

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – CPQGM**  
**LABORATÓRIO DE CHAGAS EXPERIMENTAL, AUTOIMUNIDADE E**  
**IMUNOLOGIA CELULAR**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E**  
**MEDICINA INVESTIGATIVA**

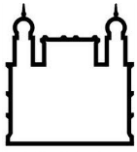
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA COM BENZONIDAZOL EM**  
**CAMUNDONGOS COM TRÍPLICE INFECÇÃO POR CLONES DA**  
**CEPA 21SF (SÃO FELIPE/ BAHIA) DO *Trypanosoma cruzi***

**MÔNICA CARDOZO REBOUÇAS**

**SALVADOR, BA – BRASIL**

**2012**



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – CPQGM**  
**LABORATÓRIO DE CHAGAS EXPERIMENTAL, AUTOIMUNIDADE E**  
**IMUNOLOGIA CELULAR**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E**

**MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA COM BENZONIDAZOL EM**  
**CAMUNDONGOS COM TRÍPLICE INFECÇÃO POR CLONES DA**  
**CEPA 21SF (SÃO FELIPE/ BAHIA) DO *Trypanosoma cruzi***

**MÔNICA CARDOZO REBOUÇAS**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Gumes Andrade**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

**SALVADOR, BA – BRASIL**

**2012**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Rebouças, Mônica Cardoso  
R292r Resposta à quimioterapia com benzonidazol em camundongos com tríplice  
infecção por clones da cepa 21SF (São Felipe/Bahia). do *trypanosoma cruzi*  
[manuscrito] / Mônica Cardosos Rebouças . - 2013.  
100 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

1.1.1

1.1.2 Dissertação ( Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de  
Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa, 2011.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sônia Gomes Andrade

1. Trypanosoma Cruzi 2. Cepa 21 SF 3. Modelo murino 4. Reinfecções 5.  
Benzonidazol I. Título.

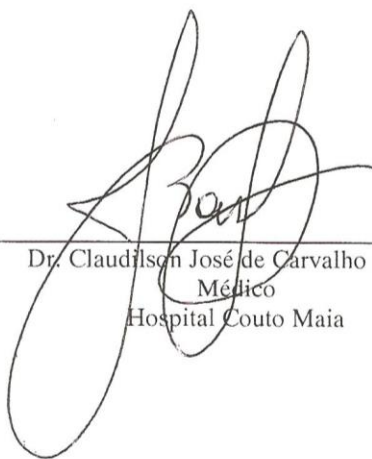
CDU 616.937

“RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA COM BENZONIDAZOL EM CAMUNDONGOS COM TRÍPLICE  
INFECÇÃO POR CLONES DA CEPA 21 SF (SÃO FELIPE/ BAHIA) DO *Trypanosoma cruzi*”

MÔNICA CARDOZO REBOUÇAS

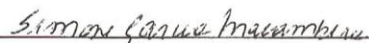
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



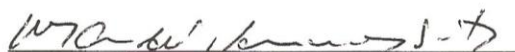
---

Dr. Claudilson José de Carvalho Bastos  
Médico  
Hospital Couto Maia



---

Dr. Simone Garcia Macambira  
Professor Adjunto  
UFBA



---

Dr. Marcos André vannier dos Santos  
Pesquisador Titular  
CPqGM / FIOCRUZ

"A fé desempenha em nossa vida um papel mais importante do que supomos, e é o que nos permite fazer mais do que pretendemos. Creio que aí está o elemento precursor de nossas ideias. Sem a fé não se teriam elaborado jamais hipóteses e teorias, nem se teriam inventado as ciências ou as matemáticas. Estou convencido de que a fé é um prolongamento do espírito: negar a fé é condenar-se e condenar o espírito que engendra todas as forças criadoras de que dispomos."

*Charlie Chaplin*

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Gildete e Liolino, que mesmo  
enfrentando muitas dificuldades,  
sempre valorizaram e priorizaram minha formação.

## **AGRADECIMENTOS À ÓRGÃOS E INSTITUIÇÕES**

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ;

Ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa/FIOCRUZ;

À FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia;

Ao LACEI - Laboratório de Chagas Experimental Autoimunidade e Imunologia Celular;

Ao LPBM – Laboratório de Patologia e Biologia Molecular;

Ao LAPEX – Laboratório de Patologia Experimental;

Ao Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz;

Ao Laboratório de Histotecnologia do CPqGM / FIOCRUZ;

À Biblioteca Interinstitucional Eurydice Pires de Sant´Anna – CPqGM /FIOCRUZ.

