

precoce, até os 30 dias. BRENER et al. (1974), estudando as curvas de parasitemia das cepas FL, Berenice e PNM após oito anos seguidos de passagens repetidas mostraram que cada cepa manteve a sua estabilidade.

ANDRADE et al. (1985), estudando a resposta imunológica e biológica em camundongos Swiss, com os três diferentes tipos de cepas do *T. cruzi* (Tipo I - Peruana; Tipo II - 12 SF e 21 SF; Tipo III - Colombiana), mostraram diferentes modelos para cada cepa. Todas as cepas protótipos determinaram uma diminuição nos níveis de IgG1 no início da infecção, com recuperação variável para cada cepa. Foi evidenciado progressivo aumento de IgG2a após o 14º dia de infecção, embora com diferentes taxas, enquanto que os níveis de IgG2b aparecem no início da infecção, mantendo níveis altos em animais infectados com a cepa 21 SF. Os autores determinaram, ainda, que a cepa Colombiana apresentou uma correlação positiva entre parasitemia e os níveis de IgG1, IgG2a e IgG2b, com níveis elevados, coincidindo com picos parasitêmicos tardios entre o 20º e 30º dias de infecção. Já a cepa Peruana apresentou decréscimo no início da infecção, seguido de níveis altos de IgG2a e IgG2 b entre o 14º e 16º dias de infecção.

Ao analisarem, conjuntamente, os níveis de Ig e mortalidade (IgM, IgG1, IgG2a e b), os autores mostraram que existe uma correlação significativa entre a infecção dos animais com cepa Colombiana e os níveis de IgG1 e IgG2a enquanto que a cepa 12 SF apresentou essa correlação entre os níveis de IgG2a e b. Os níveis de IgM elevaram-se nos três tipos de cepas a partir do 14º dia de infecção,

sendo que os níveis mais altos foram observados com a cepa Colombiana e, os mais baixos, com a cepa Peruana.

ANDRADE et al. (1981), após fazerem a análise de cada antígeno, contra antisoros homólogos e heterólogos de diferentes cepas do *T. cruzi*, por meio de imunoeletoforese, verificaram que o soro anti-Peruana e anti-21 SF, quando reagiram com os antígenos heterólogos mantiveram o mesmo padrão observado em sua reação com os antígenos homólogos. O soro anti-Colombiana, entretanto, mostrou padrões diferentes quando reagiu com os antígenos heterólogos. Esses resultados sugeriram a existência de componentes comuns nas três cepas, que diferem quanto à sua imunogenicidade, e que a cepa Colombiana tem, além disso, componentes próprios que diferem das demais.

1.4. Clonagem de cepas/Conceito de clones

Um clone é um conjunto de organismos originados de uma única célula que, por divisões mitóticas, dá origem a células filhas, geneticamente idênticas entre si.

O método de clonagem é a primeira etapa para se estudar populações de clones, podendo ser realizado através do isolamento de apenas uma forma tripomastigota (DVORAK , 1985) ou por diluições limitantes (GOLDBERG & SILVA PEREIRA ,1983).

As principais vantagens de se estudar clones isolados de cepas do *T. cruzi* residem na possibilidade de diferenciar clones patogênicos dos não patogênicos; determinar a homogeneidade ou heterogeneidade das

subpopulações; detectar e diagnosticar individualmente o agente etiológico, compreendendo a sua epidemiologia e o seu modo de transmissão; tentar explicar os sintomas clínicos e as diversas manifestações da doença de Chagas em grandes áreas geográficas; e compreender a inter-relação do hospedeiro com as subpopulações do parasito.

A caracterização biológica de 19 clones das Cepas CA-I e Miranda, isolados de pacientes chagásicos crônicos e em meio líquido LIT (ENGEL et al.,1982), indicou diferenças significantes inter e intra-grupos, sugerindo a presença de subpopulações e heterogeneidade genética, manutenção da estabilidade na taxa de crescimento e volume modal. Durante oito meses, dois clones (CA-I/64 e Miranda/83) não mostraram variação, mas quando foram transferidos para o meio BESM e transferidos para o meio LIT, a taxa de crescimento modal e volumes modais foram idênticos às da cepa original crescida em meio LIT. Diferenças significantes em volumes modais foram encontradas entre cepas clonadas de Miranda e CA-I. A falta de correlação entre a taxa de crescimento e volume modal implica que essas características são independentes, sugerindo a presença de subpopulações dentro de uma cepa (ENGEL et al., 1982).

DVORAK (1984), estudando "in vitro" os clones CA-I/71, CA-I/72, Miranda/76 Miranda/80, quanto à infecção em músculo esquelético de embrião bovino, mostrou que o clone Ca-I/71 foi o mais infeccioso, sugerindo diferenças na quantidade de receptores como a N-Acetyl-Glicosamina dos parasitos para explicar esse fenômeno.

BONGERTZ & DVORAK (1983), estudando por meio de imunoeletoforese a composição antigênica de duas cepas do *T. cruzi*, Tulahuen e Y, e de seis clones, WA-250 /1, WA-250/2, Esmeraldo/2 (Esm/2 e Esm/3), CAN-III/1, CAN-III/2, mostraram uma variação entre o número de antígenos comuns. Utilizando-se o soro imune anti-Y, anti-Tula, anti-Esm/2, e CAN-III-1 e CAN-III-2 pode-se detectar cinco antígenos comuns, para todos os isolados. O soro imune dos clones anti-WA-250/2 e anti-Esm/3 apresentaram seis antígenos comuns, enquanto que o anti-WA-250/1 apresentou sete antígenos comuns para todos os isolados. Os autores encontraram antígenos específicos nos clones Esm/2 e Esm/3. Esses dados, analisados em conjunto, indicaram que as cepas do *T. cruzi* são compostas de populações antigenicamente heterogêneas.

POSTAN et al. (1983), ao comparar a evolução da infecção de dois clones (Sylvio X-10 /4 e Sylvio X-10/7) em camundongos da linhagem C3H/HEN--, mostraram que o primeiro clone levou a uma infecção crônica, enquanto que o segundo levou a uma infecção letal aguda, com altos picos parasitêmicos e taxa de sobrevivência menor. Resultados semelhantes foram obtidos por POSTAN et al. (1986), quando analisaram a virulência e patogenicidade dos mesmos clones em camundongos C3H /He. Comparando-se os resultados obtidos anteriormente com os obtidos a partir da infecção em camundongos da linhagem C57/BL6, esses animais apresentaram maior susceptibilidade (POSTAN et al., 1984).

POSTAN et al. (1986), estudando a patogenicidade de dois clones (Sylvio-X10/4 e Sylvio X-10/7) em camundongos isogênicos, verificaram que eles produziram infiltrado inflamatório no coração e músculo esquelético, e

encontraram a presença de parasitos em 59% dos camundongos infectados. Os camundongos infectados com o clone Sylvio-X10/7 apresentaram níveis elevados de IgG.

Na infecção de fibroblastos de camundongos com 2 clones isolados da Cepa Y, estes apresentaram diferentes habilidades de penetração e de fagocitose para macrófagos. A caracterização biológica do segundo clone mostrou diferença de patogenicidade para o animal experimental, determinando baixa parasitemia e mortalidade tardia em camundongos (TITTO et al., 1987).

O comportamento biológico em animais experimentais de clones isolados das cepas Y e CL, indicou serem heterogêneos, enquanto que clones isolados da cepa MR apresentaram homogeneidade nos seus caracteres (MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988).

O estudo do clone CL Brener mostrou diferenças de comportamento em relação a cepa CL, apresentando parasitismo preferencial no coração e células musculares, e curvas parasitêmicas definidas, promovendo mortalidade em camundongos e suscetibilidade às drogas conhecidas (ZINGALES et al., 1997).

Animais experimentais infectados com o clone CL-14 apresentaram ausência de parasitismo e de alterações histopatológicas, o que indicou ser esse clone não infectivo (LIMA et al., 1995); entretanto, apesar dessa aparente não infectividade, os camundongos infectados com esse mesmo clone e com a cepa Y (virulenta e letal) desenvolveram alta resistência a essa cepa e persistiram com a parasitemia negativa indicando um potencial vacinante.

LAURIA- PIRES & TEIXEIRA (1994), analisaram o comportamento biológico dos clones h1 e h2, isolados de pacientes chagásicos, com doença no coração, e dos clones m1, m2, m3 e m4, de pacientes com megaesôfago. Quando inoculados em camundongos da linhagem Balb/c, os clones h1 e h2 apresentaram baixas parasitemias, enquanto que os clones m1, m2, m3, e m4 apresentaram altas parasitemias.

Embora não houvesse confirmação da ocorrência de populações clonais, coexistindo num mesmo paciente (LANA et al., 1996), diferenças marcantes foram encontradas, no comportamento biológico, zimodêmico e esquizodêmico entre dois isolados da cepa Berenice (primeiro caso descrito da doença de Chagas, por Carlos Chagas, em 1909) coletados na paciente Berenice, em idades diferentes.

CAMPOS et al. (1999), analisando os RFLPs (Polimorfismo de fragmentos gerados por enzimas de restrição) de produtos amplificados pelo PCR (Reação em cadeia da polimerase), de clones e subclones isolados da cepa 21 SF (Tipo II), mostraram alto percentual de homologias (80 a 100%) entre a cepa e os clones, e entre clones e subclones.

1.5. Análise dos zimodemas

Os estudos de cepas oriundas de diferentes procedências e que apresentaram comportamentos biológicos e tropismos tissulares, também diferentes, permitiram levantar hipóteses sobre a heterogeneidade das cepas classificadas em diferentes biodemas. O estudo dos zimodemas por ANDRADE et al. (1983) mostrou correlações nítidas entre os aspectos biológicos e zimodêmicos; correlacionou as cepas do Tipo II com Z2, Tipo III com Z I; e as

cepas do Tipo I mostraram um perfil peculiar que posteriormente foi identificada em cepas da Bolívia (TIBAYRENC et al., 1984 e do Chile (MILES et al., 1980; MILES, 1985), sendo designadas como Z2b por estes últimos.

CASTRO SILVA & ANDRADE (1989), ao investigarem a estabilidade dos extratos enzimáticos de nove cepas de *T. cruzi*, armazenadas por um período longo em nitrogênio líquido, e comparando com os extratos dessas mesmas cepas, armazenadas por um período de um ano, mostraram que os perfis eletroforéticos mantiveram-se idênticos.

As cepas do Tipo I (Y), Tipo II (21 SF) e Tipo III (Colombiana) após passagens em espécies de triatomíneos autóctones e alóctones, ou quando passadas, sucessivamente, em diferentes meios de cultura, também não alteraram o comportamento biológico e os padrões isoenzimáticos (MAGALHÃES, et al., 1985; MAGALHÃES et al., 1996; MAGALHÃES & ANDRADE, 1991). CAMPOS & ANDRADE (1996) também demonstraram estabilidade isoenzimática e dos caracteres biológicos da cepa 21 SF e entre seus clones e sub- clones.

Quando TIBAYRENC & MILES (1983) compararam os zimodemas de cepas e clones brasileiras e bolivianas, concluíram que o Z2 apresentou heterozigossidade, sugerindo a hipótese da diploidia e ausência da reprodução sexuada.

TIBAYRENC et al. (1986), após analisarem os zimodemas de 121 cepas oriundas de várias áreas geográficas, propuseram uma complexa estrutura multiclonal. Os resultados obtidos permitiram aos autores concluir que a evolução clonal do *T. cruzi* é ancestral, e que numerosos clones foram evoluindo,

independentemente, ao longo do tempo. A partir desses estudos, a teoria da estrutura clonal de protozoários tem sido proposta por outros autores, como TIBAYRENC & AYALA (1987; 1991).

ROMANHA (1982), após classificar cepas em zimodemas A, B, C, D, demonstrou identidade total entre 14 clones (Zimodema B) derivados da amostra de Zimodema B, e 12 clones (Zimodema C) derivado da amostra C. Dez clones (Zimodema A) e um clone (zimodema D), derivado da amostra de Zimodema A, apresentaram identidade parcial com seus parentais. Essa identidade parcial também foi observada em um clone (zimodema A), em 32 clones (Zimodema C) e em um clone (Zimodema D), derivados da amostra de zimodema D. Essa análise sugeriu uma homogeneidade entre clones derivados de Zimodemas B e C e os seus parentais.

BRENIERE et al. (1991), analisando as isoenzimas de cepas oriundas do Peru, mostraram uma variabilidade isoenzimática baixa, enquanto que vários clones isolados do Chile e Bolívia, indicaram heterogeneidade enzimática. Esta heterogeneidade é explicada pela circulação de hospedeiros invertebrados e vertebrados, albergando clones do *T. cruzi* entre esses dois últimos países.

GOMES et al. (1991) após estudarem em três cepas (A138, B147, C231) do *T. cruzi* (zimodemas A, B, C,) e 20 clones da 1ª geração, dez clones da 2ª e quatro clones da 3ª geração, mostraram que os clones obtidos apresentaram identidade total com os parentais. Analisaram a cepa D150 (Zimodema D) e verificaram que, dos 29 clones estudados na 1ª geração, 28 foram classificados como Zimodema A e, somente um como Zimodema C, confirmando ser essa cepa

heterogênea. Os autores, ao compararem esses resultados com os padrões de kDNA, confirmaram que o clone da cepa D150 (Zimodema C) apresentou padrão idêntico ao kDNA da cepa parental.

Cento e nove isolados do *T.cruzi* da Bolívia, oriundos de triatomíneos domiciliares e do homem, foram classificados em dois zimodemas principais e caracterizados por aparecerem em diferentes altitudes, de circularem simpatricamente no ciclo de transmissão doméstica, confirmando a hipótese de diploidia e ausência de reprodução sexuada (TIBAYRENC & DESJEUX, 1983).

Dos 132 isolados do *T.cruzi* coletados no sul da Bolívia, transmitidos simpatricamente pelo mesmo vetor *Triatoma infestans*, somente cinco diferentes enzimas foram registradas. A freqüência dos genótipos obtidos demonstrou a ausência da sexualidade mendeliana (TIBAYRENC et al., 1984). TIBAYRENC & AYALA (1988) encontraram uma alta variabilidade enzimática, após estudarem várias cepas provenientes dos Estados Unidos e América do Sul, e sugeriram que os parasitos são diplóides e que não há indicação de reprodução sexual.

Apesar dessa variabilidade intraespecífica das cepas, até aqui apontada, evidências de recombinação genética em cepas, e clones de uma mesma área geográfica, a partir da análise de três genes glicolíticos, foram sugeridas por BOGLIOLO et al. (1996). Essas recentes conclusões são sugestivas de uma nova interpretação sobre origem evolutiva de clones do *T. cruzi*, proposta por TIBAYRENC et al. (1986), principalmente no que diz respeito à origem de clones partir de uma população com reprodução sexual, até então não aceita pela maioria dos autores.

LAURENT et al. (1997), avaliando o impacto da evolução clonal na diversidade biológica, propuseram a formação de três "clonets" 19/20, próximos entre si, e distantes do 39, o que somente veio a confirmar a hipótese de que houve uma divergência ancestral e evolução independente de clones.

1.6. Análise dos esquizodemas

Os esquizodemas correspondem a grupos de organismos que exibem padrão idêntico dos minicírculos do kDNA (GONÇALVES & MOREL, 1984).

Os tipos de análise utilizados, para o estudo do DNA do cinetoplasto, DNA nuclear e DNA total, são diversificados.

O DNA "fingerprint" baseia-se na separação eletroforética dos fragmentos dos minicírculos produzidos por digestão do DNA do cinetoplasto e mitocondrial, efetuada por endonucleases de restrição (GONÇALVES & MOREL, 1984).

Os fragmentos do DNA do cinetoplasto, produzidos pela digestão de enzimas de restrição, exibem diferentes padrões, sendo caracterizados como RFLP (polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição)(MACEDO & PENA, 1998).

O RAPD (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso) permite detectar fragmentos em 0,1-1,0 ng do DNA total, sendo uma técnica mais sensível do que o DNA "fingerprint" (MACEDO & PENA, 1998).

O SSR-PCR ("primers" âncora de seqüência simples repetida) amplifica regiões inter-microsatélites, permitindo detectar bandas múltiplas hipervariáveis (OLIVEIRA et al., 1997).

A análise do cariótipo do *T. cruzi* pode ser feita através da PFGE (eletroforese em campo pulsado) permitindo, a separação dos seus cromossomos (MACEDO & PENA, 1998).

DVORAK (1984), analisando a heterogeneidade natural de cinco clones (CA-1/72, CA-1/73, Miranda/78, Miranda/80, Sylvio-X 10/5) do *T. cruzi*, por meio de análise por citometria de fluxo do DNA marcado com fluorocromo, mostrou que, amostras de epimastigotas e tripomastigotas, apresentaram diferenças na fase G1, entre os clones Sylvio-X10/5 e CAN-III/1, sugerindo diferença no DNA total entre esses dois clones. Observou-se, também, que existe uma relação direta entre o crescimento exponencial dos clones e a percentagem de DNA nas fases S e G2. O autor também observou que existem diferenças no DNA total de 33 clones analisados.

Quanto à síntese de DNA na fase S, o clone SylvioX 10/7 sintetiza mais DNA (45,2%) em menos tempo, enquanto que o clone CAN-III/2 sintetiza menos DNA (19,8%) com o dobro do tempo. A quantidade de DNA do núcleo e do cinetoplasto de tripomastigotas, dos clones CA-I/71, CA-I/72, Miranda/75, Miranda/88, variou, sendo que a maior contribuição para diferenciar o DNA/organismo foi do núcleo.

A análise do esquizodema, revelada pela digestão dos fragmentos do kDNA do cinetoplasto por endonucleases de restrição (MOREL et al., 1980; MOREL & SIMPSON, 1980; GONÇALVES & MOREL., 1984) mostrou que os minicírculos e maxicírculos são marcadores importantes para diferenciar as cepas e os tipos biológicos.

O uso de sondas, para a análise dos minicírculos e maxicírculos do kDNA de isolados do *Trypanosoma cruzi*, indicou que os minicírculos distribuem-se de modo homogêneo e heterogêneo, de acordo com a especificidade da sonda, enquanto que os maxicírculos revelaram polimorfismos em diferentes cepas (SANCHEZ et al., 1984).

ANDRADE (1985), após submeter as cepas dos Tipos I, II, III à análise do esquizodema, concluiu que todas as cepas diferem no perfil do kDNA dos minicírculos; entretanto, cepas do mesmo tipo biológico aparecem exibindo fragmentos similares dos maxicírculos.

MACINA et al. (1985), ao analisarem polimorfismo em quatro classes de minicírculos do kDNA, dos clones CA1 e Miranda, mostraram que duas dessas classes foram localizadas juntamente nos clones CA1 e Miranda, e as duas classes restantes foram localizadas somente no clone Miranda. Essas observações indicaram que moléculas similares podem envolver sequências diferentes em cada parasito.

Estudo das regiões altamente variáveis dos minicírculos (HVRm) do kDNA amplificadas pela técnica de PCR, realizado por ÁVILA et al. (1990), permitiu o agrupamento de cepas isoladas de pacientes humanos, animais e vetores, em dois esquizodemas.

A hibridização com sondas não radioativas, de fragmentos do kDNA de cepas oriundas da América do Sul, permitiu classificá-las em três grupos com padrões similares, confirmando a estrutura de populações clonais (SOLARI et al., 1992).

O estudo dos RFLPs associados ao gene do RNA ribossomal, digeridos pela enzima de restrição Hinf I, de cepas da América do Sul e México, demonstrou a ocorrência de heterogeneidade ao nível dos minicírculos e maxicírculos (ZAVALA-CASTRO et al., 1992).

A determinação do cariótipo molecular do clone CL Brener do *T. cruzi*, através do PFGE, indicou a existência de doze bandas cromossomais (CANO et al., 1995).

FERNANDES et al. (1998), estudando cepas brasileiras isoladas de pacientes humanos e de triatomíneos, propuseram a classificação desses isolados em duas linhagens, usando seqüências do miniexon e RNA ribossomal. NUNES et al. (1997) classificaram cepas oriundas de diversas procedências, isoladas de pacientes humanos e de triatomíneos, em dois grupos baseando-se na estrutura e função do RNA "spliced leader" e do gene promotor do RNA ribossomal.

1.7. Caracteres da cepa Colombiana do *T. cruzi*

A cepa Colombiana foi isolada pelo Dr. Santiago Renjifo & E. Osorno, em 1964, de um caso humano de doença de Chagas na Colômbia, e cedida a Federici et al. (1964), que estudaram a patogenicidade em camundongos C3H. Posteriormente, ANDRADE & ANDRADE (1966) realizaram um estudo comparativo das lesões histopatológicas com a cepa Y. O biotipo Tipo III dessa cepa, do qual é protótipo, foi estabelecido por ANDRADE (1974).

ANDRADE & ANDRADE (1966), ao estudarem a histopatologia em camundongos albinos Swiss não isogênicos, infectados com a cepa Colombiana

do *T. cruzi*, mostraram que a cepa produz parasitismo mais intenso no músculo esquelético e acentuado no coração, o que explicaria a maior sobrevivência dos animais, os quais desenvolvem miocardite crônica, levando-os à morte tardiamente.

KUMAR et al. (1969) mostraram que a infecção com essa cepa, em camundongos C3H, produzia miocardite, com síndromes de insuficiência cardíaca predominantemente direita e aumento global do coração. Afirmaram, ainda, os autores, que foi encontrada trombose mural no átrio direito.

ANDRADE et al. (1972), visando investigar a estabilidade dos caracteres próprios da cepa Colombiana do *T. cruzi*, infectaram camundongos com essa cepa, após bloqueio com injeções de tinta da China, e observaram uma maior proliferação parasitária no início da infecção, correspondendo ao aparecimento de formas delgadas em maior número e discreto reticulotropismo, conservando-se estáveis os caracteres básicos, como miotropismo e predominância de formas largas. A cepa Colombiana, bem como outras cepas do Tipo III, são altamente resistentes aos quimioterápicos Nifurtimox e Benzonidazol, o que representa mais uma característica marcante desse tipo de cepa. Isso poderá estar relacionado com o seu padrão genético, sendo, pois, de interesse, investigar a resposta dos seus clones, isolados, no sentido de verificar a ocorrência de clones mais ou menos resistentes.

Os biotemas representam verdadeiras subespécies, que além dos caracteres citados, variam quanto à resposta aos quimioterápicos (ANDRADE et al., 1985; ANDRADE et al., 1992).

Tendo em vista a estabilidade dos seus caracteres, é importante que a cepa Colombiana seja analisada quanto à sua composição clonal, no sentido de verificar se essa estabilidade se deve a uma homogeneidade dos seus clones, a exemplo do que foi recentemente demonstrado com a cepa 21 SF (São Felipe-BA) (CAMPOS & ANDRADE, 1996), que representa o protótipo do Tipo II, o qual é predominante na área endêmica do Recôncavo Baiano. Outro aspecto de interesse em relação à cepa Colombiana está correlacionado à resposta aos quimioterápicos a qual deverá ser investigada nos clones dela originados, no sentido de se verificar a ocorrência de clones mais ou menos resistentes.

1.8 Quimioterapia experimental

A cura da doença de Chagas tem encontrado alguns obstáculos, principalmente em função das diferentes cepas distribuídas em diversas regiões geográficas, da complexidade dos seus ciclos silvestre e doméstico, envolvendo o homem-parasito-hospedeiro e, ainda, nas diferentes respostas aos quimioterápicos, em pacientes humanos e em animais experimentais.

1.8.1. Mecanismos de ação dos quimioterápicos

BOCK et al. (1969), após realizarem vários estudos "in vivo" e "in vitro," comprovaram que o Nifurtimox atua, tanto nas formas amastigotas quanto nas formas tripomastigotas, provocando alterações no parasito. A droga têm um efeito muito mais eficaz quando o tratamento é iniciado na fase aguda da infecção.

YONEDA et al. (1976), estudando o modo de ação do Benzonidazol sobre o *T. cruzi*, em cultura de células Hela, observaram que a droga possui efeito deletério nas formas intracelulares, incluindo picnose nuclear, fragmentação e lise dos parasitos.

A destruição dos parasitos pelo Nifurtimox se dá pela redução do radical ânion nitro e sua posterior oxidação, produzindo radicais livres, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, ambos com efeito tóxico contra os parasitos. O efeito tóxico do Benzonidazol pode ser devido à produção de metabólitos nitro redutores que se ligam a macromoléculas, como proteínas e RNA (MAYA et al., 1997).

Os tripanosomatídeos são deficientes na defesa contra radicais livres. Não possuem a enzima catalase glutathione peroxidase (MORENO et al., 1982), que cataliza a reação de hidroperóxidos com glutatião reduzido, para formar glutathione oxidado e produtos reduzidos de hidroperóxidos (MARR & DOCAMPO, 1986).

O Benzonidazol é capaz de inibir o crescimento do *T. cruzi* em concentrações insuficientes para estimular a formação de superóxido e peróxido de hidrogênio (MORENO et al., 1982). Portanto, o efeito dessa droga não depende do efeito de radicais oxigênio, sendo que esses mecanismos são bem diferentes.

POLAK & RICKLE (1978), estudando o mecanismo de ação anti- *T. cruzi*, do Benzonidazol, empregaram os compostos químicos leucina, uridina, adenina e timidina, marcados radioativamente com H^3 e C^{14} . Através da medida de incorporação desses precursores marcados, demonstraram que o Benzonidazol inibe a síntese de proteínas e do RNA em cultura de *T. cruzi*, em meio líquido, e

YONEDA et al. (1976), estudando o modo de ação do Benzonidazol sobre o *T. cruzi*, em cultura de células Hela, observaram que a droga possui efeito deletério nas formas intracelulares, incluindo picnose nuclear, fragmentação e lise dos parasitos.

A destruição dos parasitos pelo Nifurtimox se dá pela redução do radical ânion nitro e sua posterior oxidação, produzindo radicais livres, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, ambos com efeito tóxico contra os parasitos. O efeito tóxico do Benzonidazol pode ser devido à produção de metabólitos nitro redutores que se ligam a macromoléculas, como proteínas e RNA (MAYA et al., 1997).

Os tripanosomatídeos são deficientes na defesa contra radicais livres. Não possuem a enzima catalase glutathione peroxidase (MORENO et al., 1982), que cataliza a reação de hidroperóxidos com glutatião reduzido, para formar glutathione oxidado e produtos reduzidos de hidroperóxidos (MARR & DOCAMPO, 1986).

O Benzonidazol é capaz de inibir o crescimento do *T. cruzi* em concentrações insuficientes para estimular a formação de superóxido e peróxido de hidrogênio (MORENO et al., 1982). Portanto, o efeito dessa droga não depende do efeito de radicais oxigênio, sendo que esses mecanismos são bem diferentes.

POLAK & RICKLE (1978), estudando o mecanismo de ação anti- *T. cruzi*, do Benzonidazol, empregaram os compostos químicos leucina, uridina, adenina e timidina, marcados radioativamente com H^3 e C^{14} . Através da medida de incorporação desses precursores marcados, demonstraram que o Benzonidazol inibe a síntese de proteínas e do RNA em cultura de *T. cruzi*, em meio líquido, e

que a ocorrência e intensidade dessa inibição variam em proporção direta com a concentração da droga.

A síntese de DNA mostrou-se pouco afetada (POLAK & RICKLE, 1978); metabólitos reativos do Benzonidazol ligam-se covalentemente ao DNA, proteínas e lipídios, inibindo o crescimento do *T. cruzi* e a síntese de macromoléculas ou aumentando a degradação de macromoléculas (DIAZ DE TORANZO et al., 1988). Esses autores levantaram a possibilidade de uma associação entre esses achados e a ação tripanocida da droga.

GOIJMAN et al. (1985), ao tratarem epimastigotas da cepa Tulahuén em cultura com Benzonidazol e Nifurtimox, observaram quebra na fita de DNA nuclear por meio de centrifugação em gradiente de sacarose e do estudo do kDNA desnaturado em nitrocelulose, por meio da eletroforese em gel de agarose alcalino. Porém, as fitas de DNA foram reparadas com a remoção da droga, após a transferência para meio de cultura novo por 24 horas.

GOIJMAN & STOPPANI (1985) observaram que, após o tratamento das formas epimastigotas da cepa Tulahuén do *T. cruzi*, com Nifurtimox e Benzonidazol, ocorre a inibição da síntese de proteínas, a estimulação da degradação de macromoléculas e a síntese de DNA não programado. Com relação ao Nifurtimox a degradação do DNA e proteínas é menor do que a de RNA, enquanto que o Benzonidazol teve praticamente o mesmo efeito no DNA, RNA e proteínas.

Como visto, o efeito de ambas as drogas sobre o *T. cruzi* pode envolver vários mecanismos de ação, com inibição de reações de biossíntese, como

também quebra e degradação de macromoléculas por radicais gerados pela droga (GOIJMAN et al., 1985).

Apesar dos vários mecanismos propostos pelos autores citados, outros mecanismos comuns de resistência dos parasitos ao Benzonidazol e ao Nifurtimox foram também sugeridos por MAYA et al. (1997). Esses autores, trabalhando com concentrações de agentes químicos anti-radicais livres, isto é, concentrações de tióis livres, sugeriram que estes agentes anti-radicais livres podem variar de uma cepa para outra. Essas concentrações, podem também variar entre epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de uma mesma cepa.

Essas diferenças na concentração de tióis livres podem explicar as diferenças observadas na susceptibilidade para ambas as drogas e entre as cepas do *T. cruzi*. Quando cepas do *T. cruzi*, em cultura, foram tratadas pelo Benzonidazol e Nifurtimox e, também, pela sulfomixina butionina, ocorreu um decréscimo de tióis livres (glutathione) com redução do grupo nitro, produzindo metabólitos altamente eletrofílicos, semelhantes ao derivado nitroso. Esse decréscimo de tióis livres pode conseqüentemente ser causado pela sua conjugação com metabólitos redutores das drogas.

1.8.2. Relação entre os tipos de cepas e a resposta aos quimioterápicos

AMREIN (1965), objetivando estudar a singamia entre duas cepas do *T. cruzi* resistentes às drogas primaquina e nitrofurazona, misturou essas duas cepas alimentando barbeiros triatomíneos não infectados. Após reisolamento e cultivo das cepas em meio de cultura acelular, o autor demonstrou resistência "in vitro"

para ambas as drogas, não evidenciando a transferência da resistência a essas drogas de uma cepa para outra.

Estudos sobre quimioterapia em animais experimentais infectados pelo *T. cruzi*, realizados por BRENER (1961), analisando a susceptibilidade das cepas (Y, FL, CL,MR,ABC, e PNM) do *T. cruzi*, a várias drogas, mostraram que todos os medicamentos revelaram atividade supressiva. No entanto, as cepas ABC e PNM mostraram-se menos susceptíveis que as demais quando foram tratadas com o sulfeto de carbidium.

ANDRADE et al. (1975), investigando a resposta terapêutica da cepa Colombiana em animais experimentais e tratados com Nifurtimox, mostraram que, apesar desse tratamento provocar negativação parasitêmica, algum tempo depois a parasitemia volta a positivar, sugerindo uma possível seleção de clones resistentes ao quimioterápico. ANDRADE et al. (1977), em função do resultado nulo de cura parasitológica, trataram os animais experimentais infectados na 1ª e 4ª passagens após terem sido isolados de camundongos tratados por tempo prolongado. Ao compararem com o grupo controle infectado, isolado de animais não tratados, observaram um nítido aumento de resistência inicial à droga. Esse resultado foi traduzido pela demora na queda dos níveis parasitêmicos, pela ausência de negativação da parasitemia, tanto na 1ª e 4ª passagens, e pela persistência das lesões teciduais.

ANDRADE et al. (1985), avaliando a quimioterapia com Benzonidazol e Nifurtimox, em camundongos infectados com três cepas do Tipo I, 14 do Tipo II e 12 do Tipo III, e submetendo-as aos testes de cura, mostraram que as cepas do

Tipo I apresentam susceptibilidade alta, as do Tipo II susceptibilidade média a alta e as do Tipo III resistência alta.

FILARDI & BRENER (1987), após investigarem a resposta ao Nifurtimox e Benzonidazol, de camundongos infectados com quarenta e sete cepas do *T. cruzi*, isoladas de pacientes humanos, de vetores domésticos e de reservatórios silvestres, mostraram um grande espectro de susceptibilidade e resistência às drogas, os quais variaram de 0% a 100%.

NEAL & BUEREN (1988), estudando a susceptibilidade de cepas, classificaram-nas em dois grupos: susceptíveis e não susceptíveis, incluindo a cepa Colombiana nesse último grupo.

MARRETO & ANDRADE (1994), visando verificar se formas parasitárias isoladas de animais tratados e não curados, representariam clones resistentes, que difeririam dos susceptíveis, infectaram três grupos de camundongos, cada qual com uma das três cepas (Tipo I, II, III). Foram subdivididos em três subgrupos: 1 tratados com Nifurtimox, outro com Benzonidazol e o terceiro representando controles infectados não tratados. Os parasitos isolados dos animais sobreviventes (tratados e não tratados) foram submetidos à análise eletroforética das isoenzimas, e os resultados não indicaram diferenças bioquímicas entre as cepas do parasito, isoladas de animais tratados, não curados e não tratados, sugerindo que não há uma seleção clonal detectável ou alterações nos marcadores genéticos do parasito, a nível fenotípico.

Um estudo comparativo da resposta quimioterápica, entre pacientes chagásicos e animais experimentais, mostrou que cinco dos seis pacientes

infectados com cepas do Tipo II curaram-se, coincidindo com os resultados obtidos em animais experimentais, que alcançaram taxa elevada de cura. Por outro lado, três dos cinco pacientes infectados com cepas do Tipo III (60%) não responderam ao tratamento, o que coincidiu com os resultados obtidos para os camundongos infectados com a mesmas cepas. Esses animais tratados e curados apresentaram os níveis de IgG acima de 1:10 (ANDRADE et al. 1992).

MURTA & ROMANHA (1998), ao investigarem populações da cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos infectados e tratados com uma única alta dose de

Benzonidazol, verificaram que houve uma seleção de clones resistentes ao medicamento, após vinte e cinco passagens. Os parasitos resistentes produziram, inicialmente, parasitemia e mortalidade baixas, quando comparados com os camundongos infectados com a cepa Y, que produziram índices parasitêmicos e mortalidade elevados.

A avaliação dos resultados da quimioterapia experimental da doença de Chagas baseia-se no exame a fresco do sangue, na subinoculação de sangue em camundongo recém-nascido, na hemocultura, nos testes sorológicos por imunofluorescência indireta (IIF) e no xenodiagnóstico (FILARDI & BRENER, 1982; ANDRADE et al. 1985; ANDRADE et al., 1989; ANDRADE et al., 1992).

A validade dos resultados, tanto para os testes parasitológicos como para os sorológicos, somente pode ser confirmada quando realizados de modo conjunto, embora alguns autores utilizem apenas a hemocultura (MURTA & ROMANHA, 1997).

Atualmente, alguns autores utilizam, como método diagnóstico da doença de Chagas, a amplificação do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA), pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de amostras de sangue de pacientes chagásicos (WINCKER et al., 1994; ÁVILA et al., 1991; DORN et al., 1997) e em hospedeiros do *T. cruzi* (BRENIERE et al., 1992).

Embora a cepa Colombiana se mostre muito resistente e os animais infectados tenham índices baixos de cura, há uma resposta direta ao tratamento, tanto com o Nifurtimox como o Benzonidazol, que se traduz por queda do número de parasitos circulantes, logo após a 1ª dose do quimioterápico, com negatificação parasitêmica ao exame direto. Isso levou à sugestão da existência de clones mais ou menos susceptíveis. Apesar desse espectro de resistência da cepa, animais infectados e tratados com a droga MK-436 apresentaram alta taxa de cura (ANDRADE et al., 1987). Será de interesse verificar se a cepa Colombiana é composta de uma população clonal homogênea ou heterogênea quanto ao comportamento biológico, zimodêmico e à resposta à quimioterapia. No caso de ocorrência, tanto de homogeneidade como de heterogeneidade, é de interesse verificar a susceptibilidade desses clones, com o objetivo de dissociar os susceptíveis dos resistentes. Quando se faz o tratamento, os clones susceptíveis são eliminados, tendo como conseqüências a diminuição da carga parasitária, a regressão parcial das lesões e a diminuição do risco de desenvolvimento de formas graves. Há, entretanto, a possibilidade da persistência de clones resistentes e é de grande interesse verificar se os mesmos poderão responder a novos medicamentos que venham a ser sintetizados, à semelhança do MK-436,

que poderia levar à cura em um segundo tratamento. A persistência dos clones resistentes permite a manutenção dos estímulos antigênicos à resposta celular e humoral, o que determina a continuação dos processos patogênicos da doença. Desse modo, resolvemos estudar a estrutura clonal da cepa Colombiana do *T. cruzi*, o que possibilitará definir a predominância, ou não, de um clone dominante, como ocorre na cepa 21 SF (CAMPOS & ANDRADE, 1996).

2. OBJETIVO GERAL

Investigar comparativamente o comportamento biológico, bioquímico, isoenzimático e a resposta terapêutica da cepa Colombiana do *T. cruzi* e dos clones isolados, procurando verificar se essa cepa é composta de uma população homogênea ou heterogênea.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Isolar e investigar os caracteres biológicos de clones isolados da cepa Colombiana do *T. cruzi*, padrão Tipo III, comparando-os com a cepa parental;
- 2) Determinar o perfil isoenzimático dos clones obtidos, utilizando as enzimas PGM, GPI, ALAT e ASAT, comparando os resultados com a cepa parental;
- 3) Investigar a susceptibilidade ao Benzonidazol dos clones isolados, verificando se a resposta aos quimioterápicos é uniforme, ou se é possível identificar clones resistentes ou susceptíveis, compondo as subpopulações da cepa parental;
- 4) Submeter os animais experimentais infectados, tratados, com negatificação parasitêmica, ao exame direto, aos testes de cura, incluindo a PCR, como um novo teste de diagnóstico;
- 5) Estabelecer se há homogeneidade ou heterogeneidade clonal da cepa Colombiana do *T. cruzi* (Tipo III), Zimodema 1 (Z1).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepa do *T. cruzi*

A cepa Colombiana do *T. cruzi* vem sendo mantida em camundongos albinos Swiss, não isogênicos, no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-CPqGM/FIOCRUZ, submetida a passagens sucessivas nesses animais, e criopreservada em nitrogênio líquido, no laboratório de doença de Chagas Experimental.

4.2. Clonagem da cepa Colombiana do *T. cruzi*

Para a seleção dos clones, camundongos infectados com a cepa Colombiana foram sacrificados por meio da secção dos plexos axilares, coletando-se o sangue, que foi centrifugado a 100 g, em centrífuga marca Beckman GS-CR, a 20°C, durante 20 minutos. Com o sobrenadante obtido, foram realizadas diluições sucessivas em PBS, seguidas da análise, em retículo da câmara de Neubauer, em 16 campos microscópicos (400X), até se obter um baixo número de formas tripomastigotas. Em seguida, 1 µl do sobrenadante foi transferido para a placa de poços múltiplos, adicionando igual volume de PBS. Os poços foram analisados sob microscópio óptico de inversão com aumento 400x, e aqueles que

apresentaram apenas uma forma tripomastigota foram imediatamente coletados e inoculados, individualmente, nos animais, em várias etapas.

Foram inoculados com apenas uma forma tripomastigota, quarenta e dois camundongos recém-nascidos (com 8 a 10 dias de vida) e acompanhados durante 30 dias, quanto à parasitemia e, desses, apenas sete positivaram, sendo designados de clones CI-Col-C1, CI-Col-C2, CI-Col-C3, CI-Col-C4, CI-Col-C5, CI-Col-C6, CI-Col-C7.

Em seguida, os camundongos infectados com cada clone foram sacrificados e o sangue coletado em citrato de sódio por punção nos plexos axilares. O sangue obtido foi utilizado como inóculo de animais doadores jovens com 10 a 12g e, a partir desses grupos foram feitas três passagens sucessivas para a expansão parasitária, obtendo-se, desta forma, os inóculos para a infecção dos grupos de estudos definitivos.

4.3. Obtenção do inóculo de formas tripomatigotas

A contagem do número de formas tripomastigotas, destinadas à formação dos grupos de estudo (comportamento biológico) e grupos de quimioterapia, foi realizada utilizando o método de PIZZI & PRAGUER (1952), que consiste na análise de 5 µl de sangue e espalhamento entre lâmina e lamínula 22 mm x 22 mm, fazendo-se a contagem das formas tripomastigotas em 100 campos microscópicos, multiplicando-se o número obtido pelo fator de conversão 37 do microscópio óptico, previamente estabelecido através da medida do diâmetro do

campo microscópico 400x e da área de cada campo com o uso de uma lâmina micrométrica, e multiplicando-se, também, por uma constante 20.

Os inóculos obtidos da cepa parental e dos clones estudados variaram de 5×10^5 a 1×10^5 .

4.4. Grupos experimentais para caracterização morfológica, histopatológica e isoenzimática dos clones

Cento e noventa e três camundongos albinos Swiss não isogênicos, machos e fêmeas jovens de (10g a 12g), mantidos em gaiolas, foram inoculados com o *T. cruzi*, formando os seguintes grupos experimentais: 25 animais foram infectados com cada um dos sete clones. Em um grupo experimental (Cl-Col-C1) foram infectados 18 animais. Os animais que serviram de controles foram infectados com a cepa parental que deu origem aos clones. Os animais foram alimentados com dieta padrão comercial e água "ad libitum", durante todo o experimento.

4.5. Parasitemia

O cálculo do número de formas tripomastigotas sangüícolas foi realizado em sangue coletado da cauda dos camundongos que formavam os grupos de estudos experimentais (comportamento biológico e quimioterapia) sendo determinado em uma amostra de, no mínimo, cinco animais, por exame direto entre lâmina e lamínula, ao microscópio ótico. A contagem foi realizada em dias alternados, até 30 dias (três vezes por semana), e até 50 dias de acordo com a

sobrevida dos camundongos, sendo os resultados representados pelas médias das contagens realizadas. Quando da impossibilidade de se obter uma média de cinco animais, devido à mortalidade, obtinha-se uma média de dois a três animais, a partir do 25º de infecção. A parasitemia precoce foi estabelecida no 9º dia de infecção, a intermediária no 19º dia, e a tardia no 29º dia. Utilizou-se a média logarítmica para expressar a parasitemia (SOGAYAR et al., 1993), sendo que os gráficos foram obtidos no programa *Graph pad Prism*.

Para os grupos de quimioterapia foram registradas as médias originais da parasitemia tardia dos camundongos infectados e tratados com Benzonidazol e os não tratados. Os gráficos foram expressos no programa *Excel*. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis H. no programa *Epi info 6*.

4.6. Mortalidade

A mortalidade tardia, classificada como a presença de morte dos animais entre o 29º dia e até o 50º dia, foi determinada calculando-se a percentagem em relação ao número de animais sobreviventes, excluindo-se os animais sacrificados para o estudo histopatológico.

Para o grupo de tratamento quimioterápico registrou-se a mortalidade tardia até o final do tratamento e início dos testes de cura, após 90 dias. Os dados de mortalidade foram analisados pelo teste Exato de Fischer do programa *Epi info 6*.

4.7. Estudo morfológico

Para o estudo da morfologia das formas tripomastigotas sangüícolas foram realizados esfregaços do sangue periférico no 10º e 14º dias de infecção, fazendo-se a contagem de, no mínimo, 50 formas tripomastigotas nos esfregaços obtidos de sangue de 15 animais infectados, obtendo-se de cada um deles um esfregaço, totalizando 15 lâminas para cada dia da infecção. Os esfregaços foram corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa e analisados sob microscopia óptica em lente de imersão (100 x). Deste modo procurou-se determinar a percentagem das formas largas e delgadas presentes no sangue periférico.

4.8. Estudo histopatológico

Para o estudo histopatológico evolutivo nos diversos grupos experimentais, foram sacrificados entre três a cinco animais por ponto, no 14º, 20º, 25º e 30º dia da infecção. Os animais foram sacrificados, após anestesia pelo éter, e seccionados nos plexos axilares, retirando-se fragmentos do músculo esquelético da coxa da pata e do músculo cardíaco, fixados em formol a 10 %, e incluídos em parafina. Secções de 5 μ foram coradas pela hematoxilina-eosina.

4.9. Isoenzimas

4.9.1. Obtenção de cultura do *T cruzi* (cepa parental e os seus clones)

As formas tripomastigotas sangüícolas foram obtidas após o sacrifício de camundongos infectados com a cepa parental e os seus clones, através de punção cardíaca, sendo semeadas em meio de cultura axênico para obtenção de formas de cultura utilizada no estudo enzimático.

O cultivo dos parasitos para obtenção dos extratos enzimáticos foi levado a efeito em cinco tubos esterilizados contendo 3 ml de meio de cultura WARREN (1960), composto de solução do meio Brain Heart Infusion (Difco) a 37%, em água destilada, e a 10% de sangue de carneiro desfibrinado, pH 7,0, a 28°C. Os tubos foram mantidos a 37°C e submetidos a repiques sucessivos para a expansão parasitária.

Os parasitos cultivados foram lavados quatro vezes por centrifugação em tampão Tris-KRT pH 7,3 (NaCl 120 mM; KCl 4 mM; CaCl₂ 2 mM; MgSO₄ 7H₂O 1,2 mM; Tris 25,0 mM), a 2000 g, em centrífuga marca Beckman GS-CR, durante 15 minutos a 4°C. O sedimento obtido foi congelado em nitrogênio líquido até o momento da lise dos parasitos.

4.9.2. Extrato enzimático

Após o descongelamento à temperatura ambiente, os parasitos foram submetidos à lise osmótica em estabilizador enzimático (Ditiotreitol 2,0 mM; ϵ -amino capróico 2,0 mM; EDTA. Na₂ 2,0 mM), pH 7,0 a 4°C, numa relação de volumes 1:1(sedimento celular, estabilizador enzimático), e centrifugados em centrífuga marca Eppendorf a 10.000 g, por 60 min a 4°C. Após a centrifugação, coletou-se então o sobrenadante das amostras, gotejando 20 μ l em nitrogênio líquido, para que fosse armazenado e congelado na forma de "pérolas".

4.9.3. Enzimas

As seguintes enzimas foram analisadas :

1 - Fosfoglucomutase	(PGM E.C. 2.7.5.1)
2 - Glucose fosfato isomerase	(GPI E.C. 5.3.1.9)
3 - Aspartato aminotransferase	(ASAT E.C. 2.6.1.1)
4 - Alanina aminotransferase	(ALAT E.C. 2.6.1.2)

4.9.4. Eletroforese em gel de amido

As enzimas foram separadas por eletroforese horizontal, em camada fina de gel de amido refrigerado. O tampão do eletrodo, específico para cada enzima (anexo IX), foi preparado diluindo-se 300 ml da solução estoque em 1000 ml de água destilada. Seguindo-se então o preparo do tampão do gel, diluiu-se um

volume de 3 a 4 ml do tampão do eletrodo (específico para cada enzima), em 40 ml de água

destilada (Anexo IX). O tampão do eletrodo, após o preparo, foi imediatamente colocado na placa de eletroforese já anteriormente resfriada. O gel de amido de batata (*Starch-gel hydrolized Sigma*) foi preparado com 4,0 g de amido-gel em 40 ml do tampão específico, para cada enzima analisada, em uma concentração final de 9%. A suspensão de amido foi fervida a 100°C e homogeneizada até completa dissolução, sendo removido o ar, espalhada com auxílio do espalhador em forma de vidro com bordas de acrílico (22,0 x 13,5 x 0,1 cm), deixadas durante 10 minutos para a solidificação do gel, e depois refrigeradas a 4°C. Posteriormente, utilizando-se um instrumento em forma de pente, foram feitos oito a nove fendas de 1,0 cm de comprimento com 0,5 cm de intervalo, obedecendo um espaço de 13 a 14 cm de um dos extremos da placa. Os extratos enzimáticos dos clones, dos controles (cepa Colombiana padrão do laboratório e cepa Colombiana parental) e dos padrões (Z1, Z2b, ZIII) foram retirados do nitrogênio líquido e acondicionados em poços de placa de titulação. Foram aplicados no gel após serem embebidos em linhas hidrófilas de algodão puro com 1,0 cm de comprimento, não mercerizada nº 0402, da marca Âncora, e as placas de gel, contendo as amostras, foram colocadas na cuba eletroforética. A seguir, iniciou-se a corrida eletroforética, obedecendo as condições de voltagem, tempo de corrida e miliamperagem para cada enzima analisada (Anexo IX), que foram constantes durante toda a corrida eletroforética.

Após o término da corrida eletroforética, as bandas foram evidenciadas por revelador específico para cada enzima (Anexo IX). Na revelação da PGM e GPI foram colocadas as substâncias reveladoras em ágar fundido sobre a placa, transferindo imediatamente a placa para a estufa a 37°C até o aparecimento das bandas. Em seguida, fez-se a transferência do gel revelador para o papel tipo "Canson", que foi secado à temperatura ambiente e fotografado.

Para as enzimas ALAT e ASAT as substâncias reveladoras foram preparadas e colocadas sobre o papel de filtro Whatman nº 1, transferindo-se o papel para a área do gel da atividade enzimática, acondicionando-se em câmara escura e revelando-se sob a luz ultravioleta. As bandas enzimáticas foram diagramadas no programa "Power point".

A análise dos perfis eletroforéticos permitiu identificar os zimodemas da cepa parental, dos seus clones, e compará-las aos controles das cepas protótipos dos Tipos I, II, e III e zimodemas correspondentes Z2b, ZII, ZI.

5. Grupos experimentais de quimioterapia

Foram utilizados 232 camundongos albinos Swiss, machos e fêmeas, pesando 10 a 12g, os quais foram inoculados com o *T. cruzi*, nos seguintes grupos experimentais: 30 camundongos infectados com a cepa parental dos quais 20 foram submetidos a tratamento com Benzonidazol e dez permaneceram como controles não tratados. Sete grupos de 30 camundongos infectados com cada um dos clones, sendo que 20 foram tratados com Benzonidazol e dez permaneceram

como controles não tratados. Os animais foram alimentados com dieta padrão comercial e água "ad libitum".

5.1. Tratamento quimioterápico

Os camundongos foram submetidos a tratamento com o Benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida), comercialmente conhecido como Rochagan, em comprimidos diluídos em suspensão de goma arábica. O Benzonidazol foi administrado em doses diárias de 100 mg/Kg/dia, via oral, por entubação esofágica, durante 90 dias a partir do 20º dia de infecção.

6. Testes de cura

6.1. Testes parasitológicos

6.1.1. Exame direto da parasitemia

A pesquisa da presença de parasitos, nos camundongos tratados, foi realizada pelo exame microscópico direto no sangue periférico entre lâmina e lamínula, durante 30 dias após o término do tratamento. Para cada camundongo, que persistiu negativo ao exame direto da parasitemia, coletou-se 0,5 ml de sangue não heparinizado, do plexo ocular, para a análise sorológica.

Em seguida, cada animal foi sacrificado, coletando-se 1,5 ml de sangue, por meio de punção cardíaca, distribuindo 0,5 ml em tubos apropriados para serem submetidos aos seguintes procedimentos: subinoculação em camundongos recém-nascidos, hemocultura e análise por PCR. As amostras de sangue

coletadas para a PCR foram imediatamente preservadas em solução de Guanidina-EDTA (1:1 Guanidina 6M / EDTA 0,2 M pH 8,0).

6.1.2. Subinoculação

As ninhadas de camundongos recém-nascidos, com 8 a 10 dias de vida, foram infectadas por via intraperitoneal, com 0,1 ml de sangue citratado, proveniente de cada animal submetido ao tratamento. A presença de parasitos foi pesquisada pela análise microscópica direta do sangue periférico entre lâmina e lamínula, durante 30 dias para detectar a presença de parasitos circulantes.

6.1.3. Hemocultura diagnóstica

Para a hemocultura, 0,5 ml de sangue foi colocado em tubos de ensaio esterilizados contendo 5 ml de meio Warren (1960) e mantidas a 37°C.

Para diagnóstico da positividade, foram feitos exames microscópicos das culturas, com intervalos de 10 a 15 dias, durante 45 dias.

6.2 Testes sorológicos

A técnica de imunofluorescência indireta, foi realizada nas amostras de soros obtidos de sangue coletado de camundongos infectados com os clones e cepa parental, tratados com o Benzonidazol. Essa técnica foi baseada em CAMARGO (1966) com modificações.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 100 g, durante 10 min, para a coleta do soro. Em seguida foram preparados 10 diluições do soro em PBS de 1/10 a 1/5020, em placas de 96 poços, colocando na 1ª coluna 90 µl de PBS e nas demais colunas 50µl de PBS pH 7,4. Em seguida colocou-se na 1ª coluna 10 µl do soro, fazendo-se após isso, as diluições de modo seriado 2/2.

As lâminas de 10 poços foram previamente preparadas para testes de imunofluorescência, utilizando-se 10 µl de formas de cultura do *T. cruzi* fixadas em formol a 5%. Sobre as formas de cultura foram colocados 10 µl dos soros testes diluídos de 1/10 a 1/5020 em PBS pH 7,4.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 min, e lavadas três vezes em PBS pH 7,4 durante 5 min. Após a lavagem adicionou-se então, sobre cada círculo, 10 µl do conjugado anti-imunoglobulina IgG total, marcadas com fluoresceína anti-camundongo, incubando-as em câmara úmida durante 30 min. As lâminas foram lavadas três vezes em PBS pH 7,4 durante 5 min cada, e secas, e montadas em tampão carbonato bicarbonato pH 8,5, e analisadas em microscópio Zeiss axioskop acoplado com lâmpada de mercúrio HBO 50.

Estabelecemos como critério de cura parasitológica o título máximo de 1:10.

6.3. (PCR) Reação em Cadeia da Polimerase

6.3.1. Coleta das amostras

Cinquenta e nove amostras de sangue foram coletadas de camundongos infectados e tratados, com a cepa parental e os clones, na fase crônica da infecção. Cinco amostras de sangue da cepa parental foram coletadas de animais infectados não tratados, também na fase crônica da infecção, sendo que todas as amostras foram preservadas em uma proporção 1:1, em Guanidina 6M / EDTA 0,2 M pH 8.0, durante 30 dias a 4°C.