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Dra. Sonia Agradeço a confiança em mim depositada, além da orientação segura e objetiva no desenvolvimento deste trabalho. Por ter feito parte da sua equipe de trabalho e ainda por seu exemplo como pesquisadora;

À Prof. Dra. Rozália pela ajuda, carinho e formação desde o início;

Ao professor Juracy (*in memoriam*) pela oportunidade de ter sido sua aluna, exemplo de profissional o qual tenho muito carinho; e à Sra Fátima Magalhães, pelo convívio, conversas e ensinamentos;

Aos doutorandos Marcos Lazaro e Renata Portela pelas ajuda e conversas fundamentais durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos amigos e colegas do laboratório, em especial, Marcio Cerqueira, Lorena Magalhães, Isa Moraes, Gabriel Peleteiro e Beatriz Carvalho, pelo agradável convívio, tanto nas horas boas como nas difíceis, conversas, ajudas, companheirismo e colaboração em tantos momentos;

Aos colegas do LAPEX, Leonardo Cedraz e Thiago Landim, pelo ajuda nos experimentos; À Sr. Antônio pelo sorriso e alegria diário;

À Gilmar Ribeiro pela disposição em ajudar diversas vezes na reta final do trabalho;

A todos os professores que ministraram as disciplinas na Pós Graduação pelos ensinamentos durante o curso;

Aos funcionários do biotério e insetário por tornar possível à realização dos experimentos;

Aos funcionários Pescrino, Lia e Cláudio pela limpeza do laboratório;

A todos do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela atenção e auxílio no trato dos animais de experimentação;

À minha família, meus avós, tios e tias, primos e primas por estarem sempre presentes e torcerem por mim;

Agradeço em especial aos meus pais, Gildete e Liolino, pelo exemplo, apoio, incentivo e amor durante toda a minha vida, dedicação e pelo orgulho e felicidade que sempre demonstraram na realização das minhas conquistas. Obrigada por



acreditarem em mim e investirem na minha formação. Sem vocês, realmente, nada teria sido possível.

À minha irmã Mona pela responsabilidade, paciência, compreensão que permitiu a concretização deste trabalho;

Agradeço, com carinho muito especial, à Anderson, que esteve ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas que de uma forma ou de outra demonstrei total alegria... namorado, amigo e companheiro em todas as horas. Obrigada pela paciência, apoio, compreensão, amor e cumplicidade à todo tempo;

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, de alguma, forma me ajudaram a realizar este trabalho!

**REBOUCAS, Mônica Cardozo. Resposta à Quimioterapia com Benzonidazol em Camundongos com Tríplice Infecção por Clones da Cepa 21SF (São Felipe/Bahia) do *Trypanosoma cruzi*. 95 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.**

**RESUMO**

Populações que residem em áreas endêmicas da doença de Chagas são submetidas a múltiplas infecções pelo *Trypanosoma cruzi* e podem estar infectadas com cepas ou clones com diferentes graus de virulência e susceptibilidade à quimioterapia. Este é um fator importante para o desenvolvimento e morbidade da doença. As cepas de *Trypanosoma cruzi* representam complexas populações multiclonais, homogêneas ou heterogêneas, com predominância de um clone principal. São biologicamente classificados em Biodemas (Tipos I, II e III) que apresentam diferentes graus de resistência à quimioterapia. Cepas do Tipo I são muito suscetíveis ao tratamento; cepas do Tipo II possuem uma média susceptibilidade (cepa 21SF); cepas de Tipo III são muito resistentes (cepa Colombiana). No presente estudo, é avaliado o resultado do tratamento de camundongos triplamente infectados com clones da cepa 21SF, em comparação com os infectados com a cepa parental. 50 camundongos foram infectados com a cepa 21SF (infecção única). O inóculo foi de  $5 \times 10^4$  formas tripomastigotas sanguícolas. 80 camundongos foram infectados, sucessivamente, com 3 clones da cepa 21SF (C6, C7 e C8), inóculo:  $1 \times 10^4$  formas tripomastigotas (infecção tripla). A infecção simples com cada clone também foi feita. Os camundongos de ambos os grupos foram divididos em dois subgrupos: tratados com Benzonidazol – BZ (100 mg/kg/dia - 60 doses) e controles não tratados. Após 60 dias do final do tratamento, os camundongos sobreviventes foram eutanasiados, por exsanguinação, pós-anestesia; o sangue foi coletado para o exame sorológico de imunofluorescência indireta; testes de cura foram realizados (parasitemia, xenodiagnósticos, hemocultura) e seções do coração e músculo esquelético foram coletadas, fixadas e processadas para o estudo histopatológico em cortes corados com Hematoxilina & Eosina. A PCR foi também usada como uma técnica diagnóstica complementar. Os testes parasitológicos mostraram uma positividade variando de 54,4% nos camundongos infectados com a cepa parental e tratados; 33,4 a 66,7% nos animais com infecção única pelos diversos clones e tratados e 26,7% nos camundongos com infecção tríplice, tratados. Os títulos sorológicos (TIFI) variaram de 1:20 a 1:280 nos infectados com cepa parental tratados com BZ e de 1:640 a 1:1280 para controles não tratados. Os títulos sorológicos na infecção única com cada clone variaram de 1:10 a 1:1280 em camundongos tratados e de 1:160 a 1:1280 nos controles não tratados. A PCR revelou positividade em todos os animais infectados, tratados. O resultado final foi obtido pela combinação dos testes parasitológicos com os títulos sorológicos revelando positividade de 6,6% nos camundongos infectados com a cepa parental e tratados; 0 a 18,2% nos animais com infecção única pelos diversos clones e tratados e 12% nos camundongos com infecção tríplice, tratados. Estudo histopatológico: Os camundongos infectados com a cepa parental apresentaram lesões que variavam de leves a moderadas, na maioria dos casos, predominante no miocárdio (animais tratados e controles não tratados) camundongos submetidos à infecção única por cada clone apresentaram lesões semelhantes aos demonstrados pela infecção com cepa parental. Os camundongos com infecção tripla apresentaram uma exacerbação de lesões, evoluindo para a miocardite crônica. Nestes casos, havia intensas lesões no músculo esquelético; animais tratados apresentaram uma nítida redução das lesões no miocárdio e no músculo esquelético. Os resultados da quimioterapia com Benzonidazol em animais triplamente infectados, considerando os testes parasitológicos e sorológicos, revelaram baixos índices de cura e agravamento das lesões tissulares nos camundongos submetidos a múltiplas infecções com clones obtidos da cepa 21SF.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, clones, cepa 21 SF, modelo murino, reinfecções, Benzonidazol, Quimioterapia.