6.3.2. Extração do DNA

O isolamento do kDNA foi realizado como descrito por WINCHER et al. (1994), com modificações. Resumidamente, o DNA foi extraído usando o tampão de lise numa diluição 1:1 em relação com a amostra (Guanidina 6M; EDTA 2M). As amostras foram incubadas por 15 min em água fervente e, em seguida, realizada uma extração com fenol-clorofórmio na proporção 1/1 (vol. / vol.), e centrifugadas a 4 °C em 100 g, durante 20 min, coletando-se a fase aquosa. As amostras foram extraídas uma vez em clorofórmio, e lavadas duas vezes em etanol 80% e 100%. Após esse procedimento, o DNA foi precipitado, utilizando-se acetato de sódio (100 mM) e dois volumes de etanol absoluto, e as amostras

centrifugadas a 100 g durante 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA secado, à temperatura ambiente, por 15 min. O DNA das amostras foi então ressuspendido em 100 µl de água destilada estéril.

6.3.3. Amplificação da região variável dos minicírculos do DNA do cinetoplasto pelo PCR

O DNA proveniente do cinetoplasto foi submetido à reação de amplificação composta por 0,75 U de Taq DNA Polimerase (*Perkin Elmer Cetus Corporation*); 10 mM de tampão pH 8,3; 50 mM KCl; 50 µmol de cada "primer" (Oligonucleotídeo sintético); 5,0 mM de MgCl₂ ; 200 µM da mistura de dNTPs (deoxinucleotídeos Trifosfatos- *Amersham Pharmacia Biotech*); e água ultra pura estéril, suficiente para um volume final de 50 µl. A cada reação foi acrescida 3 µl de DNA, que correspondeu aproximadamente, 0,5 ng. A reação foi realizada em Termociclador de temperatura DNA (*Perkin -Elmer Cetus Corporation*, modelo 2.400) e consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos compostos de 45 segundos a 94°C para a desnaturação do DNA, 30 segundos a 55°C para pareamento dos "primers", 30 segundos a 72°C para a extensão da fita de DNA e uma etapa final de 10 minutos a 72°C.

6.3.4. Oligonucleotídeos sintéticos ("primers")

Oligonucleotídeos sintéticos, utilizados como "primers" (*Life Technology Gibco BRL*), foram os seguintes:

P35: 5' AAA TAA TGT ACG GG (T/G)GAGATG CATGA 3'

P36: 5' GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT 3'

Estas seqüências amplificam um fragmento de 330 pares de bases (pb) da região variável do minicírculo, o qual representa uma região variável mini-repetida do minicírculo da molécula do kDNA (ÁVILA et al., 1990).

6.3.5. Eletroforese

Os fragmentos obtidos foram analisados através da eletroforese em gel de agarose a 2% (Sigma), em 100 ml de tampão TAE 1X (40 mM Tris -acetato e 1 mM de EDTA pH 8,0), e coloração em solução de brometo de etídio (10 mg/ml) (Sigma) e azul de bromofenol (0,25% [vol./vol.] xilenocianol em 40% da solução aquosa de sacarose) com tampão de corrida TAE, durante 1 h a 80 volts. O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no sistema "Eagle Eye II" (*Stratagene*). O tamanho do fragmento amplificado foi de aproximadamente 330 pares de bases e o padrão utilizado como marcador de pares de bases foi o *Ladder* de 100 pares de bases (*Amersham Pharmacia Biotech*). Durante a realização de cada experimento foram incluídos controles positivos provenientes

de cultura de *T.cruzi*, e controles negativos realizados em reação sem DNA, e DNA extraído de sangue de camundongos não infectados para controle de contaminação dos reagentes. Todas as amostras positivas foram testadas pelo menos duas vezes, confirmando-se a ausência dos fragmentos nos controles negativos e a presença nos controles positivos.

6.4. Hibridização

Para a confirmação dos resultados obtidos na reação de amplificação foi realizada a hibridização das amostras, utilizando-se sondas alelo específicas pela técnica do dot-blot.

6.4.1 Transferência do DNA para a membrana

Foram utilizados 20 µl das amostras amplificadas, e desnaturadas previamente em solução contendo NaOH 4 M e de EDTA 0,025 M, e incubada por no mínimo 1 h à temperatura ambiente.

Após a desnaturação as amostras foram aplicadas à membrana de Nylon (Hybond N+ *Amersham Pharmacia Biotech*), utilizando o aparelho para Dot-blot (*Hybri dot manifold Brl Gibco Life Technology*). O DNA foi fixado à membrana de Nylon através de incubação durante 3 hs a 80°C no forno de vácuo

6.4.2 Sondas

Para a hibridização foi utilizada a sonda de oligonucleotídeo sintético, denominada P67 (5' TGGTTTTGGGAGGGG(C/G 0(G/C)(T/G)TCAA(A/C)TTT 3')

presente na região conservada da seqüência mini-repetida do DNA dos minicírculos no *T.cruzi*.

A porção final 5' do oligonucleotídeo (sonda) foi marcada utilizando-se o nucleotídeo radioativo [γ ^{-32}P] ATP e a enzima polinucleotídeo cinase (*Kit Ready-To-Go T4 Polinucleotide cinase- Pharmacia Biothec*)

6.4.3. Pré-hibridização e hibridização

A membrana contendo o DNA fixado foi pré-hibridizada em solução contendo SSPE 5X (NaCl 3 M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5 M; EDTA 0,01 M); Solução Denhardt's 5X (0.5% Ficoll, Polyvinilpyrrolidone, soro bovino albumina) e de SDS a 0,5% (Duodecil sulfato de sódio) durante 1 h a 45°C, em forno de hibridização (*Personal Hyb Stratagene*).

Após esse período, a sonda marcada foi adicionada ao tampão previamente utilizado na pré-hibridização e incubada, por um período de 12 h à temperatura de -5 a -10 °C da temperatura de fusão (T_m), utilizando-se a fórmula: $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$. No caso da sonda em questão, utilizou-se uma temperatura de 59 °C.

6.4.4. Lavagem da membrana e detecção de sinais

Após a hibridização, a membrana foi lavada duas vezes (10 min cada) em solução contendo SSPE 5x e SDS 0,5% à temperatura ambiente.; duas vezes

(10 min cada) em solução contendo SSPE 2X e SDS 0,5% à temperatura ambiente; e uma vez de 10 min à temperatura de $T_m + 5^\circ\text{C}$ em solução contendo SSPE 1X e SDS 0,1%. No experimento em questão utilizou-se 65°C .

A membrana foi recoberta com PVC (*Multiplac-Valfilm*), colocada em suporte cassete de filme Raio X, em contato com filme para radiografia (*KODAK*), por um período que variou de 12 a 72 h. Após esse período, o filme foi revelado em processador automático de raio x (*Amersham Life Science*) e procedeu-se a análise dos sinais.

7. RESULTADOS

7.1. Grupos de estudos experimentais

Foram isolados sete clones da cepa Colombiana do *T. cruzi*, através de micromanipulação. Os clones isolados foram identificados com as seguintes siglas: Cl-Col-C1, Cl-Col-C2, Cl-Col-C3, Cl-Col-C4, Cl-Col-C5, Cl-Col-C6, Cl-Col-C7. Foram submetidos a três passagens sucessivas em camundongos doadores jovens (10 a 12g), e inoculados nos camundongos entre a 3ª e 13ª passagens, para o estudo biológico e isoenzimático. Os grupos controles dos clones foram inoculados na 117ª passagem (Tab.1).

7.2. Caracteres biológicos dos clones

7.2.2. O curso da infecção

O curso da infecção evoluiu até o 35º dia para os clones C3, C6 e até o 50º dia para os clones C2, C5 e C7 (Figs. 3,6,2,5,7). Nos clones C1 e C4 a infecção progrediu até o 27º e o 25º dia, respectivamente.(Figs. 1 , 4).

7.3. Parasitemias

Fazendo-se uma análise comparativa das parasitemias da cepa parental e de seus clones, observou-se uma positividade a partir do 7º dia de infecção, uma

multiplicação lenta com picos irregulares entre o 20º e 29º dias da infecção, tipicamente demonstrando o perfil de cepa de biodema Tipo III (Figs. 1 - 7).

Analisando-se individualmente as parasitemias precoces (9º dia de infecção), intermediária (19º dia) e tardia (29º dia), entre a cepa parental e os seus clones, observou-se que não há diferença significativa nas médias parasitêmicas da fase precoce ($p=0,28$) e tardia ($p=0,11$). Entretanto, na fase intermediária há diferença significativa nas médias parasitêmicas ($p=0,003$). O desvio padrão registrou baixos índices na fase precoce da infecção, com elevação acentuada na fase intermediária e tardia, excetuando-se os clones C1 e C4, nos quais não foi possível registrar a parasitemia devido à grande mortalidade total dos animais nessa última fase (Tab. 1).

7.4. Mortalidade

A mortalidade total dos camundongos até o 30º dia de infecção foi baixa para os clones C2, C5 e C7; alta, na cepa parental e nos clones C1, C3, C4, C6 (Tab. 2).

No clone C2 o baixo índice de mortalidade coincide com baixos picos parasitêmicos na fase tardia, enquanto que o clone C7 apresentou altos índices parasitêmicos. O clone C3 apresentou alta mortalidade e altos índices parasitêmicos na fase tardia da infecção (Tabs.1-2).

A análise estatística demonstrou que há diferença significativa na mortalidade dos animais infectados com a cepa parental, em comparação com os clones C2, C5 e C7 (Tab.2).

Fazendo-se uma análise comparativa das parasitemias da cepa parental e de seus clones, observou-se uma positivação a partir do 7º dia de infecção, uma multiplicação lenta com picos irregulares entre o 20º e 29º dias da infecção, tipicamente demonstrando o perfil de cepa de biodema Tipo III (Figs. 1 - 7).

Analisando-se individualmente as parasitemias precoces (9º dia de infecção), intermediária (19º dia) e tardia (29º dia), entre a cepa parental e os seus clones, observou-se que não há diferença significativa nas médias parasitêmicas da fase precoce ($p=0,28$) e tardia ($p=0,11$). Entretanto, na fase intermediária há diferença significativa nas médias parasitêmicas ($p=0,003$). O desvio padrão registrou baixos índices na fase precoce da infecção, com elevação acentuada na fase intermediária e tardia, excetuando-se os clones C1 e C4, nos quais não foi possível registrar a parasitemia devido à grande mortalidade total dos animais nessa última fase (Tab. 1).

7.4. Mortalidade

A mortalidade total dos camundongos até o 30º dia de infecção foi baixa para os clones C2, C5 e C7; alta, na cepa parental e nos clones C1, C3, C4, C6 (Tab. 2).

No clone C2 o baixo índice de mortalidade coincide com baixos picos parasitêmicos na fase tardia, enquanto que o clone C7 apresentou altos índices parasitêmicos. O clone C3 apresentou alta mortalidade e altos índices parasitêmicos na fase tardia da infecção (Tabs.1-2).

7.5. Morfologia das formas sangüícolas

A análise da morfologia da cepa Colombiana, no 10º dia da infecção, mostrou a predominância de formas delgadas, e no 14º dia da infecção, a predominância de formas largas (Fig. 8).

Nos clones C3, C5 e C7 predominaram, no 14º dia da infecção, as formas largas, enquanto que nos clones C1, C4, C6 predominaram as formas delgadas (Fig. 9).

7.6. Enzimas

As bandas reveladas nos extratos enzimáticos obtidos da cepa parental e dos seus clones, para as enzimas PGM (Figs. 12-13), GPI (Figs. 14-15), corresponderam ao padrão Tipo III, Z1.

Seis clones (C2, C3, C4, C5, C6, C7) revelaram duas bandas na enzima ALAT, correspondentes ao padrão Tipo III, Z1 enquanto que o clone C1 revelou três bandas eletroforéticas (Fig. 16 e 17).

Na enzima ASAT seis clones (C1, C2, C4, C5, C6, C7) revelaram bandas correspondentes ao padrão Tipo III, Z1 (Figs. 18-19), enquanto que o clone C3 revelou duas bandas (Fig.18).

Os controles (cepa Peruana, 21SF e Colombiana parental revelaram as bandas correspondentes aos padrões Tipo I (Z2b) , Tipo II (Z2), Tipo III (Z1) para todas as enzimas analisadas, respectivamente (Figs.12-19).

7.7. Histopatologia

7.7.1 cepa Colombiana Parental (grupo controle)

Aos 14 dias o miocárdio apresentou discreto parasitismo e discreto infiltrado intersticial mononuclear; o músculo esquelético apresentou escassos ninhos parasitários esparsos e infiltrados intersticiais mononucleares isolados. As lesões inflamatórias e o parasitismo foram considerados discretos a moderados nessa fase. A partir do 20º dia de infecção as lesões necróticas inflamatórias de miocárdio e de músculo esquelético se tornaram progressivamente mais intensas e a partir do 30 dia houve grandes áreas de destruição do miocárdio e de músculo esquelético com substituição por densos infiltrados de células mononucleares (Fig. 20, A, B, C, D). As lesões observadas foram características da cepa Colombiana.

7.7.2. Estudo dos clones

O estudo histopatológico realizado nos sete clones isolados mostrou lesões histopatológicas e parasitismo tissular idênticos, com um caráter evolutivo superponível ao da cepa parental, variando apenas no grau de parasitismo e na intensidade das lesões, na fase mais precoce (14 dias).

De um modo geral, o estudo histopatológico demonstrou, aos 14 dias de infecção, discreto a moderado parasitismo nas células cardíacas. Os ninhos parasitários estavam na maioria íntegros e sem reação inflamatória, porém,

também, houve necrose de células parasitadas com infiltração de polimorfonucleares neutrófilos em torno das fibras destruídas, e difuso infiltrado mononuclear intersticial. Os músculos esqueléticos mostravam lesões inflamatórias discretas e moderado parasitismo. Nessa fase (14 dias), as lesões eram variáveis, entre discretas e moderadas, em todos os grupos, isto é, com a cepa parental e os diversos clones.

A partir do 20º dia de infecção observou-se acentuado parasitismo do miocárdio e do músculo esquelético e intensas lesões necrótico-inflamatórias das miocélulas cardíacas e esqueléticas parasitadas, observando-se densos infiltrados mononucleares e presença de polimorfonucleares neutrófilos, em torno de ninhos parasitários em desintegração. As lesões tornaram-se mais intensas aos 25º e 30º dias (Figs. 21-B, C, D-; 22-B, C, D; 23-D; 24-C, D; 25-B, C, D). Considerando-se, comparativamente, as lesões com 20, 25 e 30 dias, nos grupos experimentais inoculados com a cepa parental e com cada clone, observou-se que em todos os grupos as lesões necrótico-inflamatórias foram muito intensas e, em todos os casos, o parasitismo e as lesões foram predominantes no músculo esquelético. Em geral, os parasitos estavam, nessa fase, em desintegração, e eram raros os ninhos parasitários íntegros, observando-se miocélulas destruídas, com detritos parasitários e intenso infiltrado mononuclear.

O padrão das lesões e o miotropismo foram característicos da cepa Colombiana, variando de discretas a moderadas ao 14º dia, a intensas do 20º ao 30º dia, indicando a alta patogenicidade, tanto da cepa parental como dos seus clones.

7.8. Quimioterapia

O resultado do tratamento dos diversos grupos experimentais de camundongos, infectados com a cepa Colombiana parental e os seus clones, foram analisados levando-se em conta os seguintes parâmetros: evolução da parasitemia, e índices de mortalidade, comparando com os grupos não tratados e com a cepa parental.

Os animais tratados foram avaliados quanto aos índices de cura obtidos para o grupo através dos testes parasitológicos: exame direto da parasitemia, sub-inoculação do sangue em camundongos recém-nascidos e hemocultura.

A resposta sorológica foi também avaliada pelo teste de imunofluorescência indireta. O PCR dos minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA) foi também realizado.

7.8.1 . Parasitemia

Os camundongos infectados com a cepa parental, tratados com Benzonidazol, apresentaram negatificação parasitêmica entre o 2º e o 8º dia da infecção, após o início do tratamento. (Figs.10-11).

Os camundongos infectados com o clone C2 apresentaram negatificação parasitêmica mais precoce, no 2º dia após o início do tratamento (Fig.10) , enquanto que os clones C1, C3, C5 apresentaram negatificação mais tardiamente no 7º dia, após o início do tratamento (Figs.10-11). O clone C5 apresentou queda

nos índices parasitêmicos no 1º dia e, ao contrário dos outros clones, demonstrou um aumento acentuado nos índices parasitêmicos no 3º dia, voltando a registrar uma queda na parasitemia a partir do 4º dia.

Os camundongos infectados com os clones C4 e C7 apresentaram negatificação parasitêmica a partir do 5º dia e, com o clone C6 no 7º dia após o início do tratamento (Fig.11).

Os controles da cepa parental e dos clones não tratados apresentaram multiplicação lenta a partir do 7º dia da infecção, com picos irregulares entre o 17º e o 20º dia da infecção no clone C1; entre o 21º e o 27º dia no clone C3, e entre o 20º e o 30º dia nos clones C2, C5, C6 e C7.

8. Testes de cura

8.1. Teste parasitológicos

Os resultados dos testes parasitológicos realizados nos camundongos infectados com a cepa parental e os clones C1, C2, C4, C6, C7 mostraram índice de cura nulo (Tabs. 4, 5, 6, 8) e baixo índice de cura para o clone C3 (8,3%) e 10% para o clone C5 (Tabs. 7 - 9).

8.2. Testes sorológicos

Os títulos de anticorpos IgG (imnoglobulinas G) mostraram que os camundongos infectados com cepa Colombiana parental e seus clones

apresentaram títulos de anticorpos acima de 1:20 (Tabs. 7-12). O clone C3 não foi submetido a subinoculação e além disso, houve um caso (animal nº 3) com elevada sorologia, podendo indicar que talvez houvesse maior índice de não curados ou menor índice de cura (Tab. 10). O clone C4 também não foi submetido a subinoculação (Tab.11).

O animal nº 9, infectado com o clone C5, teve um título muito alto de anticorpos; possivelmente trata-se de um caso não curado. Esse animal não foi submetido a hemocultura, o que impediu a demonstração dos parasitos.

8.3. PCR

Nas tabelas 4-11 estão expressos os resultados do DNA do cinetoplasto (kDNA), de amostras sanguíneas de camundongos tratados com Benzonidazol.

A figuras 27 A, B e C e 28 A e B mostram os resultados do PCR dos clones C2, C3 e C7 da cepa Colombiana parental e do clone C6, respectivamente. Não houve detecção de bandas nas amostras dos clones C1, C4 e C5 (Figs. 27 A, B, C, e D).

A hibridização das amostras amplificadas utilizando a sonda P67, confirmou os resultados de 36,2% dos casos positivos e dos controles positivos (Fig. 29).

Observou-se que em 45,7% dos casos não houve concordância entre a positivação dos testes parasitológicos e a amplificação do kDNA pela PCR.

Em 10,1% dos casos a PCR mostrou resultado positivo enquanto os testes parasitológicos foram negativos.

Em 22% dos casos houve concordância entre a positividade dos testes parasitológicos e da PCR.

Em 11,8% dos casos houve concordância entre a negatividade dos testes parasitológicos e da PCR (Tab. 12).

9. DISCUSSÃO

A análise do comportamento da cepa Colombiana parental, realizada no presente trabalho, demonstrou que a mesma apresentou uma exacerbação da sua virulência, quando se faz uma comparação com as descrições dessa cepa nos trabalhos iniciais sobre a sua caracterização biológica (ANDRADE et al., 1970; ANDRADE., 1974). Nos trabalhos referidos, a cepa Colombiana foi caracterizada pela evolução lenta da parasitemia, pela predominância de formas largas durante todo o curso da infecção e pela sobrevida prolongada, com índice nulo de mortalidade até os 50 dias. A baixa mortalidade possibilitava a obtenção de uma alta porcentagem de animais cronicamente infectados, sem o uso de drogas supressoras da parasitemia (ANDRADE & ANDRADE, 1968). A cepa Colombiana mantida neste laboratório, há cerca de 20 anos, apresenta, atualmente, alta mortalidade até os 30 dias, porcentagem mais elevada de formas delgadas, chegando a 50% aos 14 dias e níveis parasitêmicos consistentemente elevados. Já foi demonstrado, anteriormente (ANDRADE , 1974), que o aumento do número de formas delgadas corresponde a uma maior multiplicação parasitária e a uma alta virulência. Esse fato foi anteriormente observado com a cepa Colombiana (ANDRADE et al., 1977), quando inoculada em camundongos com baixa resistência, por bloqueio macrofágico com tinta da China e por tratamento com corticóide, ou pela exaltação da virulência por passagens sucessivas em camundongos recém-nascidos. Nesses casos, houve nítido aumento da virulência

da cepa Colombiana que, entretanto, manteve o seu perfil parasitêmico e seu tropismo tissular.

A cepa Colombiana parental estudada na presente investigação , apesar de ter a sua virulência exaltada pelas sucessivas passagens em camundongos, continua a apresentar as mesmas características básicas descritas para as cepas de Tipo III, inclusive o mesmo perfil isoenzimático, correspondente ao zimodema 1 (Z1). Mantém o perfil parasitêmico, com evolução lenta e picos tardios, e o tropismo tissular. Além disso, determina lesões histopatológicas características, com predominância de parasitismo de músculo esquelético e, em menor grau, de músculo cardíaco, observando-se grandes ninhos parasitários e lesões necrótico-inflamatórias extensas, no 30º dia de infecção. A presença de formas delgadas coincidiu com o aparecimento de parasitismo de macrófagos do baço, visto aos 10 dias de infecção. A virulência de uma cepa pode ser alterada quando a mesma é submetida a pressões seletivas, tais como passagens sucessivas em animais experimentais por muito tempo, bem como ausência de passagens em triatomíneos. Assim, faz-se necessário distinguir virulência de patogenicidade. Os estudos de BRAND et al. (1949), estudando quatro amostras de diferentes procedências, mostraram patogenicidade variada entre as amostras. Esses autores consideram patogenicidade a capacidade de invadir tecidos, a proliferação parasitária e a influência sobre o crescimento dos animais. As cepas estudadas pelos autores foram as cepas Brasil, WBH, Guatemala e Panamá. Procuraram verificar se havia diferenças entre as mesmas, quanto aos aspectos metabólicos, pela verificação do consumo de glicose e o crescimento da

população em meios de cultura. "In vivo", estudaram em ratos, a influência sobre o crescimento dos animais, a glicemia e o glicogênio do sangue, o consumo de glicose na corrente sanguínea e o grau de invasão dos tecidos. Os autores concluíram, por diferenças de patogenicidade que a cepa Brasil se mostrou mais patogênica, com maior invasão tissular, com parasitismo de fígado, baço, cérebro, células gliais e intestino, e intensa miocardite, em contraposição às outras cepas citadas, que se mostraram menos patogênicas.

Os nossos achados indicaram que a cepa Colombiana do *T. cruzi* tem mantido a sua patogenicidade, com miotropismo e envolvimento predominante de músculo esquelético, com destruição de fibras cardíacas, intenso infiltrado inflamatório a partir do 20º dia de infecção e presença de grandes ninhos parasitários.

HAUSCHKA (1949), utilizando as cepas Brasil e WBH, procurando verificar a estabilidade de comportamento das mesmas para o animal experimental em um período de dois anos de observação, levando em conta a virulência e a afinidade tissular, e tomando como índice de virulência a fase em que se dava a mortalidade dos animais, pôde concluir que a cepa WBH foi a mais virulenta apresentando mortalidade máxima entre 11 e 16 dias, e a menos virulenta foi a cepa Brasil, em que a mortalidade só foi verificada entre 25 e 30 dias. Os achados histopatológicos indicaram que a cepa Brasil apresentou parasitismo predominante do coração, enquanto a cepa WBH apresentou tropismo para o fígado, baço, rim e pulmão. As curvas parasitêmicas foram diferentes,

atingindo o máximo aos oito dias com a cepa WBH e no 14º dia com a cepa Brasil. Esses achados indicaram que as cepas WBH e Brasil, em momentos diferentes, podem apresentar alteração na sua virulência. Para esse estudo, HAUSCHKA (1949) procurou eliminar ao máximo as variáveis que poderiam influenciar no comportamento das cepas, utilizando animais isogênicos, do mesmo sexo, com dieta padrão, infectados em intervalos regulares com inóculos uniformes. O autor concluiu que as diferenças de virulência, observadas entre os dois grupos, foram estáveis e atribuíveis a um padrão fisiológico específico a cada cepa do parasita, mantendo cada uma o seu máximo de virulência quando mantida em condições ótimas, em passagens sucessivas.

Comparando-se esses resultados com os obtidos por BRAND (1949), com as mesmas cepas, observa-se que não há concordância. Ao contrário de HAUSCHKA (1949), BRAND (1949) verificou maior patogenicidade, maior invasão tissular, altos níveis parasitêmicos e índices de mortalidade mais elevados com a cepa Brasil do que com a WBH, demonstrando, nitidamente, que as duas cepas foram obtidas em fases diferentes de exacerbação de virulência. O estudo comparativo desses dois trabalhos demonstrou que é necessário uniformizar os critérios de se avaliar a virulência ou patogenicidade para caracterizar e distinguir cepas mais ou menos virulentas.

PHILLIPS (1960), observou que a virulência da cepa WBH ficou diminuída, após passagens sucessivas com inóculos cada vez menos ricos, porém havia sido recuperada ajustando o inóculo a um número constante de parasitos; o mesmo acontecendo com a cepa Y, cuja virulência foi exacerbada por inóculos

progressivamente maiores em camundongos jovens. Quando o autor correlacionou o inóculo com patogenicidade verificou que, nas cepas WBH e Y, o curso da infecção e da mortalidade dependem diretamente do aumento no número de parasitos no sangue circulante. Nós procuramos, ao longo dos experimentos, tentar verificar se, de fato, era o inóculo o responsável pela mortalidade dos animais, e inoculamos 100.000 e 25.000 formas tripomastigotas, em dois momentos diferentes. Concluimos que a mortalidade foi de 100% e 53,7 % para aqueles animais que foram inoculados com 100.000 formas, e 25% para os animais que foram inoculados com 25.000 formas, quando comparados com o curso da infecção que foi de 30, 50 e 44 dias. Esses índices diferentes de mortalidade refletem, sem dúvida alguma, diferentes momentos de aumento de virulência da referida cepa.

Entretanto, PHILLIPS (1960), estudando a cepa Sonya, verificou que a patogenicidade não dependia diretamente do inóculo, sendo a infecção sempre de curso prolongado e fatal, isto é, de multiplicação lenta e de alta virulência.

ANDRADE & ANDRADE (1966), comparando a cepa Y com a cepa Colombiana, verificaram que esta última determina uma infecção de curso prolongado, podendo atingir elevados níveis parasitêmicos e determinar lesões tissulares graves, com mortalidade tardia dos animais, sendo portanto muito patogênica e pouco virulenta.

Assim sendo, baseando-se em nossos achados, o conceito de virulência está ligado à maior ou menor capacidade de multiplicação do parasito, que é própria para uma determinada cepa, mas que pode variar dentro de certos limites

de acordo com inúmeras variáveis, podendo assim ser atenuada ou exacerbada. A patogenicidade representaria a capacidade de determinar lesões tissulares que podem levar os animais à morte, em diversas fases da infecção, a depender dos setores atingidos. Assim, a patogenicidade seria uma capacidade constante, enquanto a virulência, embora peculiar a cada cepa, seria flutuante. Essas duas condições, em conjunto, compreenderiam os fatores ligados ao parasita, e têm atualmente determinado o curso da infecção na cepa Colombiana, no animal experimental.