**REBOUCAS, Mônica Cardozo. Response to Chemotherapy with Benzonidazol of Mice with Triple Infection with Clones of 21SF *Trypanosoma cruzi* Strain (São Felipe / Bahia). 95 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.**

**ABSTRACT**

People living in endemic areas of Chagas disease are submitted to multiple infections during their lives and could be infected with strains or clones with different virulence and susceptibility to chemotherapy. This is an important factor in the development and morbidity of the disease. Strains of *Trypanosoma cruzi* represent complex multiclonal populations, which can be homogeneous or heterogenous with predominance of a principal clone. The strains are biologically classified in different Biodemes (Types I, II and III) which disclose different degrees of resistance to chemotherapy. Type I strains are very susceptible to treatment; Type II strains disclose medium susceptibility (21SF strain); strains of Type III are very resistant (Colombian strain). The clones isolated from different strains can also present different degrees of resistance. In the present study the results of treatment of mice triple infected with clones of the 21SF strain is evaluated, in comparison with the infected with the parental strain. For the present study, 50 Swiss mice were infected with the 21SF strain (single infection). The inoculum was of  $5 \times 10^4$  blood trypomastigotes. 80 mice were infected successively with 3 clones of the 21SF strain (C6, C7 and C8) inoculum:  $1 \times 10^4$  trypomastigotes (triple infection). Single infection with each Clone was also done. The mice of both groups were divided into 2 sub-groups: treated with Benzonidazol –BZ (100mg/kg/day – 60 doses) and untreated controls. After 60 days of the end of treatment, surviving mice were killed by exsanguinations after anesthesia; the blood was collected for indirect immunofluorescence serological test; cure tests were performed (parasitemia, xenodiagnosis, haemoculture) and sections of the heart and skeletal muscle were collected, fixed and then processed for the histopathological study in sections stained with Hematoxilin end Eosin. PCR reaction was also performed in blood samples as a complementary diagnostic technique. Parasitological tests have shown positive results that varied from 54.4% for the group of mice infected with the parental strain and treated with BZ; 33.4 to 66.7% for the mice with single infection, with each clone, treated with BZ, and 26.7% with triple infection with the three clones, treated with BZ. Serology titers (IIFT) varied from 1:20 a 1:280 for the mice infected with parental strain treated with BZ and from 1:640 to 1:1280 for untreated controls. Serology titers in the single infection with each clone varied from 1:10 to 1:1280 in treated mice and from 1:160 to 1:1280 in the untreated controls. PCR reaction was positive in all the infected mice, treated. Parasitological tests combined with the sorological titers have shown a positivity of 6.6% for the mice infected with the parental strain and treated with BZ; 0 to 18.2% for the mice with single infection with each clone and treated an 12% for the mice with triple infection and treated with BZ. Histopathological examination revealed in mice infected with the parental strain, mild to moderate inflammatory lesions. Mice submitted to single infection with clones of the 21SF strain presented similar lesions to those determined by infection with parental strain. Mice with triple infection present an intensification of lesions, and evolution to a chronic myocarditis and intense lesions in skeletal muscle; Treated animals presented clear reduction of lesions in myocardium and in skeletal muscle. Results of chemotherapy with BZ in mice with triple infection with clones of the 21 SF *T. cruzi* strain, considering the results of parasitological and serological tests, revealed low cure rates and aggravation of tissue lesions in those animals submitted to triple infections with clones of the parental strain.

**Key-words:** *Trypanosoma cruzi*, clones, 21 SF strains, murine model, reinfections, Benznidazole, Chemotherapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Camundongos infectados com a cepa 21SF do *T. cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/kg/dia, e grupo controle não tratado. (A) Curvas das médias de parasitemia,  $p=0,009$  (Teste Mann Whitney). (B) Mortalidade Cumulativa (%),  $p=0.01$  (Teste Log-rank)..... 58
- Figura 2 Curvas das médias de parasitemia em camundongos infectados com clones da cepa 21SF do *T. cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/Kg/dia, e grupo controle não tratado. (A) Infecção com o clone 21SF-C6,  $p=0,002^*$ ; (B) Infecção o clone 21SF – C7,  $p=0,04^*$ ; (C) Infecção com o clone 21SF - C8\*,  $p=0,0001$  (\*Teste Mann Whitney)..... 61
- Figura 3 Mortalidade Cumulativa (%) em camundongos infectados com clones da cepa 21SF do *T. cruzi*, submetidos ao tratamento com Benzonidazol, 100mg/kg/dia, e controles não tratado. (A) Infecção com o clone 21SF-C6,  $p=0,049^*$ ; (B) Infecção o clone 21SF – C7,  $p=0,119^*$ ; (C) Infecção com o clone 21SF - C8\*,  $p=0,001^*$  (Teste Log-rank).....62
- Figura 4 Camundongos triplamente infectados com os clones 21SF - C6/C7/C8 do *T. cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/kg/dia, e controle não tratado. (A) Curvas das médias de parasitemia. (B) Mortalidade Cumulativa (%),  $p=0.45$  (Teste Log-rank).....65
- Figura 5 Amplificação pela PCR e revelação em gel de agarose: K-DNA das amostras dos animais tratados, com teste de cura parasitológica negativos, A: Infecção com a cepa 21SF e B: infecção tríplice, com clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF.....69
- Figura 6 Amplificação pela PCR e revelação em gel de agarose: K-DNA das amostras dos animais tratados, com teste de cura parasitológica negativos, de infecção única com clones da cepa 21SF. A: Infecção com 21SF-C6; B: Infecção com 21SF-C7; C: Infecção com 21SF-C8..... 70
- Figura 7 Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com a cepa 21SF, no 230º dia de infecção, controles não tratados (A e B) e tratados