Os aspectos morfológicos das formas sangüícolas (BRENER & CHIARI., 1963) constituem-se em importante elemento de caracterização e, aparentemente, estão relacionados com o grau de virulência das cepas. Foi observado, em estudos anteriores, que as cepas caracteristicamente mais virulentas (Tipo I) têm predominância de formas delgadas, e que a exaltação da virulência de cepas, nas quais formas largas são predominantes, determina o aparecimento de um número significativo de formas delgadas na fase inicial da infecção (ANDRADE et al., 1972).

De acordo com BRUMPT (1912), as largas representariam formas evolutivas mais adultas, derivadas de formas delgadas mais jovens. MEYER & OLIVEIRA (1948) afirmaram que o rompimento precoce das células parasitadas libertaria formas delgadas, ao passo que o prolongamento da permanência dos tripanosomas nas células daria origem a formas largas. As experiências de SILVA (1959) permitiram demonstrar, em células parasitadas, a existência de um processo duplo de evolução dos amastigotas intracelulares: no primeiro,

amastigotas arredondadas evoluíram, por um processo de desenrolamento, para as formas largas, ao passo que, em outras células tripanosomas fusiformes dariam origem, por simples alongamento, às formas delgadas. O mesmo autor demonstrou que a inoculação, em camundongos, de apenas formas largas, dá origem a infecções em que são encontradas formas largas, intermediárias e mesmo delgadas.

Os nossos achados indicam que a cepa Colombiana apresenta uma composição clonal homogênea, variando apenas quanto ao grau de virulência de seus clones, o que poderia influenciar no comportamento da cepa, determinando alta ou baixa virulência. Os sete clones isolados apresentaram um comportamento idêntico ao da cepa, em relação à parasitemia, ao miotropismo, à patogenicidade, embora tenham apresentado virulências diferentes. Em quatro destes clones, os índices de mortalidade foram elevados (100%), idênticos ao da cepa parental (C1, C3, C4, C6), além de apresentarem taxas elevadas de formas delgadas. Em três dos clones (C2, C5, C7), a virulência foi mais baixa, o que se comprovou pelos menores índices de mortalidade, menores índices parasitêmicos e predominância de formas largas. Entretanto, do mesmo modo que a cepa parental, os caracteres gerais da cepa foram mantidos. Em dois dos clones (C1 e C3) o padrão de bandas eletroforéticas das enzimas ALAT e ASAT foi diferente do observado com a cepa parental e os demais clones, o que pode representar mudanças intraespecíficas fenotípicas e genotípicas dessas populações clonais.

Os clones isolados por diversos autores, a partir de diferentes cepas podem se apresentar homogêneos (BONGERTZ & DVORAK, 1983), ou

heterogêneos (POSTAN et al., 1983; GOLDBERG & SILVA PEREIRA, 1983). Em alguns casos, como ocorreu com a cepa CL, podem ocorrer clones de baixa virulência que, quando inoculados em camundongos, não determinam parasitemia patente e não determinam lesões nem mortalidade dos animais (LIMA et al., 1990; LIMA et al., 1995).

MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI (1988), estudando o comportamento biológico de clones isolados das cepas Y, MR e CL, demonstraram curvas parasitêmicas diferentes e curso prolongado da infecção até 40 dias, como no caso do clone YP1, indicando serem essas cepas formadas por um conjunto de subpopulações heterogêneas (cepas Y e CL) e homogêneas (cepa MR). Esses autores, analisando os índices de mortalidade obtidos entre os clones das cepas Y, CL e MR, mostraram que o clone YP1 obteve mortalidade nula quando comparado com a cepa parental Y, cujo índice de mortalidade até 18 dias foi 100%, enquanto que os clones YP2 e YP3 atingiram 45,5 e 100% de mortalidade, respectivamente. Os clones MR1, MR2, MR3, MR4 e a cepa parental atingiram um índice de mortalidade de 100%.

CAMPOS & ANDRADE (1996), entretanto, estudando as curvas parasitêmicas e os índices de mortalidade de cinco clones e 14 sub- clones da cepa 21 SF, mostraram similaridades quanto aos caracteres biológicos e à predominância de clones responsáveis pela manutenção da estabilidade dos caracteres da Cepa 21 SF.

POSTAN et al. (1987), comparando níveis parasitêmicos em ratos infectados pelos clones Sylvio-X 10/7 e Sylvio-X 10/4, mostraram que o primeiro

apresentou parasitemias elevadas, entre 14 e 21 dias, e mortalidade baixa (1,78%) enquanto que o segundo apresentou parasitemias baixas e mortalidade alta (38%) dos ratos.

Por outro lado, POSTAN et al. (1986), estudando a infecção de camundongos, mostraram que o clone Sylvio-X10/7 apresentou o índice de mortalidade de 94,3%, sendo que as fêmeas sobreviveram muito mais do que os machos, enquanto que a mortalidade de camundongos infectados com o clone Sylvio-X 10/4 foi baixa em torno de 5,1%.

Os resultados obtidos com as isoenzimas mostraram que, em todos os clones, a PGM e a GPI apresentaram o mesmo perfil da cepa parental, ou seja, uma única banda (um monômero) representando uma situação de homozigose (TIBAYRENC et al., 1981). Com relação a ALAT e à ASAT, o clone C1 apresentou três bandas para a enzima ALAT, e o clone C3 apresentou duas bandas para a enzima ASAT, indicando que, para essas enzimas, os referidos clones apresentaram um perfil diferente.

Um gel pode mostrar a presença de uma enzima específica, em mais de uma posição de migração. Essas formas múltiplas são chamadas isozimas ou isoenzimas, que podem ser decorrentes de fatores diferentes: a) presença de mais de um locus codificando as enzimas; b) presença de mais de um alelo codificando a enzima; c) ocorrência de efeitos pós-traducionais na cadeia polipeptídica (RICHARDSON et al. , 1986). Em nosso experimento, o aparecimento de um perfil, de três bandas para a ALAT e duas bandas para a ASAT, sugere uma situação de heterozigose embora não possamos descartar a ação de efeitos pós-

tradicionais que permitiriam um deslocamento diferente da cadeia polipeptídica. Por outro lado, a visualização de três bandas para ALAT (clone C1) também pode sugerir que este perfil seja o resultado da fusão de bandas.

ANDRADE et al. (1983) demonstraram que o padrão isoenzimático para ALAT, no biotipo Tipo III, pode se apresentar de duas formas, sendo uma com duas bandas e a outra com cinco bandas. O padrão de três bandas encontrado por nós, pode ser o resultado da fusão das duas bandas inferiores, e de duas bandas superiores, produzindo um perfil de três bandas. Pode-se observar no perfil enzimático, demonstrado por ANDRADE et al. (1983), que a 1ª e a 2ª bandas são mais estreitas, e a 3ª banda é mais larga. Em nosso experimento, encontramos três bandas largas, diferindo assim do padrão referido.

Quanto à ASAT, a ocorrência de duas bandas pode ser decorrente da ação de dois genes diferentes, não alelos, responsáveis pela produção das cadeias polipeptídicas. Possivelmente, os perfis diferentes, que foram descritos para ALAT e ASAT, não se revelaram quando a cepa total foi estudada e só tiveram uma expressão quando os clones foram estudados isoladamente.

RODRIGUES et al. (1998) após analisarem o perfil isoenzimático de sete cepas da Colômbia mantidas "in vitro", observaram alteração na cepa BM López para as enzimas GPI, PEP-1, GDNAD, 6PGDH.

LANA et al. (1996), após caracterizarem as enzimas de dois isolados do *T. cruzi* obtidos da paciente Berenice, aos 62 e 78 anos de idade, mostraram modelos similares de zimodema A para as amostras Be-62 e Be-78. Porém, a amostra Be-78 mostrou um modelo típico de zimodema B, para PGM e MDH

sugerindo a ocorrência de heterogeneidade dentro da população do *T. cruzi* presente na paciente.

A resposta aos quimioterápicos é um importante caráter das cepas do *T. cruzi* e tem sido consistentemente demonstrada uma resistência elevada das cepas de Tipo III aos quimioterápicos em uso clínico (Nifurtimox e Benzonidazol), a qual foi observada em estudo comparativo da resposta ao tratamento de pacientes chagásicos e dos animais inoculados com as cepas deles isoladas, demonstrando que essa diferença de susceptibilidade ocorre, tanto experimentalmente como nos ensaios clínicos (ANDRADE et al., 1992). Embora resistentes, observa-se uma resposta ao tratamento, com nítida redução parasitária e negatificação da parasitemia direta, embora testes parasitológicos revelem a presença dos parasitos a nível subpatente. Essa observação sugere a existência de formas susceptíveis ao lado de formas resistentes, em uma população parasitária, o que poderia estar relacionado com a presença de diferentes clones.

MARRETO & ANDRADE (1994), estudando as características biológicas e isoenzimáticas de cepas do Tipo II e do Tipo III, isoladas de camundongos tratados e não curados, no sentido de verificar se as formas resistentes apresentavam diferenças em relação à cepa original, observaram que não houve qualquer diferença entre as mesmas, a nível biológico e fenotípico.

No presente trabalho, ficou confirmada a resistência da cepa Colombiana e dos seus clones ao quimioterápico usado, quando se consideraram os resultados dos testes parasitológicos e sorológicos. A presença de títulos elevados

de anticorpos (IgG), nos animais tratados, foi, por vezes, decisiva para o diagnóstico de positividade, nos casos em que os testes parasitológicos estavam negativos ou, em casos isolados, onde apenas um dos testes foi realizado, principalmente pela impossibilidade de realizar o xenodiagnóstico, importante meio diagnóstico, e que vinha sendo usado constantemente, em trabalhos anteriores.

É fato já demonstrado experimentalmente que, nos camundongos tratados e parasitologicamente curados, pode haver persistência da sorologia (teste de imunofluorescência indireta), porém com redução dos títulos, quando comparados com os controles não tratados, tendo sido estabelecido que o título máximo compatível com a cura parasitológica seria o de 1:10 (ANDRADE et al.,1985). A persistência de sorologia positiva ao nível indicado, em animais tratados e parasitologicamente curados , foi correlacionada, em estudos deste laboratório (ANDRADE et al. 1991), à persistência de antígenos parasitários sequestrados em células dendríticas foliculares do baço, constituindo-se em uma memória imunológica.

O uso da "polymerase chain reaction" (PCR) para comprovação de cura no presente trabalho, não permitiu tirar conclusões porque não foi possível se estabelecer uma correlação com a positividade dos testes parasitológicos e sorológicos. A PCR, nas condições em que foi realizado no presente trabalho, após tratamento prolongado, não apresentou sensibilidade suficiente para ser usado como teste de cura. Os outros testes parasitológicos possibilitam a multiplicação parasitária a partir de sangue, quer seja pela hemocultura, pelo xenodiagnóstico ou subinoculação em camundongos. Entretanto a PCR fica a

depende da chance de que o parasito esteja presente no material coletado em camundongos que estão na fase crônica e que foram tratados, estando, portanto, com escasso número de parasitos (quando não curados). Desse modo, os resultados obtidos no presente trabalho são apenas preliminares. O estudo prosseguirá neste sentido, e novos testes serão realizados para melhor avaliar a possibilidade de usar esse método nas nossas pesquisas sobre resposta aos quimioterápicos.

O presente trabalho permitiu, desta maneira, clonar a cepa Colombiana do *T. cruzi*, que mantém o comportamento característico do Biodema III, Zimodema 1, revelando que, dentro dos limites da clonagem realizada, há uma predominância do mesmo tipo de clone, idêntico à cepa parental, caracterizado pelo seu tropismo tissular e patogenicidade, embora com diferentes graus de virulência. Foi de interesse observar a manutenção da resistência ao quimioterápico Benzonidazol, em todos os clones. Apesar desta constatação, o tratamento teve um efeito positivo determinando diminuição da carga parasitária, com negatização da parasitemia ao exame direto, o que indica que os parasitas se mantêm a nível subpatente, pelo tratamento. Entretanto, como não houve cura, a infecção tende a se reativar após a passagem do efeito do quimioterápico e, desta maneira, os resultados apontam para a necessidade de obtenção de novas drogas com efeito sobre cepas de resistência elevada, como a cepa em estudo.

10. CONCLUSÕES

As análises comparativas realizadas entre a cepa Colombiana parental e os seus clones isolados, referentes ao comportamento biológico, bioquímico, e à resposta quimioterápica, demonstraram que:

- 1) As médias parasitêmicas na fase intermediária diferiram significativamente entre a cepa parental e os clones, indicando nessa fase diferentes níveis de multiplicação parasitária e , conseqüentemente, diferentes graus de virulência.
- 2) Os perfis das curvas parasitêmicas foram semelhantes entre a cepa parental e seus clones;
- 3) Os índices de mortalidade da cepa parental foi elevado até 30 dias (100%), indicando uma virulência elevada da cepa;
- 4) O índice de mortalidade dos clones variaram entre altos (78 a 100%) a baixos (7 a 23%), confirmando as diferentes virulências;
- 5) O perfil isoenzimático da cepa parental e de seus clones foi identificado com o Zimodema 1 (Z1), com variações no número de bandas em ALAT (um clone) e ASAT (um clone), podendo ser o resultado de fusão de bandas e da ação de genes diferentes, não alelos;
- 6) Os resultados da quimioterapia revelaram altos índices de resistência, da cepa parental e de seus clones, ao tratamento com Benzonidazol.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMREIN, Y.U. Genetic Transfer in Trypanosomes I. Syngamy in *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, **17**: 261-63, 1965.
2. ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). **Rev. Patol. Trop.**, **1**: 65-121, 1974.
3. ANDRADE, S.G.; FIGUEIRA, R.M.; CARVALHO, M.L.; GORINI, D.F. Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta terapêutica experimental pelo Bay 2502. Resultados de tratamento a longo prazo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **17**: 380-89, 1975.
4. ANDRADE, S.G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**: 39-46, 1985. Supl.
5. ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; BRODSKY, C.; MAGALHÃES, J.B.; BARRAL NETTO, M. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **79**: 397-407, 1985.
6. ANDRADE, S.G. & ANDRADE, Z. Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. **O Hospital**, **70**: 1268-278, 1966.

7. ANDRADE, S.G. & ANDRADE, Z. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. **Rev. Inst. Med. São Paulo.**, 10:180-187,1968.
8. ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.; FIGUEIRA, R.M. Estudo Experimental sobre a resistência de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 19: 124-29, 1977.
9. ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Méd. Bahia**, 70: 32-42,1970.
10. ANDRADE, S.G.; FIGUEIRA, R.M.; CARVALHO, M.L. Tratamento da doença de Chagas experimental. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 14: 135-45, 1972.
11. ANDRADE, S.G. & FREITAS, L.A.R. *Trypanosoma cruzi*: cardiac myocells alterations due to spontaneous of therapeutically induced intracellular parasite desitegration. **Cell. Mol. Biol.**, 33: 797-805, 1987.
12. ANDRADE, S.G.; FREITAS, L.A.R.; PEYROL, S.; PIMENTEL, A.R.; SADIGURSKY,M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi*: persistence of parasite antigen and positive serology in parasitologically cured mice. **Bull. World Health Organ.**, 69: 191-97, 1991.

13. ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L. Terapêutica da fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* com o Benzonidazol e o Nifurtimox. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **22** (3):113-18, 1989.
14. ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull. World Health Organ.**, **63**: 721-26, 1985.
15. ANDRADE, S.G.; SILVA, R.C.; SANTIAGO, C.M.G.; FREITAS, L.A.R. Therapeutic action of MK-436(2,5 nitroimidazol) on *Trypanosoma cruzi* infections in mice: a parasitological, serological, histopathological, and ultrastructural study. **Bull. World Health Organ.**, **65**: 625- 33,1987.
16. ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S.G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. Roy.. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **77**: 796-99, 1983.
17. ANDRADE, S.G.; RASSI, A.; MAGALHÃES, J.B.; FERRIOLLI FILHO, F.; LUQUETTI, A.O . Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **86**: 624-26, 1992.
18. ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F.D.; BARRAL-NETTO, M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **23**:245-50, 1981.

19. ÁVILA, H.; GONÇALVES, A.M.; NEHME, N.S.; MOREL, C.M.; SIMPSON, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR- amplified minicircle variable region sequences. **Mol. Bioch. Parasitol.**, **42**: 175-88, 1990.
20. ÁVILA, H.A.; SIGMAN, D.S.; COHEN, L.M.; MILLIKAN, R.C.; SIMPSON, L. Polymerase chain reation amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Mol. Bioch. Parasitol.**, **48**: 211-22, 1991.
21. BOCK, M.; GONNERT, R.; HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. **Bol. Chil. Parasitol.**, **24**: 13-9,1969.
22. BOGLIOLO, A.R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W.C. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. **Acta Trop.**, **61**: 31-40,1996.
23. BONGERTZ, J.V. & DVORAK, J.A. *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**: 716-22, 1983.
24. BRAND T. V.; TOBIE, E.J.; KISSING, R.E.; ADAMS,G. Phisiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, **85**: 5-16,1949.
25. BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. Belo Horizonte, 1961. 79p. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade de Minas Gerais, 1961.

26. BRENER, Z. & CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **5**: 220-24, 1963.
27. BRENIERE, S.F.; BOSSENO, M.F.; REVOLLO, S.; RIVERA, M.T.; CARLIER, Y.; TIBAYRENC, M. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **46**: 335-41, 1992.
28. BRENIERE, S.F.; BRAQUEMOND, P.; SOLARI, A.; AGNESE, J.F.; TIBAYRENC, M. An isoenzyme study of naturally occurring clones of *cruzi* isolated from both sides of the West Andes Highland. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**: 620-66, 1991.
29. BRUMPT, E. Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. **Bull. Soc. Path. Exot.**, **5**: 360-67, 1912.
30. CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnostic of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **8**: 227-34, 1966.
31. CAMPOS, R.M.F.; ANDRADE, S.G. Characterization of subpopulations (clones e subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **91**(6):795-800, 1996.

32. CAMPOS, R.F.; GONÇALVES, M.S.; REIS, E.A.G.; REIS, M.G.; ANDRADE, S.G. Comparative Analysis by Polymerase Chain Reaction Amplified Minicircles of Kinetoplast DNA of a Stable Strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe-Bahia, its Clones and Subclones: possibility de predominance of a principal clone in this area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**(1):23-29, 1999.
33. CANO, M.I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M.J.; GONZÁLEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J.L.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M.; SILVEIRA, J.F. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol. Bioch. Parasitol.**, **71**: 273-78, 1995.
34. CASTRO-SILVA, R.; SANTIAGO, C.M.G.; PONTES, A.L.; ANDRADE, S.G. Padrão isoenzimático da Cepa Y do *Trypanosoma cruzi* após quimioterapia específica. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**: 81-6, 1989.
35. CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **1**: 159-218, 1909.
36. DIAZ DE TORANZO, E.G.; CASTRO, J.A.; FRANKE DE CAZZULO, B.M.; CAZZULO, J.J. Interaction of benzonidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, **44**: 880-81, 1988.

37. DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed. Proc.**, **45**: 2471-76, 1986.
38. DORN, P.L.; SELGEAN, S.; GUILLOT, M. Simplified method for preservation and polymerase chain reaction-amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**: 253-55, 1997.
39. DVORAK, J.A. Single Cell Isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and Why? **Bull. World Health Organ.**, 1985.
40. DVORAK, J.A. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. **J. Cell. Bioch.**, **24**: 357-71, 1984.
41. ENGEL, J.C.; DVORAK, J.A. SEGURA, E.L. CRANE, M.J. *Trypanosoma cruzi* biological characterization of 19 clones derived from two chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. **J. Protozool.**, **29**: 555-60, 1982.
42. FEDERICI, E.E.; ABELMANN, W.B.; NEVA, F.A. Chronic and progressive myocarditis and myosites in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **13**: 272-80, 1964.
43. FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; PEREIRA, J.B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A.C.V.; NAIFF, R.D.; BARRET, T.B.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and RNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **58**(6): 807-11, 1998.

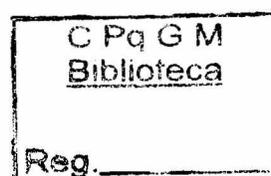
44. FILARDI, L.S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, **81**: 755-59, 1987.
45. FILARDI, L.S. & BRENER, Z. A Nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **176**: 293-87, 1982.
46. GOIJMAN, S.G.; FRASH, A.C.C.; STOPPANI, A.O.M. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitrohetrocyclic drugs. **Bioch. Pharmacol.**, **34**: 1457-61, 1985.
47. GOIJMAN, S.G. & STOPPANI, A.O.M. Effects of nitrohetrocíclicos drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Bioch. Pharmacol.**, **34**:1331-36, 1985.
48. GOLDBERG, S.S. & SILVA PEREIRA, A.A.S. Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, **69** (1): 91-6, 1983
49. GOMES, M.L.; ROMANHA, A.J.; GONÇALVES, A.M. CHIARI, E. Stability of isoenzyme and kinetoplast DNA (k-DNA) patterns in successively cloned *Trypanosoma cruzi* populations. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **86** (4):379-85, 1991
50. GONÇALVES, A.M. & MOREL, C.M. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: MOREL, C.M.(Ed.) *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*. 2.ed. Geneva/Rio de Janeiro: UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p. 102-115.

51. HAUSCHKA, T.S. Persistence of strain-specific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. **J. Parasitol.**, **35**: 593-99, 1949.
52. KUMAR, R.; IRWIN, K.K.; ABELMANN, W.H. Experimental *Trypanosoma cruzi* myocarditis. Relative effects upon the right and left ventricles. **Am.J. Path.**, **57**:31-48, 1969.
53. LANA, M.; CHIARI, C.A.; CHIARI, E.; MOREL, C.M.; GONÇALVES, A.M.; ROMANHA, A.J. Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas'disease described by Carlos Chagas in 1909. **Parasitol. Res.**, **82**: 257-60,1996.
54. LAURENT, J.P.; BARNABE, C.; QUESNEY, S.N.; TIBAYRENC, M. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, **114**: 213-18, 1997
55. LAURIA-PIRES, L. & TEIXEIRA, A. R.L.. Virulência and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones, derived from Chaga's disease patients. **Am. J. Trop. med. Hyg.**, **55**(3): 304-310, 1996
56. LIMA, M.T.; LENZI, H.L.; GATTASS, C.R. Negative tissue in mice injected with a noninfective clone of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, **81**:6-12,1995.
57. LIMA,M.T.; RONDINELLI, E.; GATASS, C.R. *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. **Parasitol. Res**, **77**:77-81, 1990.

58. LUMSDEN, W.H.R. Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. **Ann. Soc. Belge. Med. Trop.**, **57**: 361-68, 1977.
59. MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitol. Today.**, **14**(3):119-124, 1998.
60. MACINA, R. A.; SANCHEZ, D.O.; AFFRANCHINO, J.L.; ENGEL, J.C.; FRASCH, A.C.C. Polymorphisms within minicircle sequence classes in the kinetoplast DNA of *Trypanosoma cruzi* clones. **Mol. Bioch. Parasitol.**, **16**:61-74, 1985
61. MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L.; ANDRADE, S.G.; Comportamento das cepas Y e Peruana do *Trypanosoma cruzi* no camundongo após passagens em diferentes meios. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **80**: 41-50, 1985.
62. MAGALHÃES, J.B.; ANDRADE, S.G. Estudo do comportamento de cepas de *Trypanosoma cruzi* após passagem em diferentes espécies de triatomíneos. **Rev. Soc. bras Med. Trop.**, **24**:209-16, 1991.
63. MAGALHÃES, J.B.; ANDRADE, S.G.; SHERLOCK, I. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine(biological and biochemical patterns). **Rev. Inst. Med. São Paulo.**, **38**(1):23-8, 1996 .

64. MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CI, e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 83: 175-81, 1988.
65. MARR, J.J. & DO CAMPO, R. Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. **Rev. Infect. Dis.**, 8: 884-903, 1986.
66. MARRETO, J.M. & ANDRADE, S.G. Biochemical behavior of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. **Rev. Soc. Bras. Trop.**, 27::209-15, 1994.
67. MAYA, J.D.; REPETTO, Y.; AGOSIN, M.; OJEDA, J.M.; TELLEZ, R.; GAULE, C.; MORELLO, A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch. Parasitol.**, 86: 101-06, 1997.
68. MEYER, H. & OLIVEIRA, M.X. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture: a four year study. **Parasitology**, 39: 91-4, 1948.
69. MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; de SOUZA, A.A.; PÓVOA, M.. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**, 74:221-37, 1980
70. MILES, M.A. Isozyme characterization. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 18: 53-59, 1985. Suplemento.
71. MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones do *Trypanosoma cruzi* can be

- characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**,7: 6810-14, 1980.
72. MOREL, C. & SIMPSON, L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 29: 1070-74, 1980. Suplemento
73. MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R.; MASON, R.P.; LEON, W.; STOPPANNI, A.O.M. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Arch. Bioch. Biophys**, 218: 585-91, 1982.
74. MURTA, S.M.F. & ROMANHA, A.J. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. **Parasitology**, 116: 165-71, 1998.
75. NEAL, R.A. & BUEREN, J. V. Comparative studies of drugs susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 82: 709-14, 1988.
76. NUNES, L.R.; CARVALHO, M.R. de.; BUCK, G.A. *Trypanosoma cruzi* partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. **Mol. Bioch. Parasitol.**, 86: 211-24, 1997.
77. OLIVEIRA, R.P.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. An alternative approach to evaluating the intraespecific genetic variability of parasites. **Parasitol. Today**, 13(5):196-99, 1997.



78. PAN, S.C. Establishment of clones of *Trypanosoma cruzi* and their characterization in vitro and in vivo. **Bull. World Health Organ**, **60**: 101-07, 1982.
79. PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**, 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 872p.
80. PHILLIPS, N.R. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*: considerations regarding standardization of material. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **54**: 60-70, 1960.
81. PIZZI, T. & PRAGER, R. Estabilization de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por passage seriado en ratones de constitucion genética uniforme: analisis quantitativo del curso de la infeccion biologica. **Biol.**, **16-17**: 3-12, 1952.
82. POLAK, A. & RICKLE, R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **72** :45-54, 1978.
83. POSTAN, M.; DVORAK, J. A.; McDANIEL, J.P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones inbred mice. I . A comparison of the course of infection of C3 H/HEN mice with two clones isolated from a common source. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32** (3): 497-506, 1983.
84. POSTAN, M.; McDANIEL, J.P.; DVORAK, J. A. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones inbred mice. II. course of infection of C57 BL/6 mice with single-cell-isolated stocks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **33** (2): 236-38, 1984.