com Benzonidazol (C, D, E e F), corados com H & E (400X). A: secção de átrio, com infiltrado mononuclear focal discreto; B: músculo esquelético com lesão inflamatória perivascular moderada; C: secção de átrio com lesões inflamatórias subepicárdicas focais discretas; D: seção de miocárdio com lesões inflamatórias, mononucleares, focais moderadas em ventrículo; E: arteriolite, em músculo esquelético, com acentuado infiltrado perivascular, mononuclear, com oclusão da luz; F: músculo esquelético com lesão inflamatória focal e área de substituição de fibra muscular por adipócito.....74

Figura 8 Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone C6 da cepa 21SF, no 230º dia de infecção, controles não tratados (A e B) e tratados com Benzonidazol (C e D), corados com H & E (400X). A: infiltrado inflamatório focal perivascular e subepicárdico discreto no miocárdio apresentando fibrose intersticial difusa; B: músculo esquelético mostrando feixe vâsculo-nervoso com infiltrado mononuclear, perivascular; C: átrio com discreto infiltrado inflamatório difuso e área de moderado infiltrado focal; D: musculo esquelético com áreas focais de necrose com calcificação..... 76

Figura 9 Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone C7 da cepa 21SF, no 230º dia de infecção, controles não tratados (A e B) e tratados com Benzonidazol (C e D), corados com H & E (400X). A: miocárdio apresentando infiltrados inflamatórios focais discretos, áreas de calcificação e presença de fibrose moderada, intersticial difusa; B: secção de átrio com fibrose intersticial difusa, predominando na região subepicárdica e infiltrado inflamatório focal; C: miocárdio com infiltrado intersticial discreto, difuso, em átrio, com moderada fibrose intersticial; D: secção de músculo esquelético, com ninho parasitário contendo formas amastigotas do *T. cruzi*..... 78

Figura 10 Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone C8 da cepa 21SF, no 230º dia de infecção, controles não tratados (A e B) e tratados com Benzonidazol (C e D), corados com H & E (400X). A: miocárdio com infiltrado inflamatório mononuclear, difuso e discreto, em átrio e moderado infiltrado focal subepicárdico; B: músculo esquelético apresentando infiltrado inflamatório intersticial discreto; C: átrio com infiltrado inflamatório mononuclear difuso e discreto, e focal moderado subepicárdico; D: músculo

esquelético apresentando área focal de necrose de fibra muscular com infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos..... 80

Figura 11 Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos triplamente infectados com os clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF, no 350º dia de infecção, controles não tratados, corados com H & E (400X). A: secção do miocárdio com difusa e discreta infiltração mononuclear e infiltrados focais subepicárdicos; B: secção de ventrículo mostrando fibras cardíacas com citoplasma homogêneo e acentuada eosinofilia (necrose hialina) e presença de depósito matricial intersticial denso e difuso; C: secção do músculo esquelético apresentando intenso infiltrado intersticial envolvendo feixe vâsculo-nervoso e destruição de fibras musculares; D: Feixe vascular com arterite e denso infiltrado periarteriolar em músculo esquelético.....82

Figura 12 Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos triplamente infectados com os clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF, no 350º dia de infecção, tratados com Benzonidazol, corados com H & E (400X). A: átrio com intenso infiltrado mononuclear focal e difuso; B: miocárdio com difuso e moderado infiltrado intersticial e discreto depósito matricial; C: área de destruição focal de fibras musculares substituída por intenso infiltrado mononuclear; D: fibras musculares com desagregação das fibras musculares, substituídas por infiltrado inflamatório intersticial e infiltração adiposa.....83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Mudanças em alguns parâmetros epidemiológicos após a interrupção da transmissão da doença de Chagas, 1999-2006.....	29
Tabela 2 <i>Primers</i> utilizados na reação da PCR.....	53
Tabela 3 Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com a cepa 21SF do <i>T. cruzi</i> , tratados com Benzonidazol, 100 mg/kg/dia. ....	59
Tabela 4 Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com o clone C6 da cepa 21SF do <i>T. cruzi</i> , tratados com Benzonidazol, 100 mg/kg/dia.....	63
Tabela 5 Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com o clone C7 da cepa 21SF do <i>T. cruzi</i> , tratados com Benzonidazol, 100 mg/Kg/dia. ....	63
Tabela 6 Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com o clone C8 da cepa 21SF do <i>T. cruzi</i> , tratados com Benzonidazol, 100 mg/kg/dia.....	64
Tabela 7 Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com os clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF do <i>T. cruzi</i> , tratados com Benzonidazol, 100 mg/kg/dia. ....	67
Tabela 8 Titulação sorológica de camundongos triplamente infectados com 3 clones da cepa 21SF e camundongos infectados com a Cepa Parental 21SF do <i>T. cruzi</i> , ambos controles não tratados com Benzonidazol. ....	68
Tabela 9 Titulação sorológica de camundongos infectados com clones da Cepa 21SF do <i>T. cruzi</i> , controles não tratados com Benzonidazol. ....	68
Tabela 10 Resultado da positividade dos testes de cura parasitológicos e sorológicos em camundongos infectados com a cepa 21SF do <i>T. cruzi</i> e 3 clones, tratados com Benzonidazol.....	71

Tabela 11 Índices de cura em camundongos infectados com a cepa 21SF do *T. cruzi* e 3 clones, tratados com Benzonidazol, baseado na combinação dos testes parasitológicos e sorológicos. ....71



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALAT</b>	Alanina aminotransferase
<b>ASAT</b>	Aspartato amino-transferase
<b>C6</b>	Clone 6 da cepa 21SF
<b>C7</b>	Clone 7 da cepa 21SF
<b>C8</b>	Clone 8 da cepa 21SF
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética e pesquisa no uso de animais
<b>CPqGM</b>	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNTp's</b>	Desorribonucleotídeo trifosfatado
<b>ECO RI</b>	Enzima endonuclease isolada a partir de cepas de <i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>g</b>	Grama
<b>G6PD</b>	Glicose 6-fosfato desidrogenase
<b>GPI</b>	Glicose fosfatisomerase
<b>kDNA</b>	DNA do cinetoplasto
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliampère
<b>ME</b>	Enzima málica
<b>mg</b>	Miligrama
<b>Min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Salina Tamponada Fosfatada
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PGM</b>	Fosfoglugomutase
<b>Pmol</b>	Picomol
<b>RFLP</b>	Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto

<b>SDS</b>	Solução de dodecilsulfato de sódio
<b>SF</b>	São Felipe
<b>TAE</b>	Tampão Tris-Acetato-EDTA
<b>TBE</b>	Tampão Tris-Borato-EDTA
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar

# SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	23
2.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	27
2.1	HISTÓRICO da doença de chagas.....	27
2.2	EPIDEMIOLOGIA da doença de chagas .....	28
2.3	A DOENÇA DE CHAGAS.....	30
2.3.1	<b>Fase Aguda</b> .....	30
2.3.2	<b>Forma Indeterminada</b> .....	31
2.3.3	<b>Fase Crônica</b> .....	31
2.4	O <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	33
2.4.1	<b>Formas de transmissão da doença de Chagas</b> .....	34
2.4.1.1	<i>Transmissão vetorial</i> .....	34
2.4.1.2	<i>Transmissão transfusional</i> .....	34
2.4.1.3	<i>Transmissão congênita</i> .....	35
2.4.1.4	<i>Transmissão por via oral</i> .....	35
2.4.2	<b>Cepas do <i>T. cruzi</i></b> .....	35
2.4.2.1	<i>Biodemas</i> .....	35
2.4.2.2	<i>Zimodemas</i> .....	36
2.4.2.3	<i>Esquizodemas</i> .....	37
2.4.2.4	<i>Distintas Unidades Típicas (DTUs)</i> .....	38
2.4.3	<i>Caracterização da Cepa 21SF do Trypanosoma cruzi</i> .....	38
2.5	QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	39
2.5.1	<b>Critérios de cura</b> .....	41
3.	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	43
4.	<b>HIPOTESE DE INVESTIGAÇÃO</b> .....	44

5.	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
5.1	OBJETIVO GERAL.....	45
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
6.	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	46
7.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
7.1	CEPA DO <i>T. cruzi</i> .....	47
7.2	CLONagem DA CEPA 21sf DO <i>T. cruzi</i> .....	47
7.3	PASSAGENS E GRUPOS DOADORES .....	47
7.4	CÁLCULO DO INÓCULO .....	48
8.	<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b> .....	48
8.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	48
8.1.1	<b>Infecção tríplice com os clones da Cepa 21SF</b> .....	48
8.1.2	<b>Infecção com a Cepa Parental 21SF</b> .....	49
8.1.3	<b>Infecção com o clone 21SF – C6</b> .....	49
8.1.4	<b>Infecção com o clone 21SF – C7</b> .....	49
8.1.5	<b>Infecção com o clone 21SF – C8</b> .....	49
9.	<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	50
9.1	PARASITEMIA.....	50
9.2	MORTALIDADE.....	50
9.3	TRATAMENTO .....	50
9.4	EUTANÁSIA .....	51
9.5	CRITÉRIOS DE CURA .....	51
9.6	TESTES DE CURA PARASITOLÓGICOS .....	51
9.6.1	<b>Parasitemia</b> .....	51
9.6.2	<b>Xenodiagnóstico</b> .....	51
9.6.3	<b>Hemocultura</b> .....	52