85. POSTAN, M.; McDANIEL, J.P.; DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: constancy of clone pathogenicity for inbred mice during long-term in vitro maintenance. **Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **80** : 659-63, 1986.
86. POSTAN, M.; McDANIEL, J.P.; DVORAK, J. A. Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones. **Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **81** : 415-19, 1987.
87. RICHARDSON, B.J.; BAVERSTOCK, P.R.; ADAMS, M. **Allozyme electrophoresis a handbook for animal systematics and populations studies**. Sydney: Academic Press, 1986.410p.
88. RODRIGUES, P.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, S.; ZARANTE, I.; PUERTA, C. Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **93**(6):739-40, 1998.
89. ROMANHA, A.J. **Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi***. Belo Horizonte, 1982. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Universidade federal de Minas Gerais, 1982
90. SOLARI, A.; MUNOZ, S.; VENEGAS, J.; WALLACE, A.; AGUILLERA, X.; APT, W.; BRENIERE, S.F.; TIBAYRENC, M. Characterization of Chilean, Bolivian, and Argentinian *Trypanosoma cruzi* Populations by restriction endonuclease isoenzyme analysis. **Exp. Parasitol.**, **75**: 187-95, 1992.
91. SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C.C.; CARRASCO, A.E.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; de ISOLA, E.D.; STOPPANI, A.O.M. Rapid evolution of kinetoplast DNA mini-circle subpopulations in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Bioch.Parasitol.**, **11**:169-178, 1984

92. SILVA, L.H.P. Observações sôbre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo., 1:99-118, 1959
93. SOGAYAR, R.; KIPNIS, T.L.; CURI, P.R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, 35(5):395-98, 1993.
94. TIBAYRENC, M. & DESJEUX, P. The presence in Bolivia of two distinct zymodemes of *Trypanosoma cruzi*, circulating sympatrically in a domestic transmission cycle. **Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.**,77:73-75,1983.
95. TIBAYRENC, M.; SOLIGNAC, M.; CARIOU, M. -L.; Le RAY, D.; DESJEUX, P. Les souches isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*: origine récente ou ancienne, homogène ou heterogène? **C.R. Acad. Sc. Paris**,7:195-198,1984.
96. TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. **Evolution**, 42: 277-92, 1988.
97. TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. Towards a Populations genetics of Micro-organism: the Clonal Theory of Parasitic Protozoa. **Parasitol. Today**, 7:228-31, 1991.
98. TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. *Trypanosoma cruzi* populations: More clonal than sexual. **Parasitol. Today**, 3: 189-90, 1987.
99. TIBAYRENC, M.; CARIOU, M.-L.; SOLIGNAC, M.; DEDET, J-P.; POCH, O.; DESJEUX, P. New eletrophoretic evidence of genetic variation and

diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. **Genetica**, **67**: 223-30, 1985.

100. TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F.J. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 2414-18, 1990.
101. TIBAYRENC, M. & MILES, M.A. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, **77**: 76-83, 1983.
102. TIBAYRENC, M.; WARD, P. ; MOYA, A.; AYALA, F.J. Natural population of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas'disease, have a complex multiclonal structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 115-19, 1986.
103. TIBAYRENC, M.; CARIOU, M.L.; SOLIGNAC, M. ; CARLIER, Y. Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi*: implications taxinomiques. **Comp. Rendus Acad. Sci.**, **293**: 207:9, 1981
104. TITTO, E.H.; ISRAELSKI, D.; ARAÚJO, F.G. Circulating *Trypanosoma cruzi* from the same cloned population show differences in the ability to infect cells and to cause lethal infection in mice. **Experientia**, **43**: 1227-29, 1987.

105. WARREN, L.G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **J. Parasitol.**, **46**: 529-39, 1960.
106. WINCHER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J.B.; CARDOSO, A.; OELEMANN, W.; MOREL, C.M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural area. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **51**: 771-77, 1994.
107. WHO. Report of the steering committees research activities of the scientific working group (SWG) on Chagas' disease 1982-1985. Parasite Classification. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **81**(Suppl): 181-244,1986
108. YONEDA, S.; KIMURA, E.; CASTELLANI, B.R. Some observations on the effect of RO 7-1051 on *Trypanosoma cruzi*, particularly in cell culture. **Experientia**, **33**: 1201-02, 1976.
109. ZAVALA-CASTRO, J.E.; VELASCO-CASTREJON, O.; HERNANDEZ, R. M Molecular characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**(2):201-9, 1992.
110. ZINGALES, B.; RONDINELLI, E.; DEGRAVE, W.; SILVEIRA, J.F.; LEVIN, M; PASLIER, D.E.; MODABBER, F.; DOBROKHOTOV, B.; SWINDLE, J.; KELLY, J.M.; ASLUND, L.; HOHEINEL, J.D.; RUIZ, M. R.; CAZZULO, J.J.; PETTERSSON, U.; FRASCH, A.C. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. **Parasitol Today.**, **13** (1): 16-21, 1997

ANEXOS

ANEXO I - Tabelas (Comportamento biológico)

Tab.1 Avaliação da parasitemia precoce, intermediária e tardia, no primeiro mês de infecção da cepa Colombiana do *T. cruzi* e de seus clones

Dias de infecção	9°	19°	29°
Grupo de estudo	Precoce -- X ± DP	Intermediária -- X ± DP	Tardia -- X ± DP
Cepa Parental (117 ^a) *	7,80 ± 13,19	266,40 ± 359,15	792,66 ± 710,44
Cl-Col-C 6 (10 ^a) *	1,20 ± 1,64	882,60 ± 509,94	863,00 ± 575,58
Cl-Col-C3 (5 ^a) *	1,20 ± 1,64	103,80 ± 111,79	622,00 ± 437,80
Cl-Col-C4 (3 ^a) *	1,20 ± 1,78	16,80 ± 18,90	-----
Cl-Col-C (13 ^a) *	0,00 ± 0,00	217,80 ± 378,12	-----
Cl-Col-C7 (3 ^a) *	1,40 ± 1,34	106,40 ± 54,02	298,40 ± 241,50
Cl-Col-C2 (3 ^a) *	0,20 ± 0,44	0,60 ± 1,34	76,80 ± 59,93
Cl-Col-C5 (3 ^a) *	0,20 ± 0,44	16,40 ± 31,72	171,80 ± 225,16
	p=0,28	p=0,003	p=0,11

Teste de Kruskal-Wallis H. Análise comparativa da parasitemia de camundongos infectados com a cepa parental e os seus clones.

* Os números entre parênteses indicam a passagem em que a cepa e os clones foram analisados

Tab. 2 Análise de mortalidade tardia, até 30 dias, de camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e seus clones

Grupo de estudo	Inóculo	Animais Inoculados	Mortalidade dos animais	Percentagem
Cepa Parental (117 ^a)	100.000	25	9/9	100,0 %
Cl-Col-C1 (13 ^a)	50.000	18	11/11	100,0 %
Cl-Col-C6 (10 ^a)	100.000	25	14/14	100,0 %
Cl-Col-C3 (5 ^a)	50.000	25	12/13	92,3 %
Cl-Col-C4 (3 ^a)	100.000	25	15/19	78,9 %
Cl-Col-C7 (3 ^a)	100.000	25	3/13	23,0 % ♦
Cl-Col-C2 (3 ^a)	100.000	25	1/13	7,6 % ♦
Cl-Col-C5 (3 ^a)	100.000	25	1/13	7,6 % ♦

♦ $p < 0,0$, pelo teste exato de Fischer

ANEXO II - Tabelas (Quimioterapia)

Tab. 3 Avaliação da Parasitemia tardia da cepa Colombiana do *T. cruzi* e de seus clones no 29º da infecção tratados com Benzonidazol

Grupo de estudo	Tardia 29º dia de infecção -- X ± DP	
	Tratado	Não Tratado
Cl-Col-C1 (13 ^a)	3,20 ± 3,27	-----
Cl-Col-C 4 (8 ^a)	0,0 ± 0,00	-----
Cl-Col-C 6 (10 ^a)	2,20 ± 3,89	863,00 ± 575,58
Cl-Col-C 5 (10 ^a)	2,60 ± 3,43	732,25 ± 688,79
Cl-Col-C 3 (12 ^a)	1,2 ± 1,78	-----
Cl-Col-C 7 (11 ^a)	0,20 ± 0,44	666,80 ± 525,45
Cepa Parental (131 ^a)	0,00 ± 0,00	437,20 ± 521,94
Cl-Col-C 2 (8 ^a)	0,00 ± 0,00	135,20 ± 130,28

ANEXO III - Tabelas (Teste de cura)

Tab. 4 Avaliação dos testes de cura parasitológicos, sorológico e molecular, de camundongos infectados com cepa Colombiana parental, após tratamento durante 90 dias, com Benzonidazol

Nº do animal	Testes parasitológicos			Teste sorológico	Teste molecular
	Parasitemia	Subinoculação	Hemocultura	IFI-Títulos	PCR
1	----	----	----	----	----
2	----	----	----	----	----
3	NEG	NEG	NEG	POS 1:20	----
4	NEG	NEG	NEG	POS 1:640	NEG
5	NEG	POS	NEG	POS 1:320	----
6	NEG	POS	POS	POS 1:2560	NEG
7	NEG	POS	NEG	POS 1:40	POS
8	NEG	POS	NEG	NEG	POS
9	NEG	POS	NEG	POS 1:160	NEG
10	POS	----	----	----	----
11	NEG	POS	NEG	POS 1:320	POS
12	NEG	POS	NEG	POS 1:320	----
13	----	----	----	----	----
14	NEG	POS	POS	POS 1:640	POS
15	POS	----	----	----	----

Tab. 5 Avaliação dos testes de cura parasitológicos, sorológico e molecular de camundongos infectados pelo clone CI-Col-C1, após tratados durante 90 dias, com Benzonidazol

Nº do animal	Testes parasitológicos			Teste Sorológico	Teste molecular
	Parasitemia	Subinoculação	Hemocultura	I.F.I. - Títulos	PCR
1	NEG	NEG	POS	POS 1:5020	NEG
2	----	----	----	----	----
3	NEG	NEG	POS	POS 1:5020	NEG
4	NEG	NEG	POS	POS 1:5020	NEG
6	NEG	NEG	POS	POS 1:5020	NEG

Tab. 6 Avaliação dos testes de cura parasitológicos, sorológico e molecular, de camundongos infectados pelo clone CI-Col-C2, após tratados durante 90 dias, com Benzonidazol

Nº do animal	Testes parasitológicos			Teste sorológico	Teste molecular
	Parasitemia	Subinoculação	Hemocultura	I.F.I - Títulos	PCR
1	NEG	POS	NEG	POS 1:40	NEG
2	NEG	POS	NEG	POS 1:80	NEG
3	NEG	POS	NEG	POS 1:160	----
4	NEG	POS	NEG	----	NEG
5	NEG	POS	NEG	POS 1:80	POS
6	NEG	POS	NEG	POS 1:40	NEG
7	NEG	POS	NEG	POS 1:160	NEG
8	NEG	POS	NEG	POS 1:160	NEG
9	POS	----	----	----	----
10	NEG	----	POS	POS 1:20	NEG
11	NEG	POS	----	POS 1:40	NEG
12	POS	----	----	----	----
13	POS	----	----	----	----
14	POS	----	----	----	----
15	NEG	POS	NEG	POS 1:40	----
16	NEG	POS	POS	POS 1:80	----
17	NEG	POS	NEG	POS 1:40	POS
18	NEG	POS	NEG	----	NEG
19	NEG	----	----	----	POS
20	NEG	----	----	----	NEG

Tab.7 Avaliação dos testes de cura parasitológicos, sorológico e molecular, de camundongos infectados pelo clone CI-Col-C3, após tratados durante 90 dias, com Benzonidazol

Nº do animal	Testes parasitológicos		Teste sorológico	Teste molecular
	Parasitemia	Hemocultura	I.F.I -Títulos	PCR
1	NEG	NEG	NEG	NEG
2	POS	----	----	----
3	NEG	NEG	POS 1:5120	POS
4	POS	----	----	----
5	POS	----	POS 1:80	----
6	POS	----	POS 1:40	----
7	NEG	NEG	POS 1:2560	NEG
8	POS	----	----	----
9	POS	----	----	----
10	POS	----	----	----
11	POS	----	----	----
12	NEG	NEG	NEG	POS

Tab. 8 Avaliação dos testes de cura parasitológicos, sorológico e molecular, de camundongos infectados pelo clone Cl-Col-C4, após tratados durante 90 dias, com Benzonidazol

Nº do animal	Testes parasitológicos		Teste sorológico	Teste molecular
	Parasitemia	Hemocultura	I.F.I -Títulos	PCR
1	NEG	POS	POS 1:640	NEG
2	POS	----	----	----
3	NEG	POS	POS 1:80	NEG
4	POS	----	----	----
5	POS	----	----	----

Tab. 9. Avaliação dos testes de cura parasitológicos, sorológico e molecular de camundongos infectados pelo clone CI-Col-C5, após tratados durante 90 dias, com Benzonidazol

Nº do animal	Testes parasitológicos			Teste sorológico	Teste molecular
	Parasitemia	Subinoculação	Hemocultura	I.F.I. - Títulos	PCR
1	NEG	POS	POS	POS 1:5020	NEG
2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	NEG	NEG	POS	POS 1:160	NEG
4	NEG	NEG	----	POS 1:40	NEG
5	NEG	POS	NEG	POS 1:180	NEG
6	NEG	NEG	NEG	POS 1:180	NEG
7	NEG	NEG	NEG	POS 1:80	NEG
8	NEG	NEG	POS	POS 1:5020	NEG
9	NEG	NEG	----	POS 1:5020	NEG
10	NEG	NEG	NEG	POS 1:180	----

Tab. 10. Avaliação dos testes de cura parasitológicos, sorológico e molecular de camundongos infectados pelo clone CI-Col-C6, após tratados durante 90 dias, com Benzonidazol

Nº do animal	Testes parasitológicos			Teste sorológico	Teste molecular
	Parasitemia	Subinoculação	Hemocultura	I.F.I. - Títulos	PCR
1	NEG	POS	POS	POS 1:320	NEG
2	NEG	NEG	NEG	POS 1:320	-----
3	NEG	POS	NEG	POS 1:20	NEG
4	NEG	POS	POS	POS 1:5020	NEG
5	POS	----	----	----	----
6	NEG	NEG	NEG	POS 1:160	NEG
7	NEG	POS	POS	POS 1:120	NEG
8	NEG	NEG	NEG	POS 1:5020	NEG

Tab. 11. Avaliação dos testes de cura parasitológicos, sorológico e molecular de camundongos infectados pelo clone CI-Col-C7, após tratados durante 90 dias, com Benzonidazol

Nº do animal	Testes parasitológicos			Teste sorológico	Teste molecular
	Parasitemia	Subinoculação	Hemocultura	I.F.I. -Títulos	PCR
1	NEG	POS	POS	POS 1:320	NEG
2	NEG	POS	POS	POS 1:320	NEG
3	NEG	----	NEG	POS 1:640	NEG
4	POS	POS	----	----	----
5	NEG	----	POS	POS 1:1280	POS
6	NEG	----	POS	POS 1:5020	POS
7	NEG	POS	POS	POS 1:5020	POS
8	NEG	POS	POS	POS 1:2560	POS
9	NEG	POS	NEG	POS 1:640	NEG
10	NEG	POS	POS	POS 1:2560	POS
11	NEG	POS	POS	POS 1:5020	POS
12	NEG	NEG	NEG	POS 1:640	POS
13	NEG	POS	POS	POS 1:2560	POS
14	NEG	NEG	NEG	POS 1:160	POS

Tab. 12. Resultados comparativos dos testes parasitológicos e da reação em cadeia da polimerase (PCR) realizados nos camundongos infectados com os clones da cepa Colombiana do *T. cruzi*, após tratamento.

Testes parasitológicos	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	Percentagem
POS	POS	22,0%
POS	NEG	45,7%
NEG	POS	10,1%
NEG	NEG	11,8%

Houve baixa concordância entre os dois testes

ANEXO IV - Figuras (Comportamento biológico)

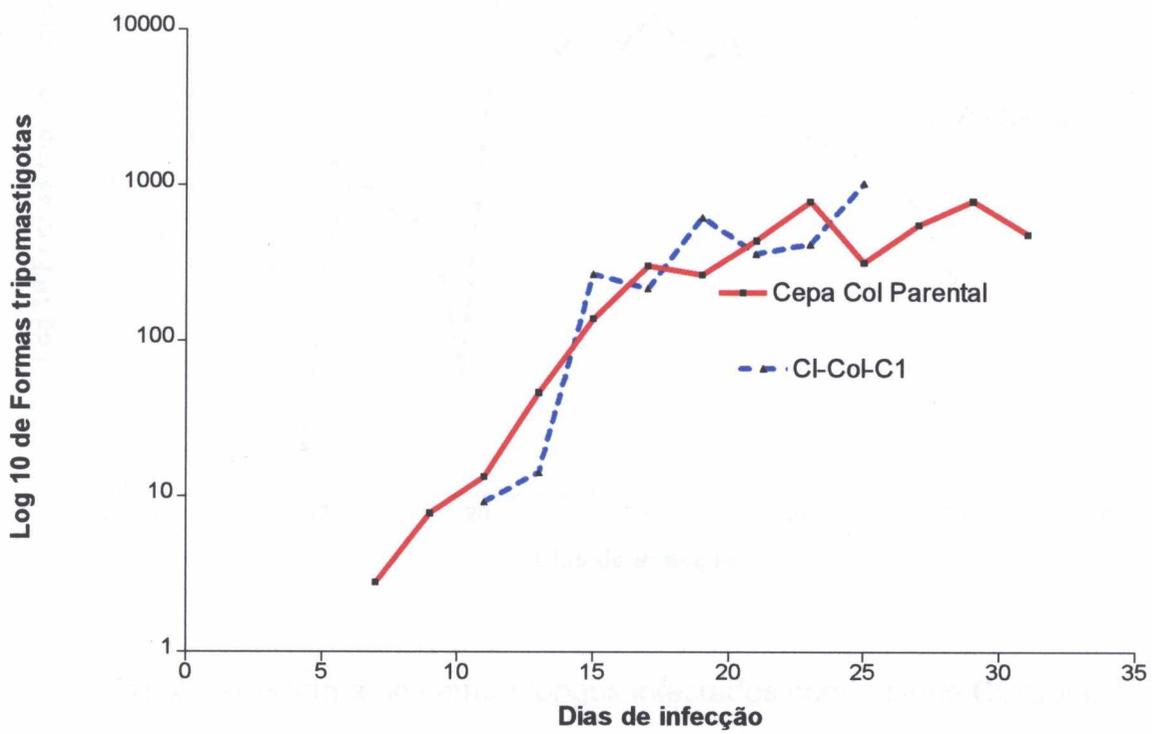


Fig. 1 - Parasitemia de camundongos infectados com o clone CL-Col-C1

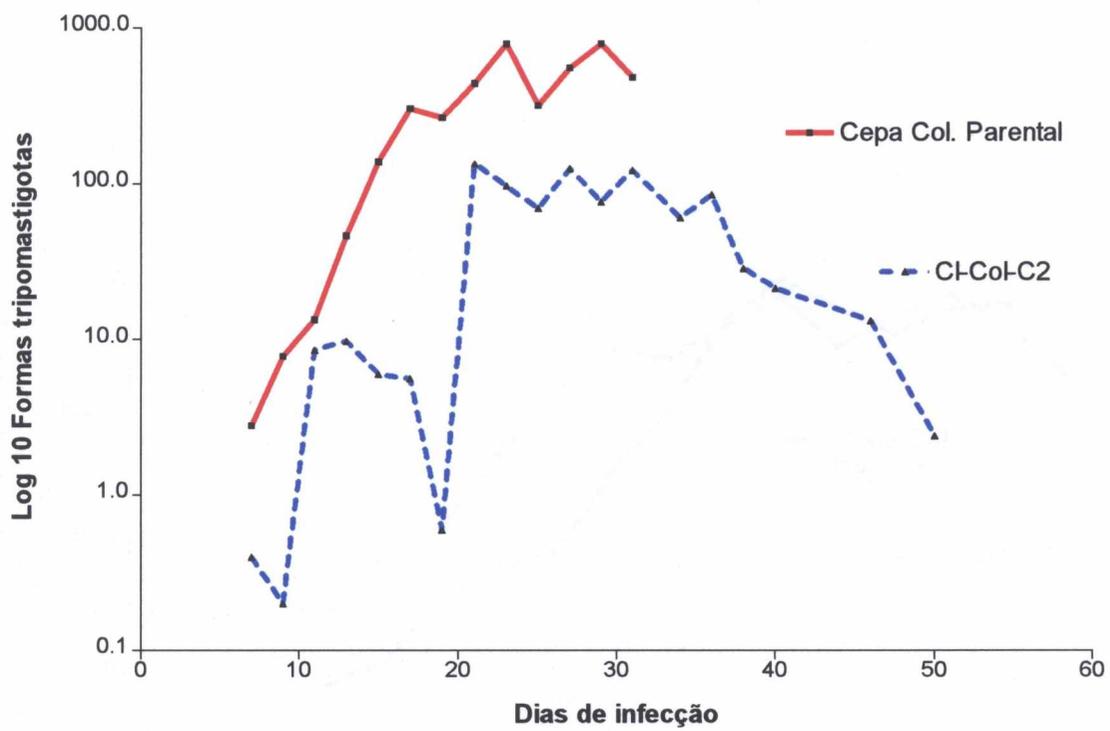


Fig. 2 Parasitemia de camundongos infectados com o clone CL-Col-C2

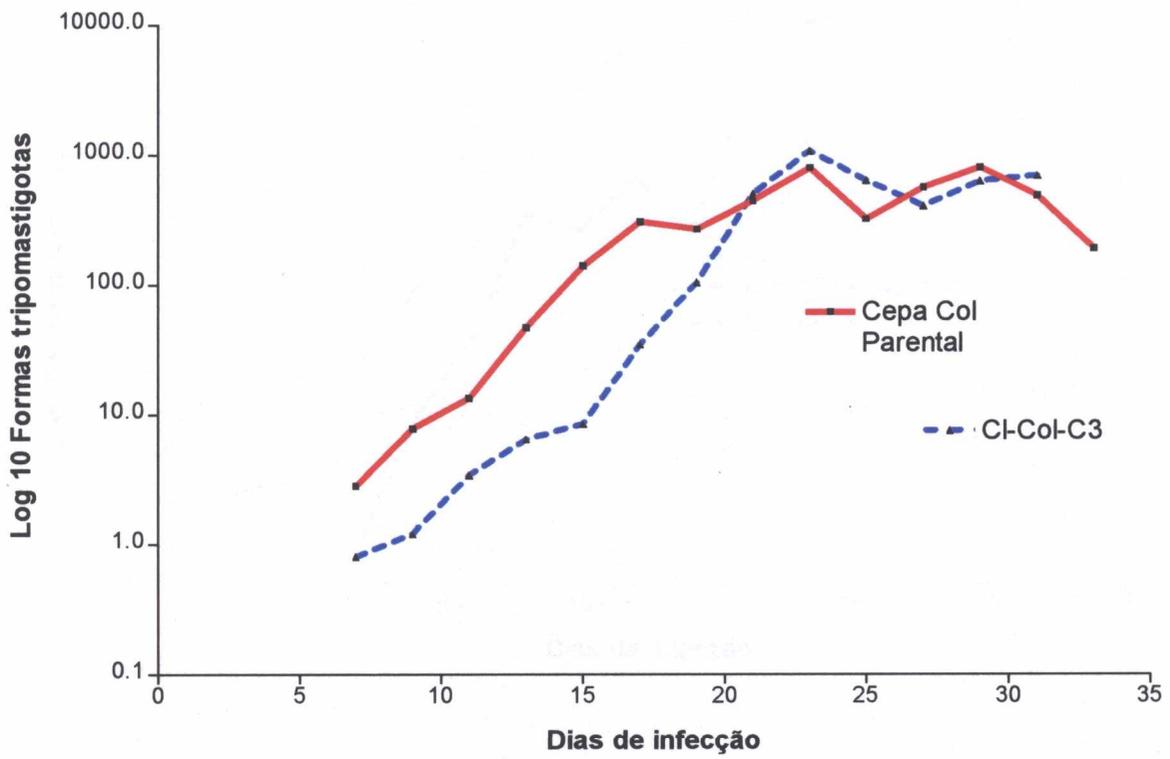


Fig. 3 Parasitemia de camundongos infectados com o clone CL-Col-C3

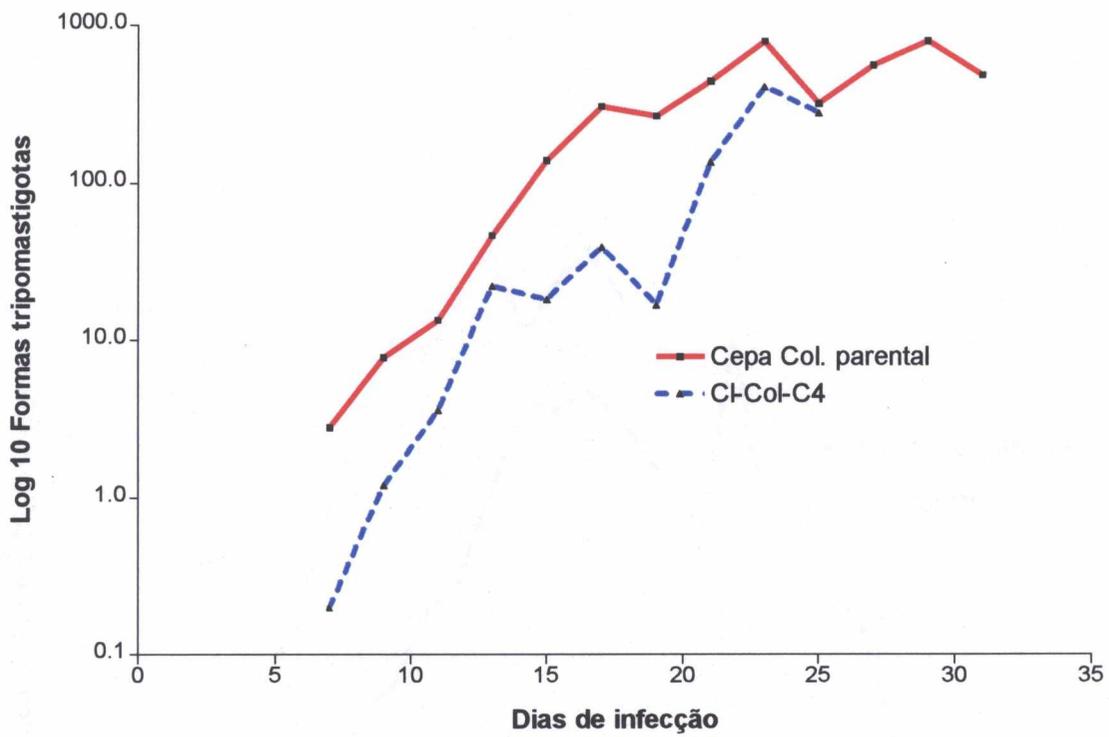


Fig. 4 Parasitemia de camundongos infectados com o clone CL-Col-C4

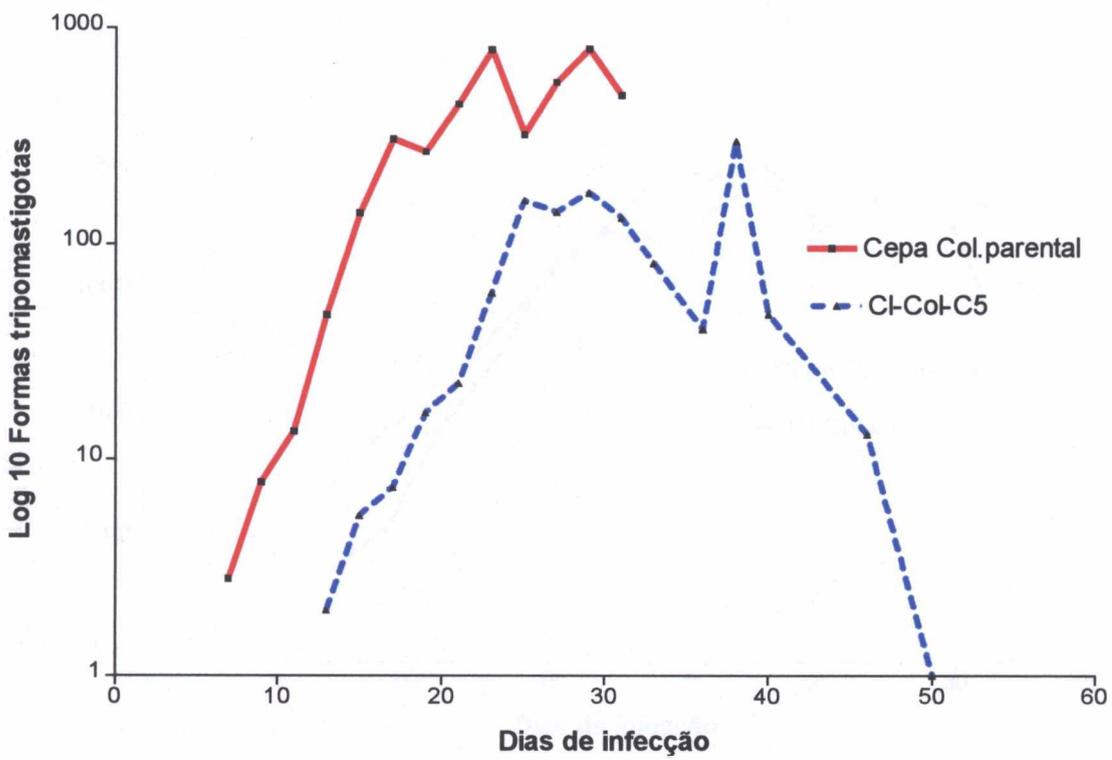


Fig. 5 Parasitemia de camundongos infectados com o clone CL-Col-C5

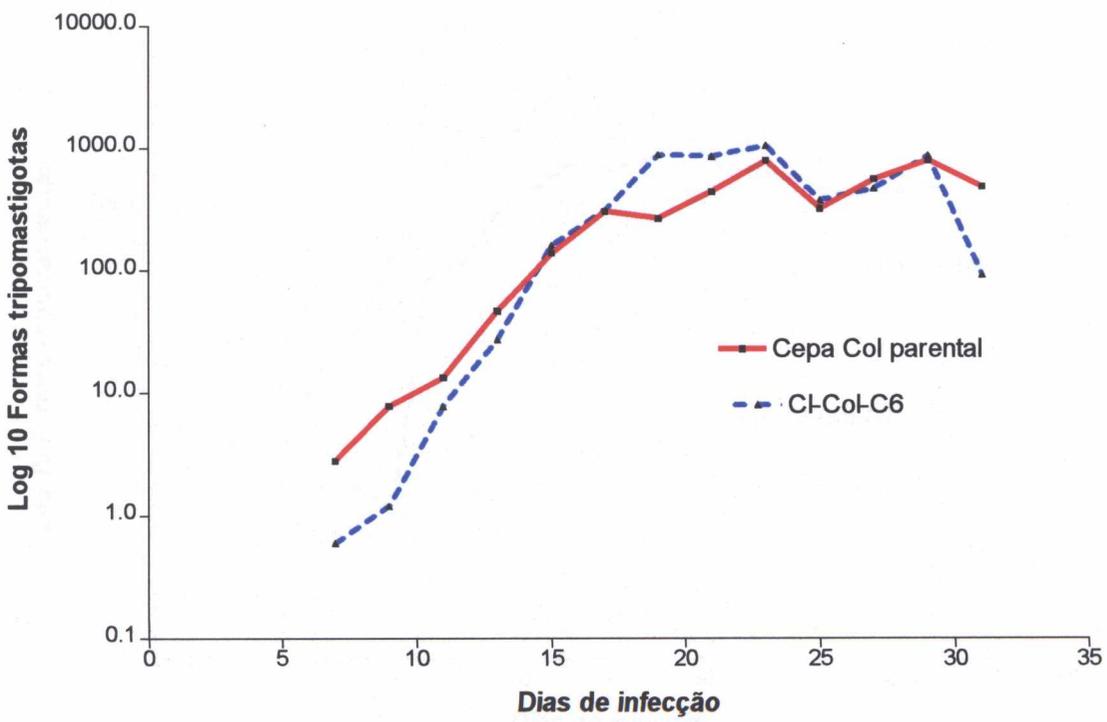


Fig. 6 Parasitemia de camundongos infectados com o clone CL-Col-C6

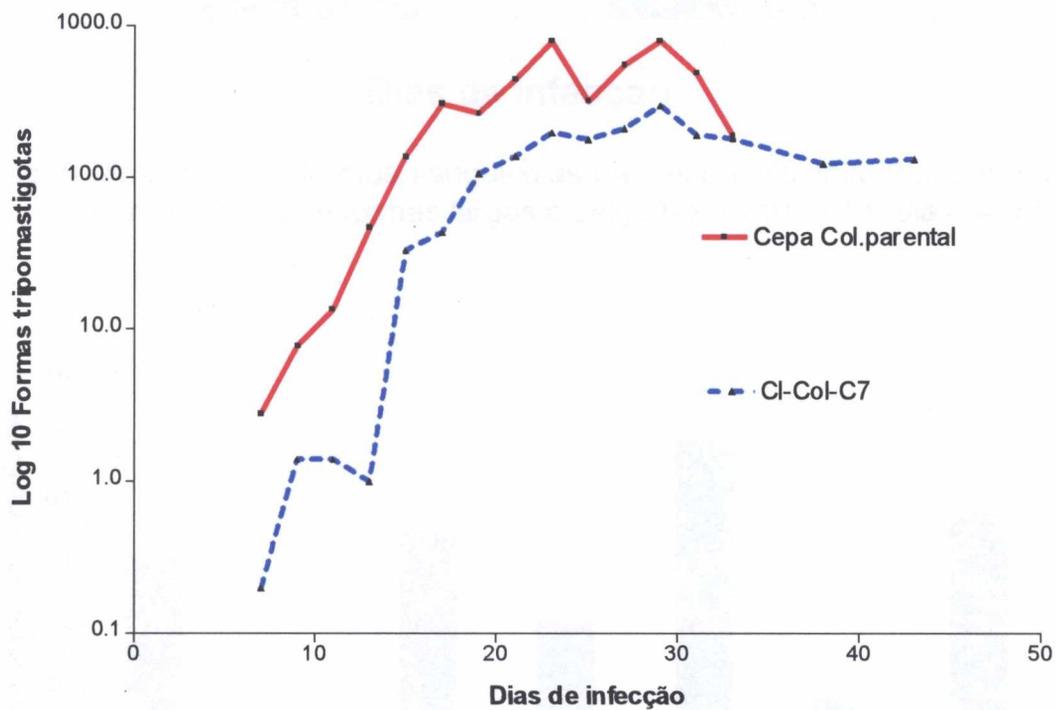


Fig.7 Parasitemia de camundongos infectados com o clone CL-Col-C7

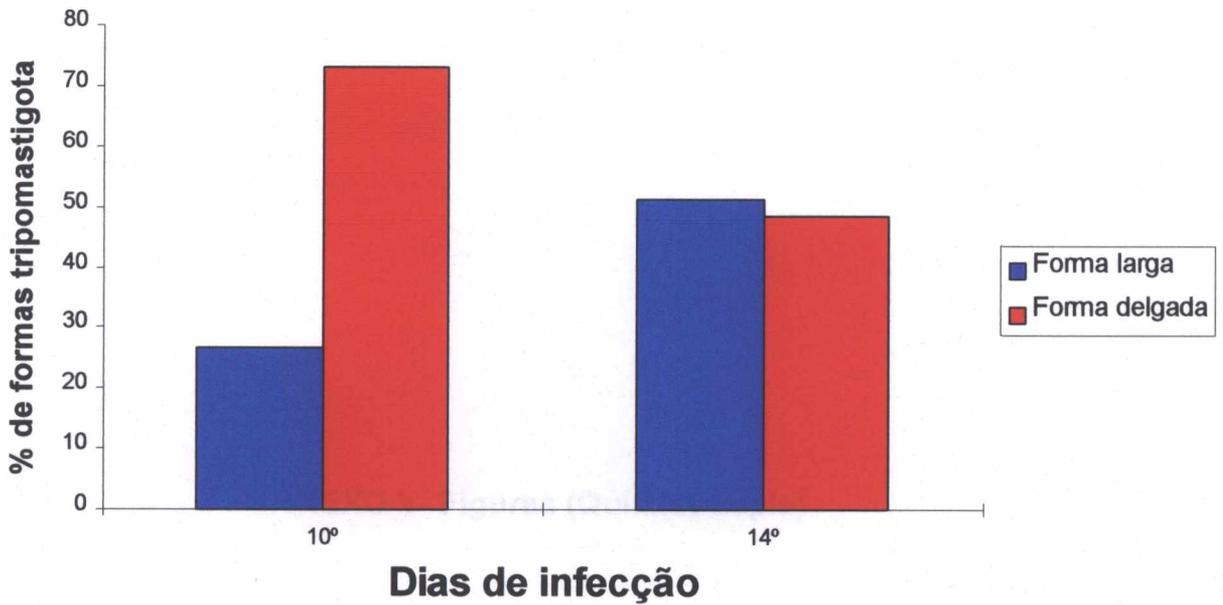


Fig. 8 Morfologia da formas sanguícolas da Cepa Colombiana parental do *T. cruzi*. Percentagens de formas largas e delgadas no 10° e 14° dias de infecção.

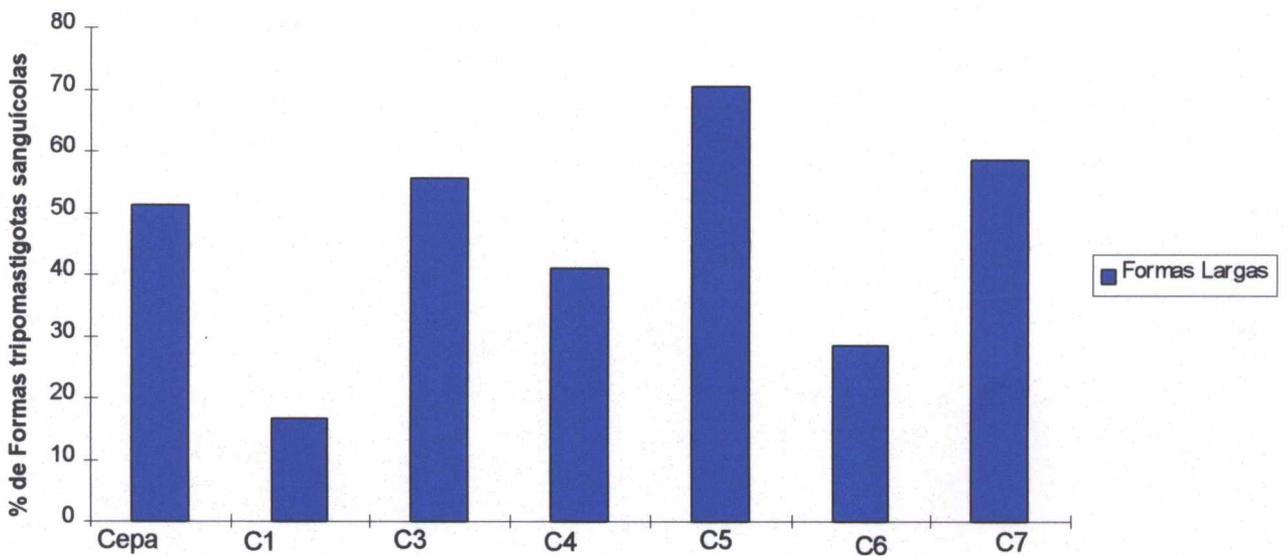


Fig. 9 Morfologia da formas sanguícolas Cepa Colombiana parental do *T. cruzi* e dos seus clones. Percentagens de formas largas no 14° dia de infecção.

ANEXO V- Figuras (Quimioterapia)

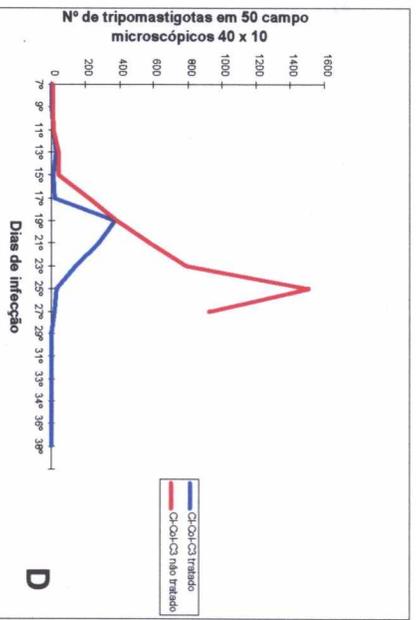
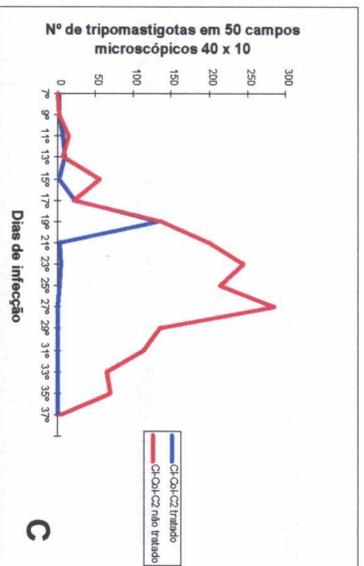
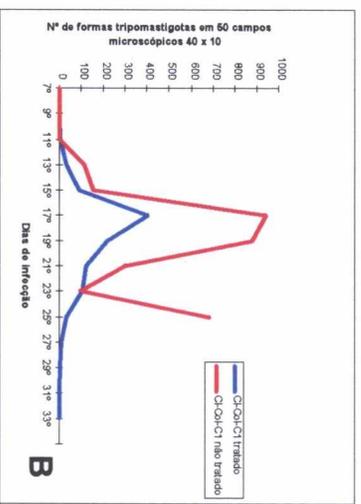
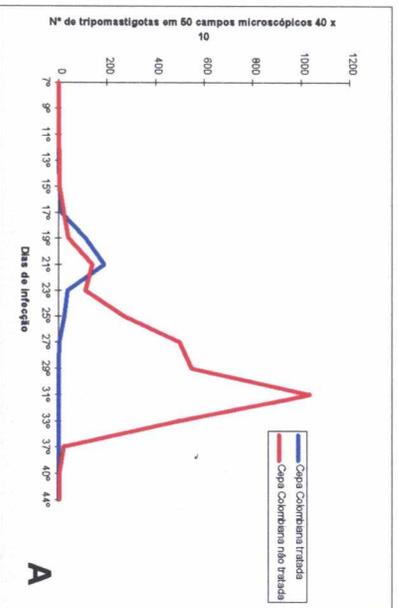


Fig. 10 Parasitemia nos camundongos infectados com a cepa parental e os seus clones e tratados com Benzimidazol, iniciado no 20º dia de pós- infecção e prosseguido até 90 dias.

Fig.10. Parasitemia dos camundongos infectados com a cepa parental e os clones C1, C2, C3 da cepa Colombiana do *T.cruzi*, e tratados com o Benzonidazol

A: Cepa parental e controles não tratados

B: Clone C1 e controles não tratados

C: Clone C2 e controles não tratados

D: Clone C3 e controles não tratados

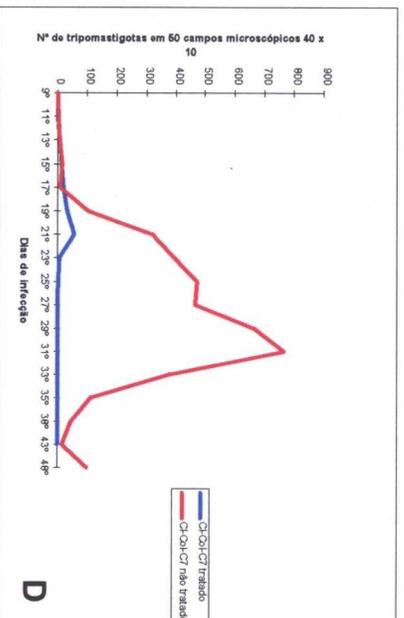
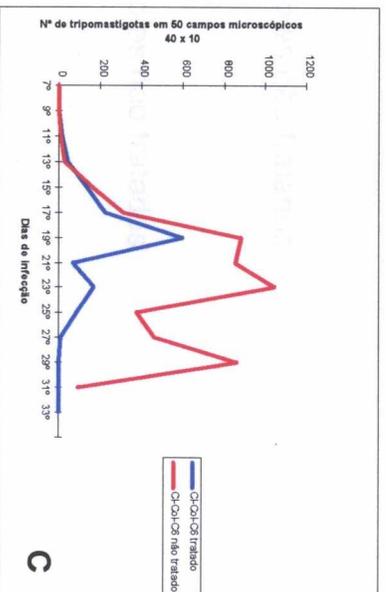
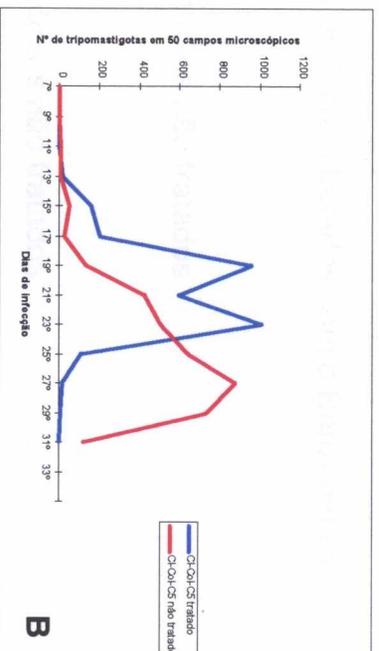
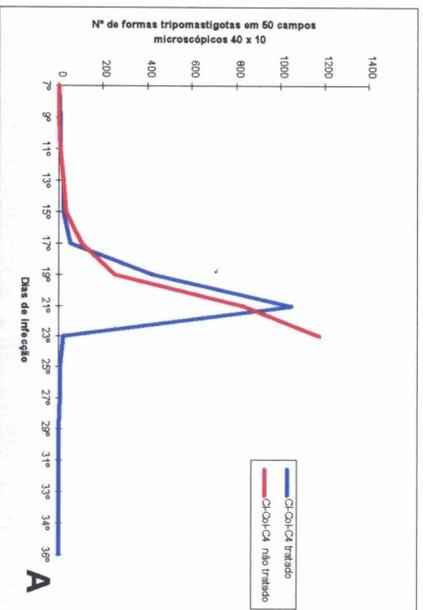


Fig. 11 Parasitemia nos camundongos infectados com a cepa parental e os seus clones e tratados com Benzimidazol.

Fig.11- Parasitemia dos camundongos infectados com clones C4, C5, C6,C7 da Cepa Colombiana do *T.cruzi* tratados com o Benzonidazol

A: Clone C4 e controles não tratados

B: Clone C5 e controles não tratados

C: Clone C6 e controles não tratados

D: Clone C7 e controles não tratados

ANEXO VI- Pranchas (Isoenzimas)

Fig.12. Bandas eletroforéticas reveladas na enzima PGM (fosfoglucomutase) da cepa parental e dos clones C1 e C2, e controles (cepa Peruana, 21 SF e Colombiana)

Fig.13

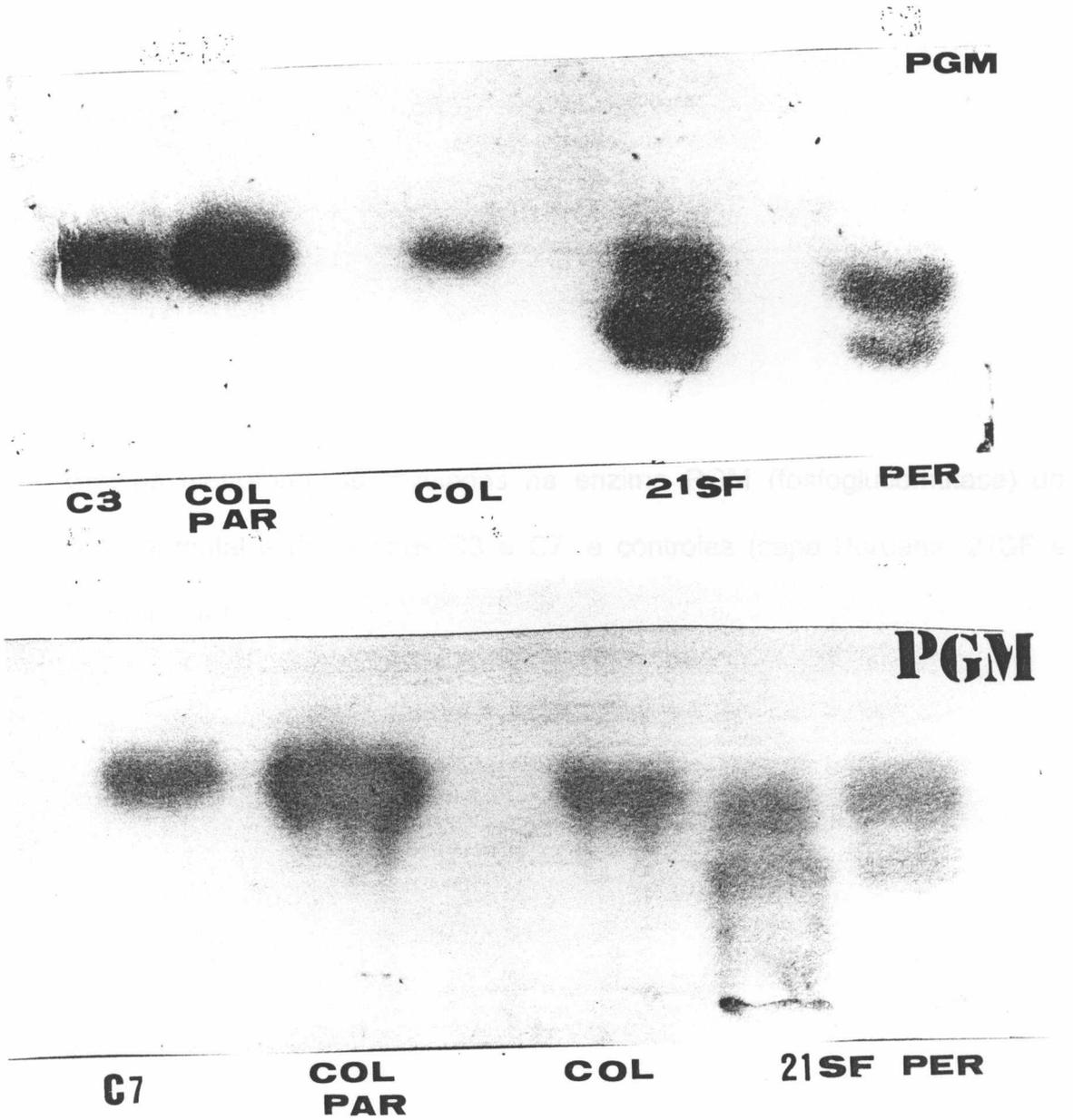


Fig.13. Bandas eletroforéticas reveladas na enzima PGM (fosfoglucomutase) da cepa parental e dos clones C3 e C7, e controles (cepa Peruana, 21SF e Colombiana)

Fig.14

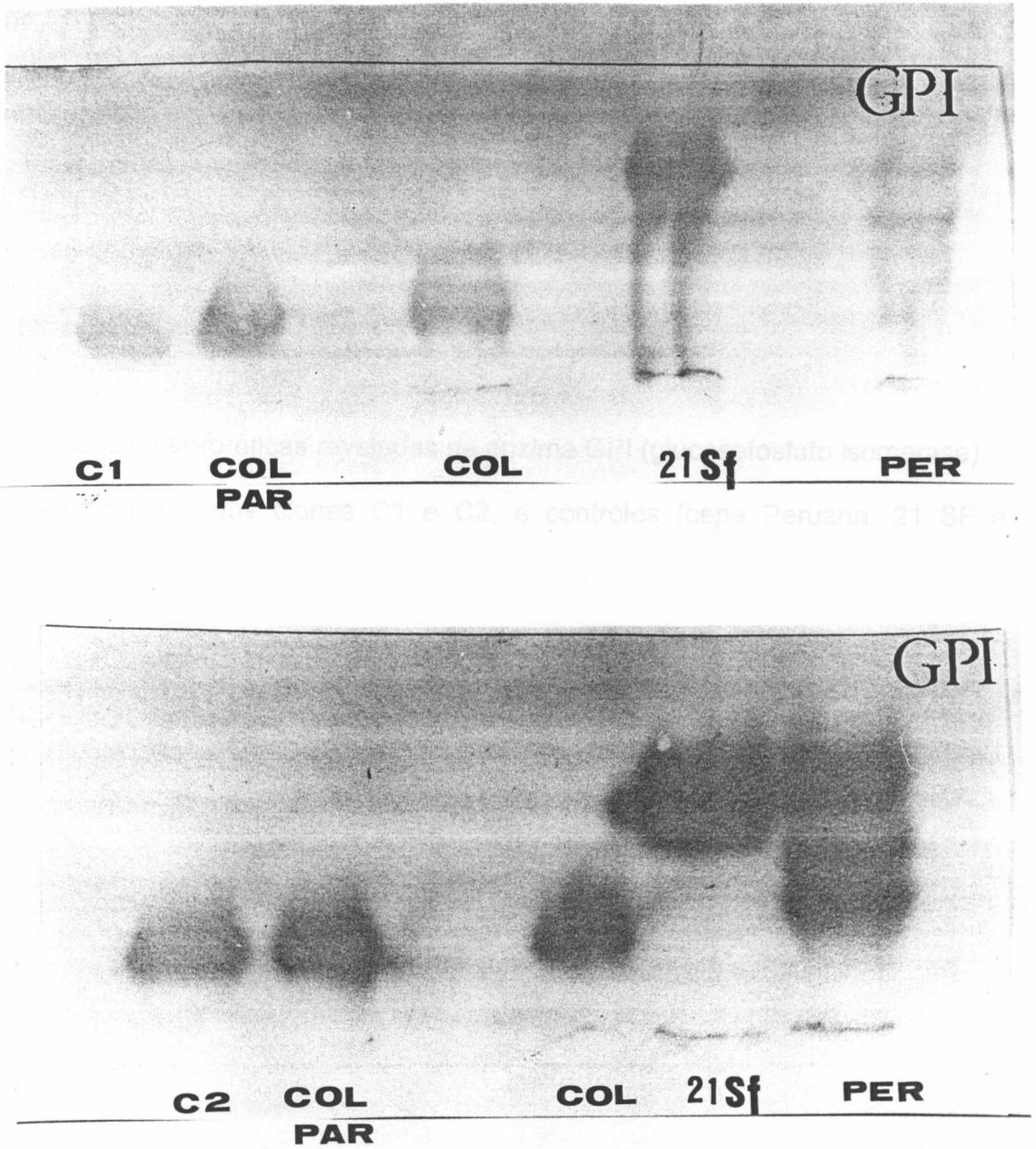


Fig.14 Bandas eletroforéticas reveladas na enzima GPI (glucosefosfato isomerase) da cepa parental e dos clones C1 e C2, e controles (cepa Peruana, 21 SF e Colombiana)