9.7	PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) .....	52
9.7.1	<b>Obtenção do kDNA</b> .....	52
9.7.2	<b>Extração do DNA</b> .....	52
9.7.3	<b>Oligonucleotídeos sintéticos (<i>primers</i>)</b> .....	53
9.7.4	<b>Amplificação pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)</b> .....	53
9.7.5	<b>Eletroforese em gel de agarose</b> .....	53
9.8	EXAME SOROLÓGICO.....	54
9.9	ÍNDICE DE CURA DOS ANIMAIS TRATADOS COM BENZONIDAZOL .....	55
9.10	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO .....	55
10.	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	55
11.	<b>CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	56
12.	<b>RESULTADOS</b> .....	57
12.1	INFECÇÃO COM A CEPA 21SF .....	57
12.1.1	<b>Análise da Parasitemia</b> .....	57
12.1.2	<b>Índice de Mortalidade Cumulativa</b> .....	57
12.1.3	<b>Resultado dos testes de cura</b> .....	57
12.2	INFECÇÃO COM CLONES DACEPA 21SF .....	59
12.2.1	<b>Análise da Parasitemia</b> .....	59
12.2.2	<b>Índice de Mortalidade Cumulativa</b> .....	60
12.2.3	<b>Resultado dos testes de cura</b> .....	60
12.3	TRIPLICE INFECÇÃO COM CLONES DA CEPA 21SF .....	64
12.3.1	<b>Análise da Parasitemia</b> .....	64
12.3.2	<b>Índice de Mortalidade Cumulativa</b> .....	65
12.3.3	<b>Resultados dos testes de cura</b> .....	66
12.4	TITULAÇÃO SOROLÓGICA - CONTROLES .....	66
12.5	AMPLIFICAÇÃO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	69

12.6 ÍNDICES DE CURA.....	71
12.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	72
<b>12.6.1 Camundongos infectados com a cepa 21SF (parental), grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol.....</b>	<b>72</b>
12.6.1.1 <i>Grupo controle</i> .....	72
12.6.1.2 Grupo tratado com Benzonidazol .....	72
<b>12.6.2 Camundongos infectados com clones C6 da cepa 21SF, grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol.....</b>	<b>75</b>
12.6.2.1 Grupo controle.....	75
12.6.2.2 Grupo tratado com Benzonidazol .....	75
<b>12.6.3 Camundongos infectados com clones C7 da cepa 21SF, grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol.....</b>	<b>77</b>
12.6.3.1 Grupo controle.....	77
12.6.3.2 Grupo tratado com Benzonidazol .....	77
<b>12.6.4 Camundongos infectados com clones C8 da cepa 21SF, grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol.....</b>	<b>79</b>
12.6.4.1 Grupo controle.....	79
12.6.4.2 Grupo tratado com Benzonidazol .....	79
<b>12.7.8 Camundongos triplamente infectados com clones C6+C7+C8 da cepa 21SF, grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol .....</b>	<b>81</b>
12.6.4.3 Grupo controle.....	81
12.6.4.4 Grupo tratados com o Benzonidazol .....	81
13. <b>DISCUSSÃO</b> .....	84
14. <b>CONCLUSÕES</b> .....	89
15. <b>REFERÊNCIAS</b> .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o início das investigações sobre a Doença de Chagas, amostras do *T. cruzi* foram obtidas de casos humanos, de animais silvestres naturalmente infectados ou dos insetos vetores, as quais são mantidas em laboratório, através de passagem em animais suscetíveis ou por meio de cultura axênico. Estes tripomastigotas isolados passaram a ser designados pelos pesquisadores como “cepas”.

Estudos de comportamento biológico de cepas do *T. cruzi* realizados por ANDRADE et al. (1981), confirmam que cepas são populações multiclonais complexas e apresentam características genéticas e biológicas distintas, segundo o seu comportamento em hospedeiros vertebrados. Estudos avaliando o perfil molecular de cepas do *T. cruzi* (esquizodemas) estabeleceram que o *T. cruzi* é uma espécie heterogênea composta de várias subpopulações do parasito que circulam entre diferentes hospedeiros vertebrados, domésticos, silvestres e hospedeiros invertebrados. A caracterização de subpopulações de cepas do *T. cruzi* denominadas clones, vem sendo desenvolvida desde a década de 80 até os tempos atuais (MOREL et al., 1980; ENGEL et al., 1982; MOREL; ANDRADE, 1999; CAMANDAROBÁ et al., 2001).

A estrutura clonal para diferentes cepas do *T. cruzi* foi sugerida por TIBAYRENC et al. (1986) baseada na heterogeneidade do perfil isoenzimático e variação no padrão de zimodemas previamente estabelecidos por MILES et al. (1980). Baseados nesses dados TIBAYRENC e BRENIERE (1988) sugeriram que um número limitado de clones principais pode estar circulando em diferentes áreas geográficas.

O processo de isolamento de clones do *T. cruzi* a partir de sangue de animal infectado inicia-se com o método de diluição limitante em que placas de microtitulação devem conter um parasito por poço (DVORAK, 1985). Cada parasita isolado é considerado um clone e então é inoculada em camundongos recém-nascidos para obtenção de uma população homogênea que preserva suas características biológicas e bioquímicas (CAMPOS & ANDRADE, 1996).