Fig.15

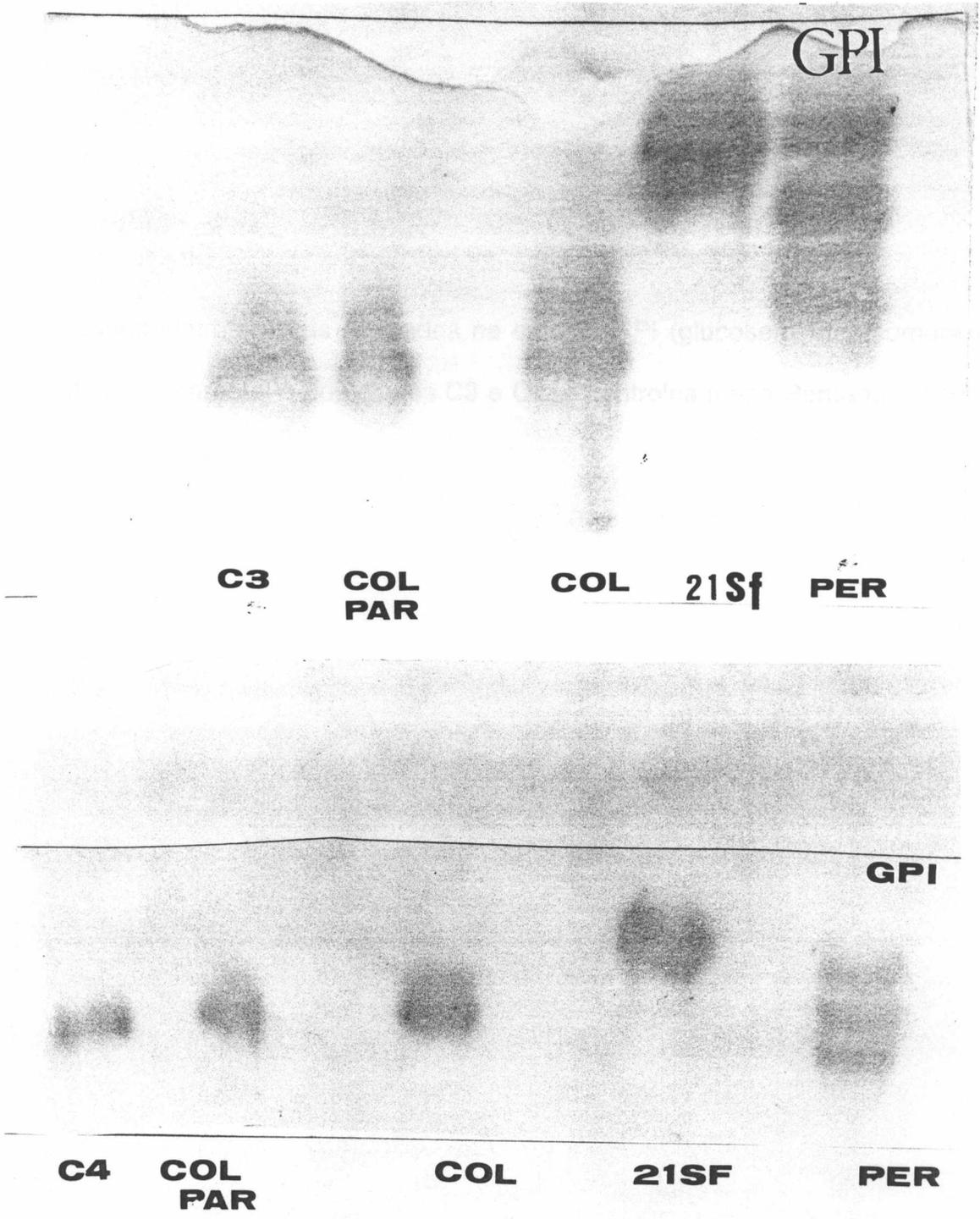
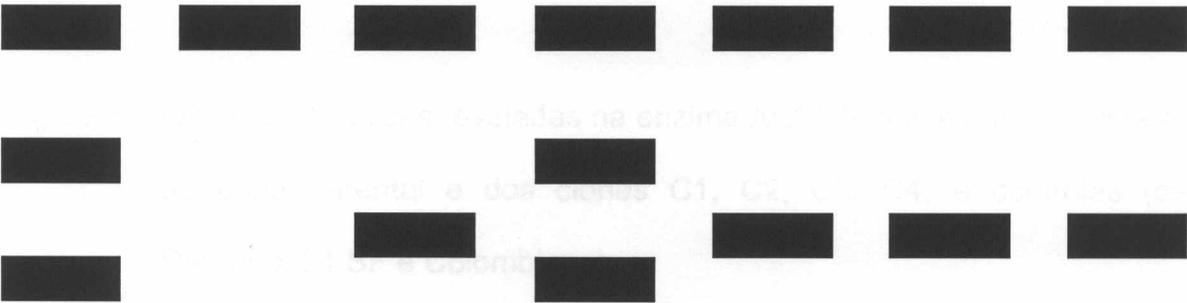


Fig.15 Bandas eletroforéticas reveladas na enzima GPI (glucosefosfato isomerase) da cepa parental e dos clones C3 e C4, e controles (cepa Peruana, 21 SF e Colombiana)

Fig.16

ALAT



Per

21 SF

Col
Parental

CI-Col-C1

CI-Col-C2

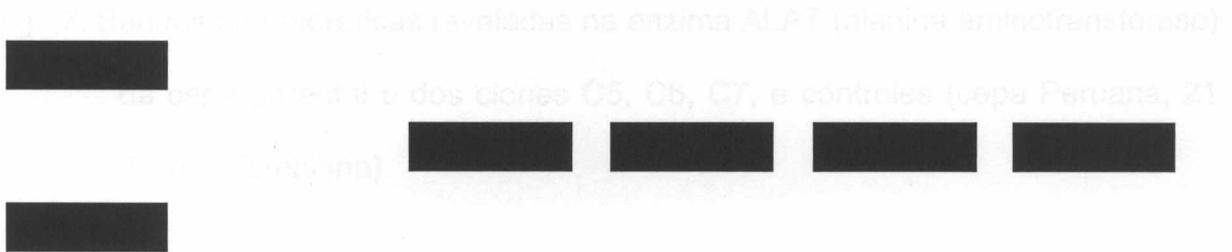
CI-Col-C3

CI-Col-C4

Fig.16. Bandas eletroforéticas reveladas na enzima ALAT (alanina aminotransferase) da cepa parental e dos clones C1, C2, C3, C4, e controles (cepa Peruana, 21 SF e Colombiana)

Fig17.

ALAT



Per

21 SF

Col
Parental

Cl-Col-C5

Cl-Col-C6

Cl-Col-C7

Fig.17. Bandas eletroforéticas reveladas na enzima ALAT (alanina aminotransferase) da cepa parental e dos clones C5, C6, C7, e controles (cepa Peruana, 21 SF e Colombiana)

Fig.18

ASAT



Fig.18. Bandas eletroforéticas reveladas na enzima ASAT (aspartato aminotransferase) da cepa parental e dos clones C1, C2, C3, C4, e controles (cepa Peruana, 21 SF e Colombiana)

Fig.19

ASAT

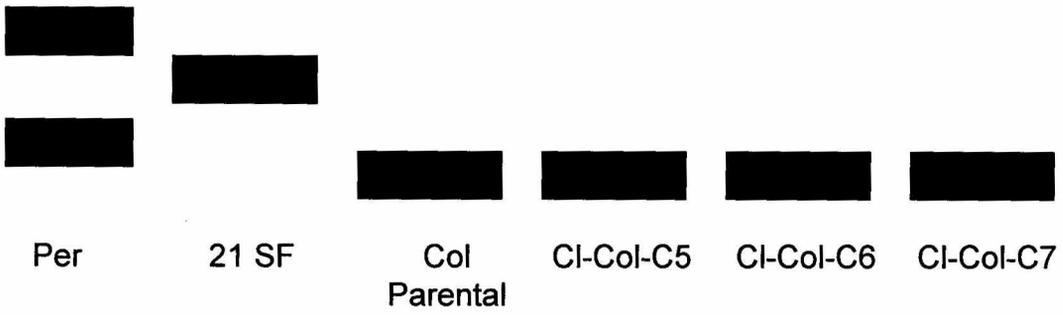


Fig.19 Bandas eletroforéticas reveladas na enzima ASAT (aspartato aminotransferase) da cepa parental e dos clones C5, C6, C7, e controles (cepa Peruana, 21 SF e Colombiana).

ANEXO VII- Pranchas (Histopatologia)

Fig. 20

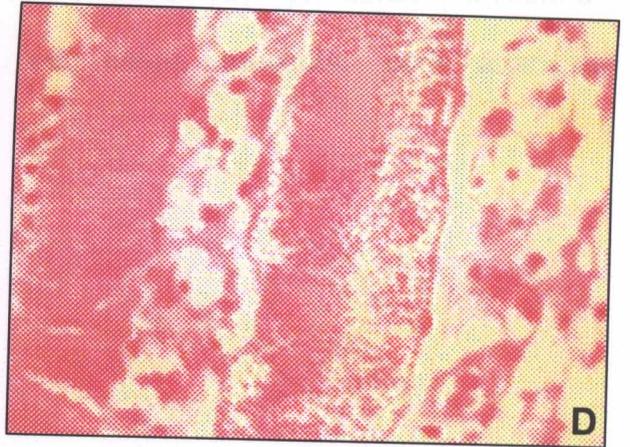
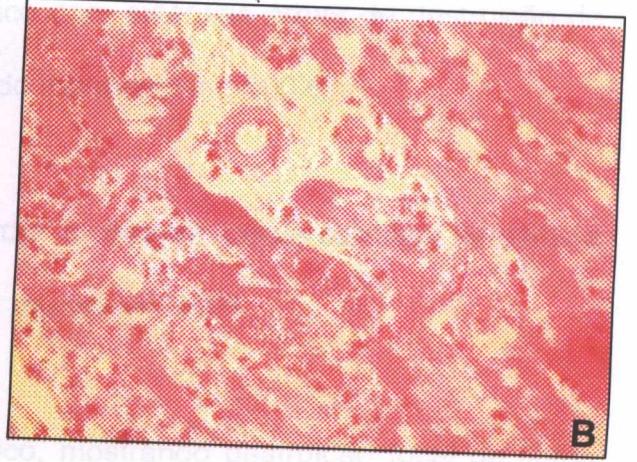
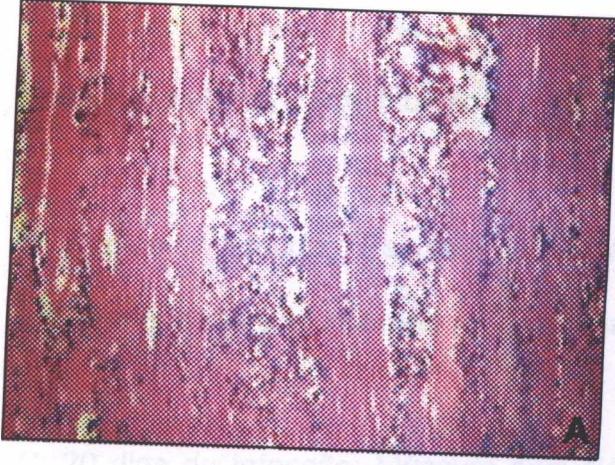


Fig 20. Camundongos controles infectados com a cepa Colombiana parental.

A: 20 dias de infecção: Músculo esquelético com extensas áreas de destruição de fibras musculares e substituição por infiltrado mononuclear. 100X;

B: 20 dias de infecção: Secções de miocárdio, mostrando célula cardíaca parasitada e difuso e moderado infiltrado mononuclear intersticial. 250X;

C: 20 dias de infecção: Músculo esquelético, mostrando destruição focal de fibras musculares, denso infiltrado mononuclear intersticial 400X;

D: 30 dias de infecção: Extensa área de destruição de fibras musculares, observando grande ninho parasitário em célula muscular com avançada desintegração citoplasmática. 400X.

Fig. 21

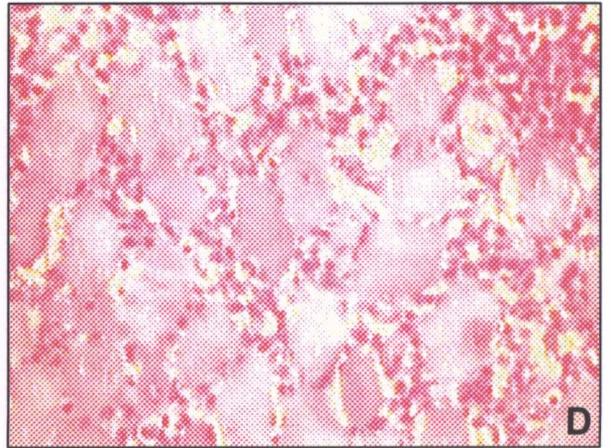
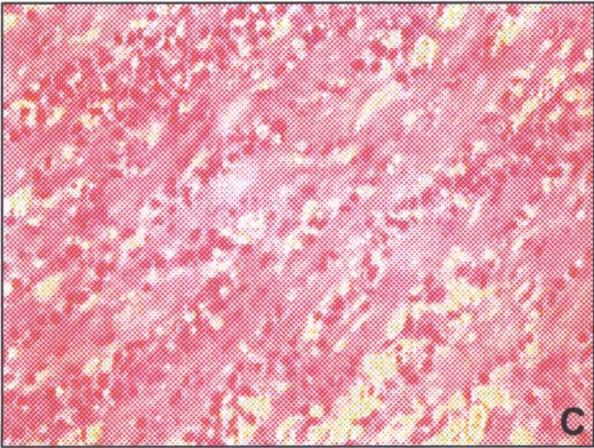
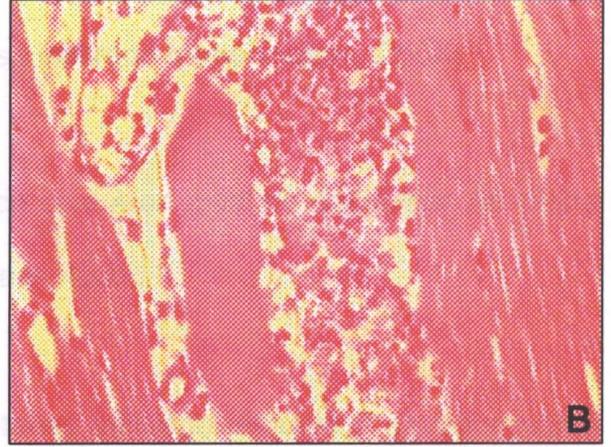
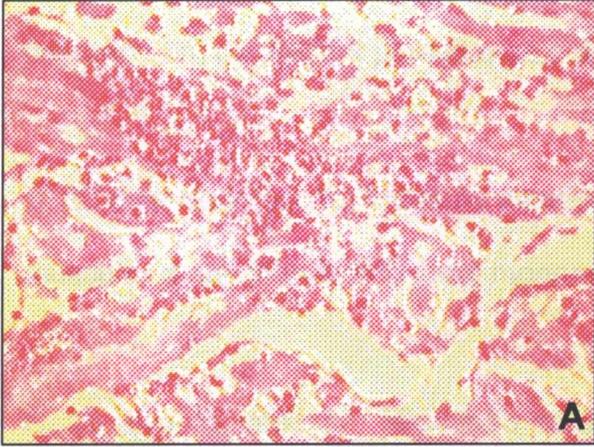


Fig. 21- Camundongos infectados com o clone C1.

A: 20 dias de infecção: Miocárdio com extensas áreas de necrose de fibras parasitadas, observando-se densos infiltrados focais de polimorfonucleares, de permeio com os detritos parasitários e difuso infiltrado mononuclear. 250X;

B: 20 dias de infecção: Músculo esquelético com área focal de destruição de célula muscular e denso infiltrado focal mononuclear. 400X;

C: 25 dias de infecção: Miocárdio com intenso infiltrado intersticial mononuclear e presença de ninhos parasitários intracelulares. 250X;

D: 25 dias de infecção: Músculo esquelético com denso e difuso infiltrado mononuclear intersticial.250X

Fig. 22

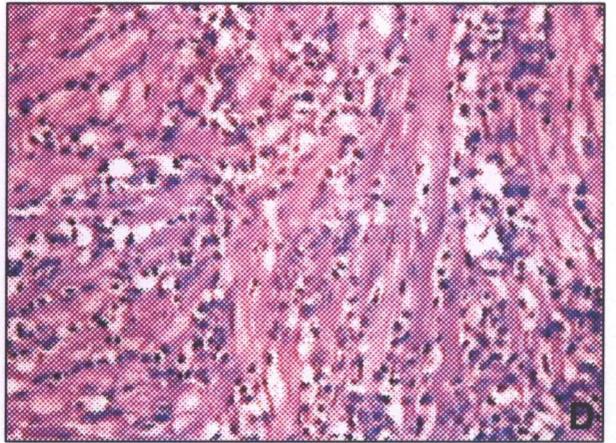
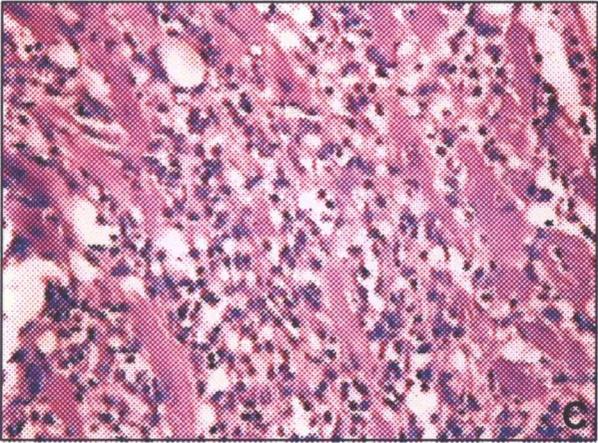
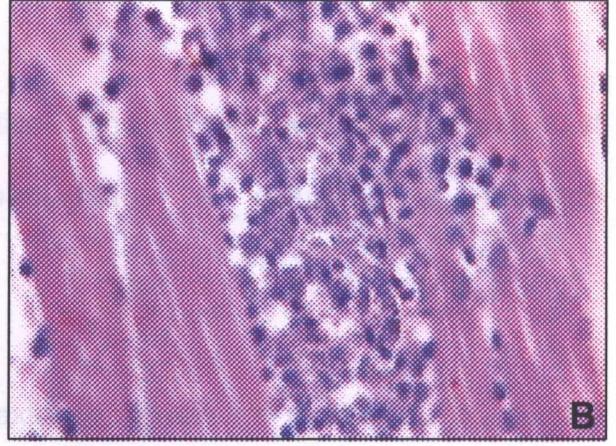
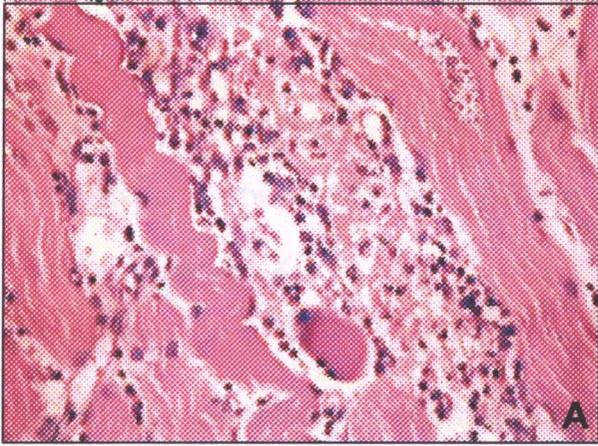


Fig. 22 : Camundongos infectados com o clone C2.

A: 25 dias de infecção: Músculo esquelético mostrando extensa lesão necrótica de fibra muscular, com detritos celulares e infiltrado mononuclear. Hialinização de fibra muscular não parasitada e presença de ninho parasitário sem reação. 250X;

B: 25 dias de infecção: Músculo esquelético com necrose focal de fibra muscular parasitada, observando-se detritos parasitários e celulares e infiltrado mononuclear.400X

C: 30 dias de infecção: Miocárdio com extensas áreas de destruição de células cardíacas e substituição por infiltrado mononuclear intenso. 250X

D: 30 dias de infecção: Miocárdio com acentuado e difuso infiltrado mononuclear intersticial. 250X.

Fig. 23

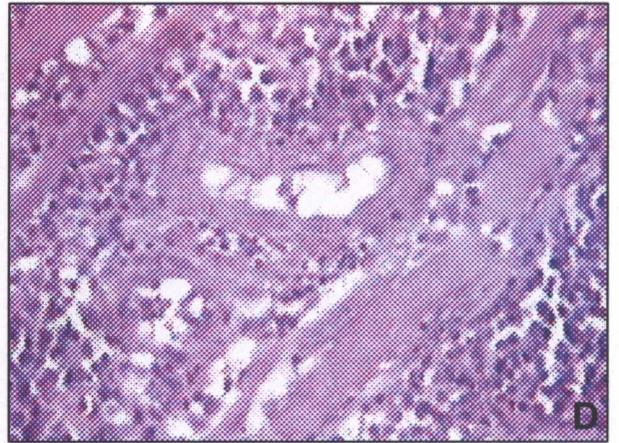
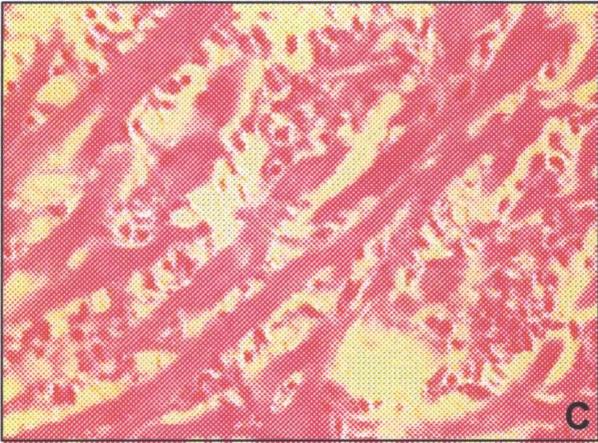
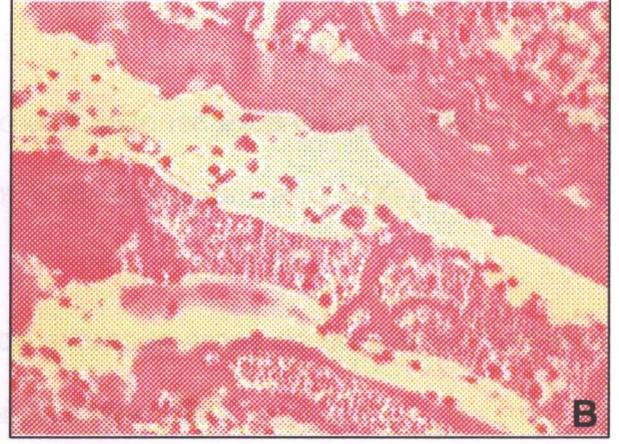
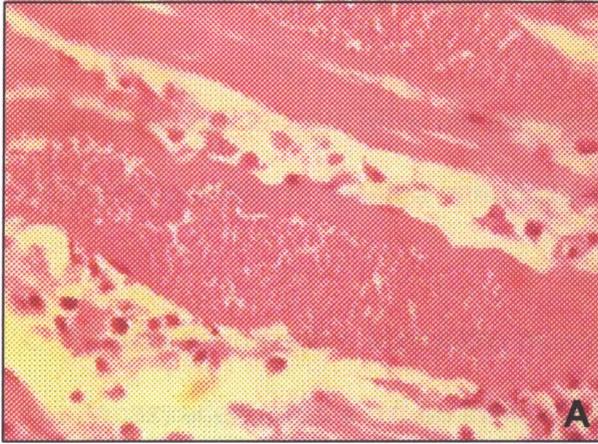


Fig. 23- Camundongos infectados com o clone C3.

A: 20 dias de infecção: Músculo esquelético com volumosos ninhos parasitários no interior de fibras musculares, edema intersticial e denso infiltrado mononuclear. 400X;

B: 20 dias de infecção: Músculo esquelético com extensa área de destruição de fibra muscular parasitada, edema intersticial e infiltrado mononuclear. 250X;

C: 20 dias de infecção: Miocárdio mostrando extensas áreas de destruição de fibras cardíacas, acentuado e difuso infiltrado mononuclear. 250X;

D: 30 dias de infecção: Músculo esquelético com extensa destruição de fibras musculares e denso infiltrado mononuclear intersticial e peri-arteriolar.400X.

Fig. 24

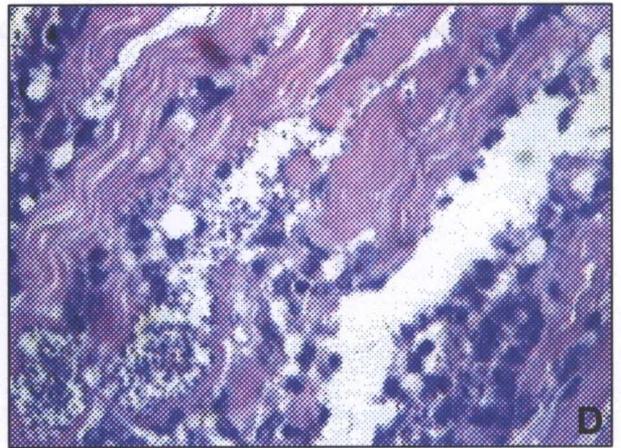
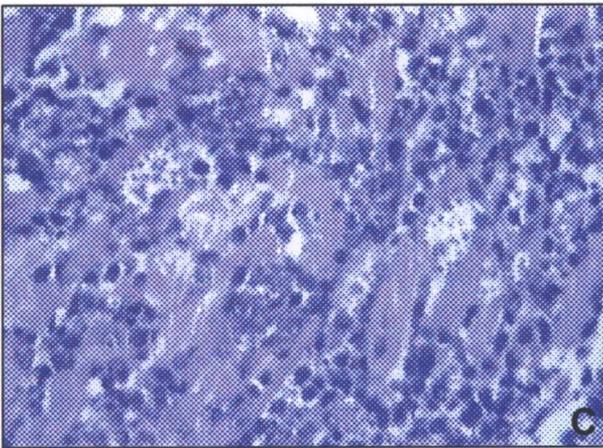
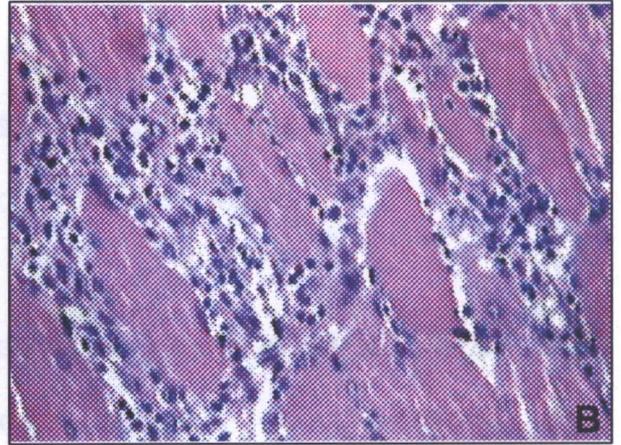
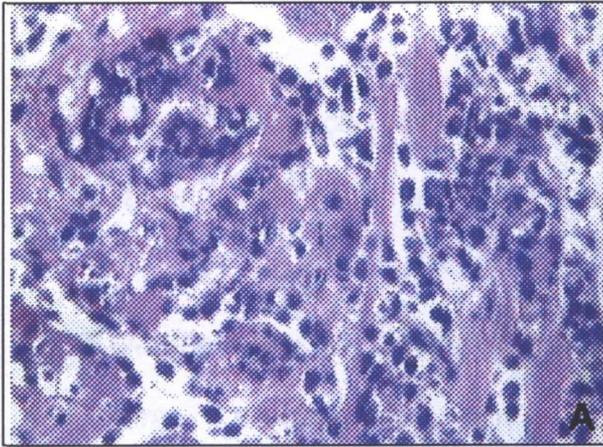


Fig. 24. Camundongos infectados com o clone C4.