Caracterização de subpopulações (clones e subclones) da cepa 21SF do *T. cruzi* realizada por CAMPOS e ANDRADE (1996) demonstrou que tanto clones

quanto subclones isolados apresentaram o mesmo comportamento biológico e isoenzimático quando comparados à cepa parental. Segundo os autores estes resultados sugerem uma estabilidade da cepa, indicando uma homogeneidade clonal dessa população.

Posteriormente CAMPOS et al. (1999) demonstraram, através da análise comparativa do DNA do cinetoplasto, pela técnica do RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*) que clones e subclones da cepa 21SF apresentaram alto percentual de similaridade (80% a 100% para as enzimas Rsa I e Hinf I) em relação a cepa parental sugerindo que esta homologia favorece a predominância de um clone principal da cepa 21SF o que confirma a homogeneidade observada no perfil biológico e isoenzimático.

Em relação à estrutura clonal da cepa Colombiana, CAMANDAROBA et al. (2001) procuraram caracterizar suas populações também tentando avaliar a existência de homogeneidade entre clones isolados e a cepa parental. Os achados demonstraram que os clones e cepa parental apresentaram o mesmo perfil isoenzimático característico do zimodema Z1, padrão da cepa Colombiana, indicando uma homogeneidade fenotípica entre eles e fortalecendo mais uma vez a hipótese da existência de um clone principal o qual seria responsável pelo padrão de comportamento biológico da cepa e de seus isolados.

Em 2006, o Brasil foi certificado pela Organização Panamericana de Saúde como livre da transmissão vetorial da doença de Chagas, pelo vetor *T. infestans* - Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*. Essa certificação representa a eliminação (interrupção momentânea) da transmissão da doença especificamente por esse triatomíneo e não a erradicação da doença, que seria a interrupção definitiva da transmissão (FERREIRA & SILVA, 2006).

Em áreas endêmicas da doença de Chagas os indivíduos estão sujeitos a múltiplas infecções pelo *T. cruzi* albergando, assim, múltiplas cepas. Embora a transmissão pelo *Triatoma infestans*, principal agente transmissor domiciliado do *T. cruzi* esteja controlada na maior parte do Brasil, espécies silvestres dos triatomíneos podem vir a se domiciliar, continuando, assim, as reinfecções dos pacientes (ANDRADE et al., 2006; MACEDO, 1976).

Tratando-se da doença de Chagas humana, as reinfecções têm sido consideradas como um importante fator para o agravamento das lesões cardíacas



em pacientes de diferentes áreas endêmicas (MACEDO, 1973) e o controle da infecção pela eliminação do vetor domiciliado da espécie *T. infestans* tem contribuído para o significativo decréscimo da morbidade da doença de Chagas (DIAS et al., 2002).

ANDRADE et al. (1970) demonstraram que, em infecções repetidas com cepas de diferentes biotipos, a primeira inoculação confere resistência parcial a uma segunda infecção, não se desenvolvendo uma nova fase aguda no animal reinoculado. Neste mesmo estudo foi demonstrado que os parasitos de diferentes cepas podem ser recuperados após passagens sucessivas em animal experimental, e a resistência à reinoculação é apenas relativa, podendo os parasitos provenientes da 2ª inoculação, os quais podem ser reisolados, sobreviverem (BRENER, 1967).

No modelo canino, MACHADO et al. (2001) descreveram que quando esses animais são submetidos a infecções sucessivas com duas cepas distintas, a parasitemia apresenta queda progressiva durante as reinfecções. As alterações histopatológicas de miocárdio foram discretas e focais com necrose de miócitos, mas sem evidências de formas amastigotas ou do DNA do *T. cruzi* nos tecidos.

Entretanto, estudos em camundongos submetidos a infecções sucessivas, com uma única cepa demonstraram que a parasitemia dos animais reinfectedos apresentava picos elevados quando comparada a animais com infecção única. A análise histopatológica demonstrou um infiltrado mononuclear com áreas de necrose e fibrose no miocárdio, sugerindo que a persistência do parasito está envolvida na exacerbação da doença (BUSTAMANTE et al., 2002).

Em estudos realizados por ANDRADE et al. (2006), camundongos inoculados com cepas dos três biotipos (Tipos I, II e III) foram investigados quanto à influência das múltiplas inoculações em relação às lesões histopatológicas e a possibilidade da coexistência de mais de uma cepa no animal experimental. Os resultados obtidos pela análise isoenzimática comprovaram a presença das três cepas, com predominância da cepa Y (Biotipo Tipo I) nas amostras analisadas. Com relação ao estudo histopatológico observou-se um aumento da intensidade das lesões teciduais classicamente determinadas pela cepa Colombiana. As lesões observadas nos camundongos com tríplice infecção sugerem uma estimulação da resposta imunológica celular nesses animais, sem o aparecimento de parasitos nos tecidos, o que afasta a possibilidade de reativação da infecção. As lesões se tornaram intensas

e confluentes, com padrão de uma resposta imunológica de hipersensibilidade tardia.