A: 20 dias de infecção: Miocárdio com lesões focais de destruição de fibras parasitadas, com densos infiltrados de polimorfonucleares neutrófilos e difuso infiltrado intersticial mononuclear. 250X;

B: 20 dias de infecção: Músculo esquelético com áreas de destruição de fibras musculares e substituição por infiltrados mononucleares. 450X;

C: 25 dias de infecção- Miocárdio com parasitos intracelulares e áreas de destruição de fibras parasitadas, com densos infiltrados mononucleares, com polimorfonucleares. 250X;

D: 25 dias de infecção: Músculo esquelético com grande ninho parasitário e áreas focais de destruição de fibras musculares, com denso infiltrado mononuclear. 400X.

Fig. 25

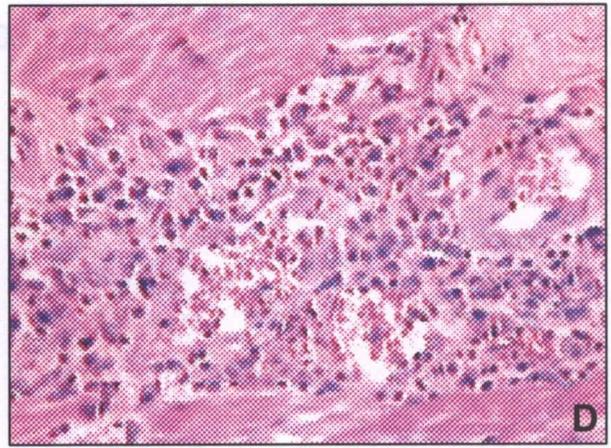
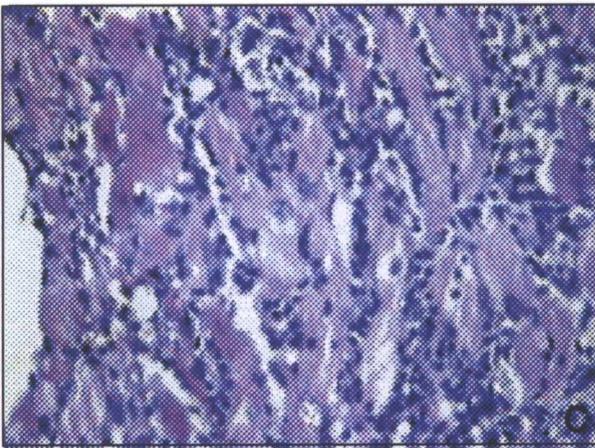
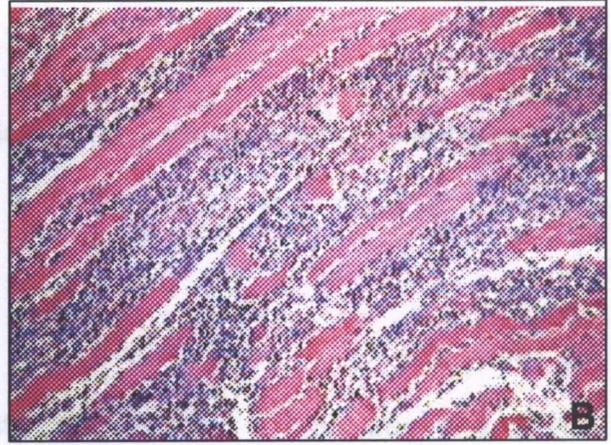
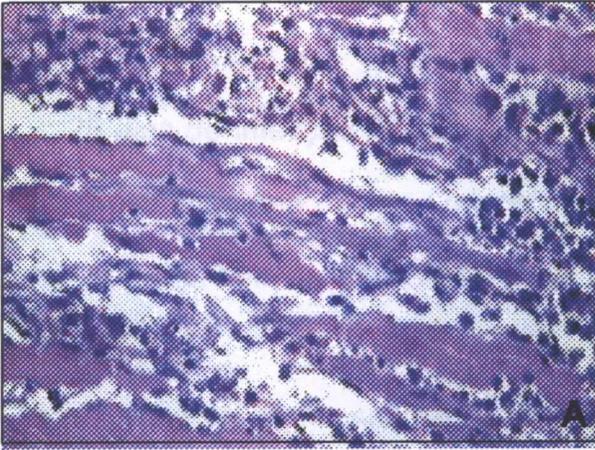


Fig. 25. Camundongos infectados com o clone C5.

A: 20 dias de infecção: Miocárdio com extensas áreas de destruição das fibras cardíacas, densos infiltrados intersticiais de mononucleares e proliferação fibroblástica. 250X;

B: 25 dias de infecção: Músculo esquelético; vista geral mostrando extensas áreas de destruição de fibras miocárdicas e substituição por densos infiltrados mononucleares intersticiais. 100X;

C: 30 dias de infecção- Miocárdio mostrando necrose e hialinização de fibras cardíacas e densos infiltrados mononucleares intersticiais. 250X;

D: 30 dias de infecção- Músculo esquelético mostrando intenso infiltrado mononuclear intersticial e perivascular. 400X.

Fig. 26

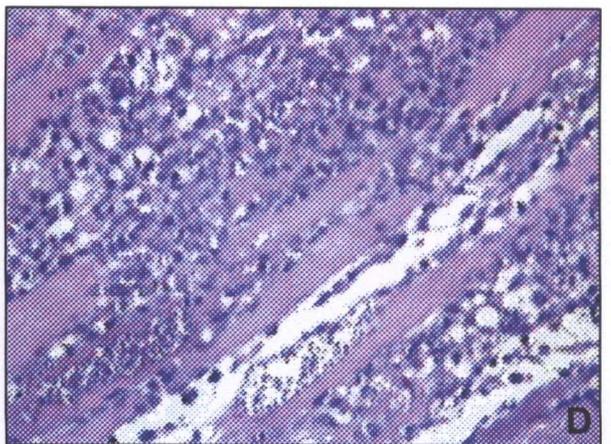
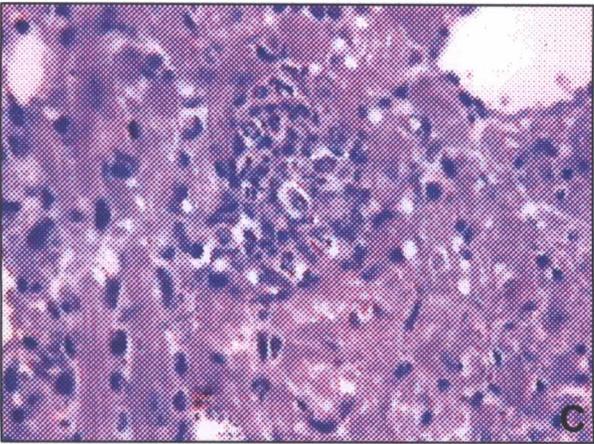
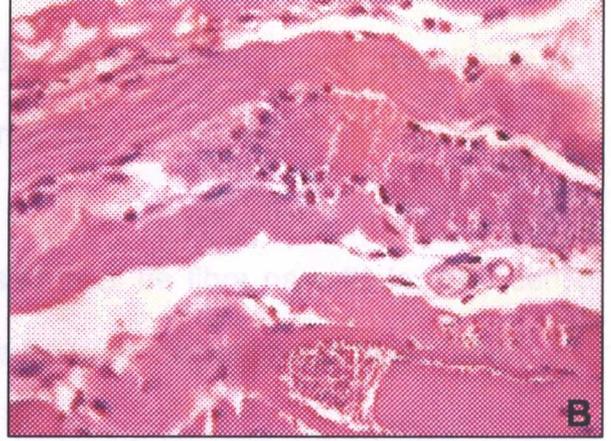
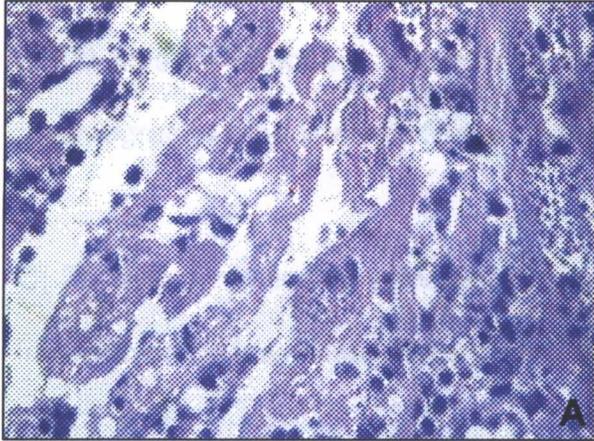


Fig. 26. Camundongos infectados com o clone C6.

A: 20 dias de infecção: Miocárdio com células cardíacas parasitadas em diferentes graus de degeneração; necrose e focos de infiltrado mononuclear. 250X;

B: 20 dias de infecção- Músculo esquelético com grandes ninhos parasitários em desintegração e necrose de fibras musculares. 400X;

C: 20 dias de infecção: Miocárdio com lesão focal de fibra parasitada, com denso infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos e infiltrado mononuclear difuso. 250X;

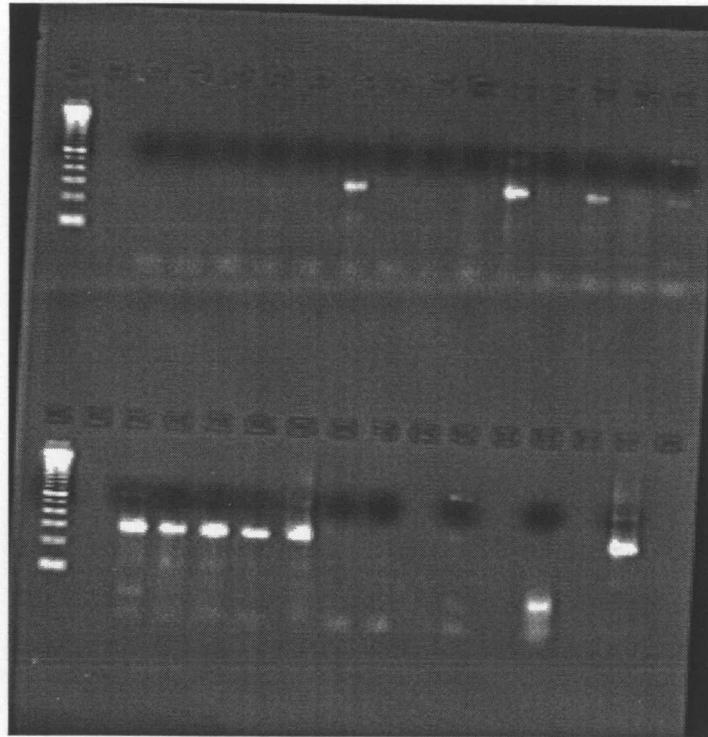
D: 20 dias de infecção: Músculo esquelético com extensas áreas de destruição de fibras musculares parasitadas e densos infiltrados de mononucleares e de polimorfonucleares. 250X.

ANEXO VIII - Pranchas (PCR)

Fig. 27

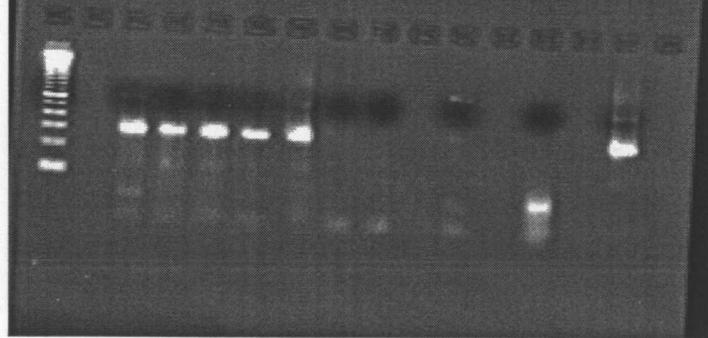
M 2 4 5 6 9 10 12 13 14 15 34 35 65 66

A
110 bp



B

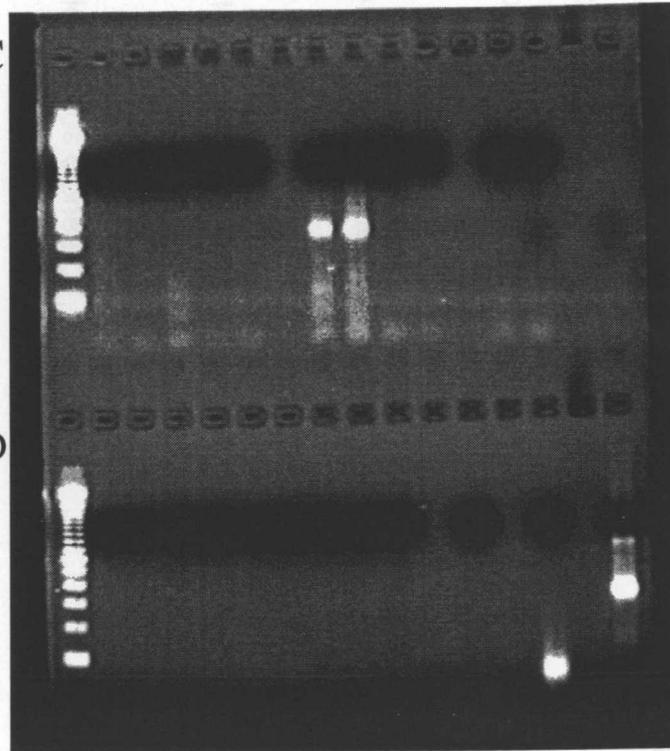
M 67 68 69 70 71 72 73 H₂O NB Tc+



M 19 20 21 22 23 8 11 17 18

C

330 bp



D

M 24 25 26 27 28 29 30 31 32 H₂O NB Tc+

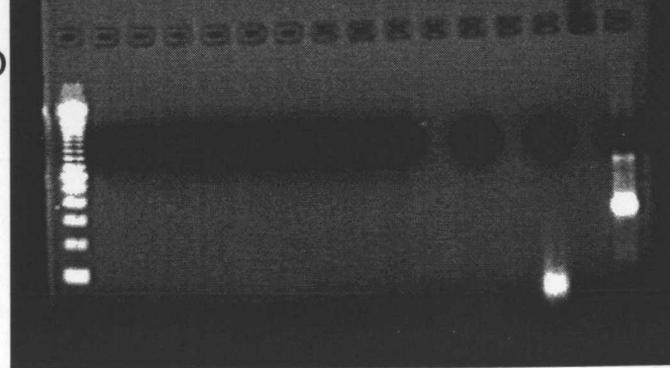


Fig. 27. Amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) de amostras* sanguíneas dos camundongos infectados pelos clones C1, C2, C3, C4, C5, C6, do *T. cruzi*, tratados com o Benzonidazol

A: Amplificação do kDNA dos clones C2, C7;

B: Amplificação do kDNA do clone C7 e controles positivo, negativo e água;

C: Amplificação do kDNA dos clones C1, C3, C4

D: Amplificação do kDNA do clone C5

* Os números das amostras de DNA extraídos do sangue de camundongos infectados, estão indicados na parte superior e inferior das figuras

M: Marcador LADDER de 100 pares de bases

Fig. 28

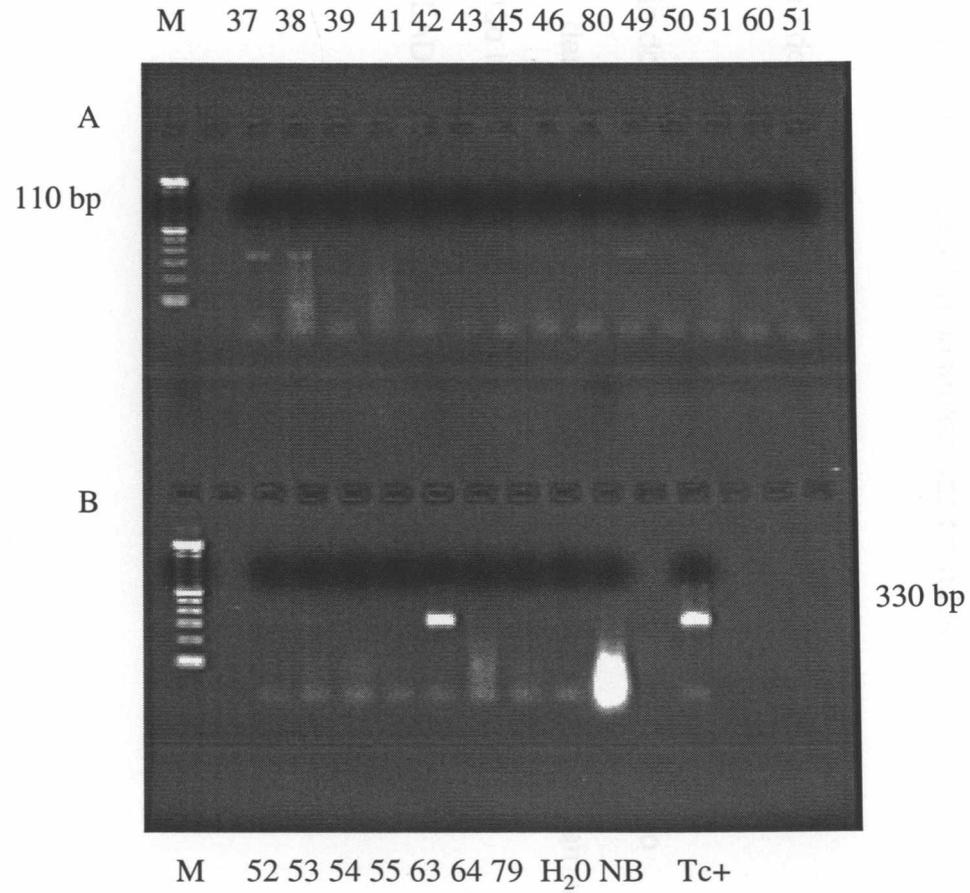


Fig. 28. Amplificação do DNA do cinetoplasto de amostras* sanguíneas dos camundongos infectados com a cepa Colombiana parental do *T.cruzi* com o clone C6, tratados com o Benzonidazol, e controles não tratados

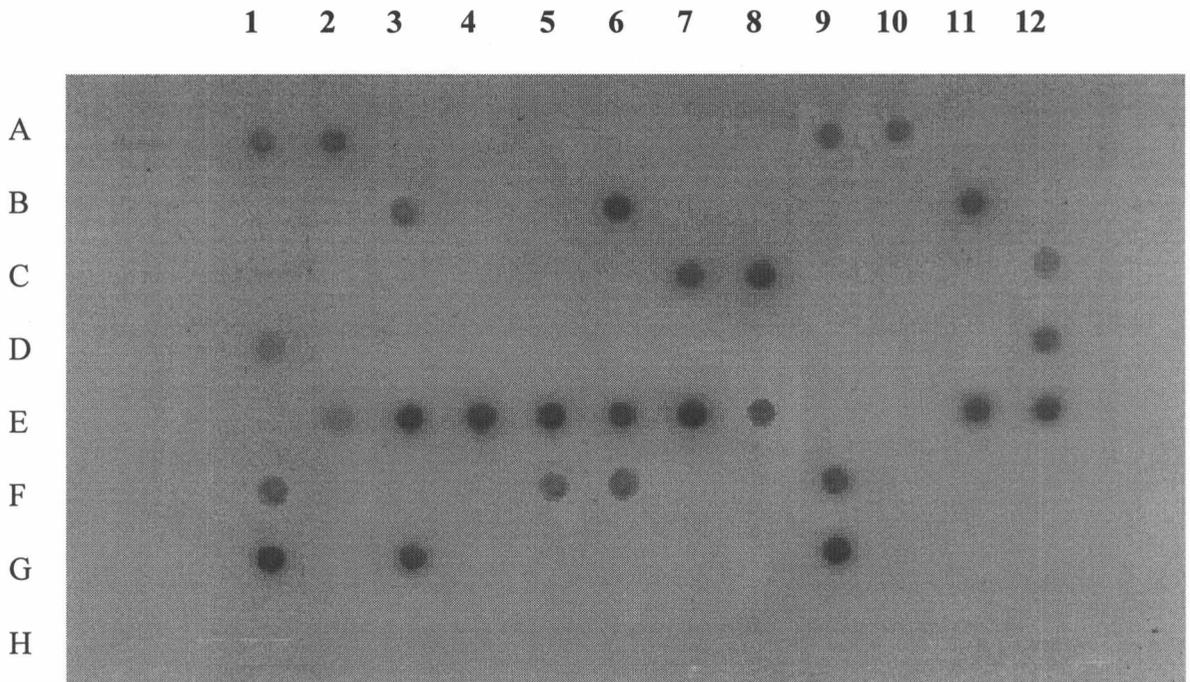
A: Amplificação do kDNA da Cepa Colombiana do *T. cruzi*;

B: Amplificação do kDNA do clone C6, água, controles negativo e positivo

* O número das amostras de DNA, extraídos do sangue de camundongos infectados, estão indicados na parte superior e inferior da figura

M - Marcador LADDER de 100 pares de bases

Fig. 29



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	Col	C6	Col	Col	Col
B	Col	C6	C6	C6	C1	C6	C6	C6	H ₂ O	CN	CP	X
C	C1	C1	C1	C1	C1	X	C3	C3	C3	C3	C4	C4
D	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	H ₂ O	CN	CP
E	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7
F	C7	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
G	C2	C2	C2	X	H ₂ O	X	CN	X	CP	X	X	C4
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Hibridização pelo dot-blot, com as amostras de sangue de camundongos infectados com clones e cepa parental do *T. cruzi*, tratados com Benzonidazol e não tratados, e controles positivos provenientes de cultura, utilizando a sonda P67, que corresponde à região mini-repetida conservada do minicírculo do kDNA.

C- Clone positivo; C- Clone negativo; CP- Controle positivo (cultura do *T. cruzi*); Col- Cepa parental tratada, positiva; Col- Cepa parental não tratada, negativa; Col- cepa parental tratada negativa; CN- Controle negativo; X- sem amostra

Anexo IX - Substâncias químicas das reações de isoenzimas

1. PGM

1.1. Solução estoque para o tampão do eletrodo

1.2. Substâncias:

- Tris \Rightarrow 0,5 M \Rightarrow pH 7,4
- Ácido maléico \Rightarrow 0,5 M
- EDTA Na₂ 2H₂O \Rightarrow 0,05 M
- Água DDD q.s.p \Rightarrow 1litro

1.3. Tampão do eletrodo: Tris / maleato \Rightarrow 0,15 M \Rightarrow pH= 7,4

1.4.. Tampão do gel: Tris/ Maleato 0,15 M pH 7,4 (1/10 do tampão do eletrodo)

1.5. Gel de amido:

- Starch-gel hydrolized potato Sigma

1.6. Condições de eletroforese: 150 V , 20 mA

1.7. Tempo de migração: 2 horas

1.8. Revelador:

1.8.1. Substâncias usadas

- Tris/ HCl 0,3 M pH 7,4 \Rightarrow 100 mM
- Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 0,5 M \Rightarrow 10,00 mM
- β - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato (β -NADPNa.4 H₂O)
- α -D-glucose.1P 132 mM \Rightarrow 5,45 mM
- Glucose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) \Rightarrow 0,30 U/ml
- Metil-tiazolil- tetrazólio (MTT) 18 mM \Rightarrow 0,36 mM
- Fenazina-meta-sulfato (PMS) 3,26 mM \Rightarrow 0,03 mM
- Ágar 1,2% a 65 °C \Rightarrow 0,6%

2. GPI

2.1. Solução estoque para o tampão do eletrodo

Substâncias

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \Rightarrow 0,5 \text{ M}$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \Rightarrow 0,5 \text{ M}$

2.2. Tampão do eletrodo $\Rightarrow 0,2 \text{ M} \Rightarrow \text{pH} = 7,4$

Tampão do gel: tampão fosfato $\Rightarrow 0,015 \text{ M} \Rightarrow \text{pH} 7,4$ (3/40 do tampão do eletrodo)

2.3. Gel de amido

- Starch-gel hydrolized potato Sigma

2.4. Condições de eletroforese: 150 V , 20 mA

2.5. Tempo de migração: 2 horas

2.6. Revelador

2.6.1. Substâncias usadas

- Tris/HCl 0,3M pH 8,5 $\Rightarrow 100\text{mM}$
- β - Nicotinamida- Adenina- Dinucleotídeo-Fosfato (β -NaDP 4 H₂O)
- Cloreto de magnésio (MgCl_2) $\Rightarrow 12,2 \text{ mM}$
- D- Frutose- 6- Fosfato (D-frutose 6P) 67,2 mM $\Rightarrow 1,34 \text{ mM}$
- Glucose-6-Fosfato- Desidrogenase (G6PD) 3750 U/ml $\Rightarrow 0,60 \text{ U/ ml}$
- Ágar 1,2% a 65 °C $\Rightarrow 0,6\%$
- Metil- Tiazolil- Tetrazólio (MTT) 0,36 mM $\Rightarrow 0,03 \text{ mM}$
- Fenazina- Metil Sulfato (PMS) 3,26 mM $\Rightarrow 0,03 \text{ mM}$

3. ALAT

Solução tampão do eletrodo

3.1. Substâncias usadas

- Tris/ citrato \Rightarrow 0,15 M pH 9,0

- água DDD q.sp \Rightarrow 1 litro

3.2. Tampão do gel: (1/10 do tampão do eletrodo) 0,015 M \Rightarrow pH 9,0

3.3. Gel de amido

- Starch-gel hydrolized potato Sigma

3.4. Condições de eletroforese: 300V 6mA

3.5.. Tempo de migração: 1h e 30 min

3.6. Revelador

3.6.1.. Substâncias usadas

- Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 \Rightarrow 100,0 mM

- β - Nicotinamida- adenina- Dinucleotídeo (β -NADPH Na₂) \Rightarrow 3,0mg

- α - ceto-glutarato \Rightarrow 9,91 mM

Lactato desidrogenase em glicerol (LDH) 50% a 4.500 U/ml \Rightarrow 15 U/ ml

- L-alanina \Rightarrow 224,5 mM

4. ASAT

4.. Solução tampão do eletrodo

Substâncias usadas

- Glicina/ NaOH \Rightarrow 0,15 M pH 9,5

- Água DDD q.s.p \Rightarrow 1litro

5.2. Tampão do gel: 1/10 do tampão do eletrodo

5.3. Gel de amido

- Starch-gel hydrolized potato Sigma

5.4. Condições de eletroforese: 300V 6 mA

5.5. Tempo de migração: 1 h

5.6. Revelador

5.6.1. Substâncias usadas

- Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 \Rightarrow 100 mM

- β - Nicotinamida- Adenina- Dinucleotídeo (β - NADH Na₂) \Rightarrow 0,705 mM

- α - ceto-glutarato \Rightarrow 9,91 mM

- Malato desidrogenase em glicerol 50 % (MDH) a 4.500 U/ml \Rightarrow 4,37

U/ml

- Ácido aspártico \Rightarrow 28,80 Mm