Trabalhos com infecção mista com o *T. cruzi* sugerem que não ocorre apenas a justaposição de efeitos entre os clones da mistura, mas uma interação destes, podendo resultar em mudanças nas suas propriedades fundamentais refletindo no curso da infecção. Dessa forma, infecções mistas podem exercer um importante impacto na morbidade da doença, na dinâmica de transmissão do parasito e na resposta quimioterápica, uma vez que indivíduos em áreas endêmicas podem estar sujeitos a infecções por mais de um clone do parasito como também a várias reinfecções (MACEDO & PENA, 1998; MARTINS et al., 2006).

Em uma mesma área endêmica predomina um mesmo tipo de cepa do *T. cruzi*, entretanto essas cepas são formadas por diferentes populações, com predominância de clone principal que apresenta um comportamento biológico padrão da cepa (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

Em decorrência dos resultados encontrados na literatura, demonstrando que múltiplas infecções podem resultar em mudanças no curso da infecção experimental, na resposta ao quimioterápico e a sua importância na epidemiologia da doença de Chagas, o presente estudo investigou a eficácia da quimioterapia com Benzonidazol em infecção tríplice por clones da cepa 21SF do *T. cruzi*, supondo que as múltiplas infecções dificultem a eficácia do quimioterápico.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas foi descoberta em 1909, na cidade de Lassance, Minas Gerais, Brasil, por Carlos Chagas (1878-1934), pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz. Chagas foi capaz de identificar todo processo da doença, identificando o patógeno (que causa a enfermidade), o vetor (que a transmite) e a doença humana (CHAGAS, 1909).

Carlos Chagas foi designado por Oswaldo Cruz para trabalhar na região norte de Minas Gerais com o objetivo de controlar o surto de malária que se alastrava entre os operários da estrada de ferro Central do Brasil, que estavam adoecendo e paralisando as obras (CHAGAS, 1909).

Informado sobre a presença de um inseto muito comum na região, hematófago e, popularmente conhecido como barbeiro, devido ao hábito de picar a região facial e, tendo conhecimento que insetos hematófagos podem servir de vetores permitindo que parasitos infectem seres humanos, Chagas capturou alguns exemplares de barbeiros para estudo. Ao examiná-los, alguns possuíam formas flageladas em seu intestino posterior. Por não possuir equipamento adequado disponível para avançar nos estudos, Chagas enviou alguns barbeiros para Oswaldo Cruz, que, após colocar os insetos em contato com animais de laboratório livres de infecção, percebeu que alguns deles adoeceram e apresentavam tripanosomas no sangue, com sua morfologia inteiramente diferente de qualquer espécie conhecida do gênero *Trypanosoma* (KROPF & MASSARANI, 2009).

Com o intuito de investigar mais o hábito do *T. cruzi*, Chagas iniciou estudos em Lassance, e descobriu que cães e gatos também se encontravam infectados pelo protozoário. Além disso, Carlos Chagas descobriu o primeiro caso da doença em humanos, em uma criança de dois anos de idade, chamada Berenice. Doença essa, que, mais tarde, seria denominada de doença de Chagas e seu agente etiológico o protozoário flagelado classificado como *T. cruzi* (CHAGAS, 1909; DIAS, 1999).

Em 1909, Carlos Chagas comunica ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana. A “tripla descoberta” de Chagas, foi um feito único na

história da medicina, estabelecendo um marco histórico na ciência e na saúde brasileiras. Mais de um século após sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa uma das mais importantes enfermidades parasitárias que afetam o homem na América Latina (KROPF & MASSARANI, 2009).

O mecanismo mais importante de transmissão do *T. cruzi* para os seres humanos e outros mamíferos é o vetorial, através das fezes de triatomíneos infectados. Os vetores da doença de Chagas, popularmente conhecido como barbeiros, são insetos artrópodes da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatomina (DIAS et al., 2002).

Triatomíneos se escondem em ninhos ou áreas de repouso dos animais silvestres. Eles se alimentam de sangue desses animais - ciclo silvestre. Algumas destas espécies de insetos se adaptaram a habitações humanas, onde se escondem nas fendas, emergindo à noite para a sua alimentação - ciclo doméstico. Dentro do intestino do vetor, o *T. cruzi* sofre sucessivas mudanças de estágios de desenvolvimento, o último é uma forma flagelada que vive no reto do vetor (LENT, 1999).

A domiciliação de triatomíneos é o principal fator para o aumento do risco de infecção pelo *T. cruzi* para os seres humanos. As principais espécies são aquelas que habitam as proximidades dos domicílios (*Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*), sendo responsáveis por certamente mais do que 80% dos casos de doença de Chagas humana em áreas endêmicas (DIAS et al., 2002).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Estima-se que ainda existam 10 milhões de seres humanos infectados na América Latina e mais de 60 milhões de pessoas sob risco de infecção em cerca de 18 países endêmicos (OMS, 2010), ocorrendo no Brasil aproximadamente 3,5 milhões de pessoas infectadas (BERTOLI et al., 2006).

A doença de Chagas é uma enfermidade prevalente do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina. No Brasil, as análises sorológicas demonstraram em 1980 uma prevalência de 4,2 na zona rural e 3,1 na população em geral, apresentando uma zona endêmica que vai do estado do Maranhão até o Rio Grande

do Sul, com exceção de Santa Catarina e a região Amazônica (DIAS et al., 2008).

Na América Latina, em 1991, a iniciativa dos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), interrompeu a transmissão da doença de Chagas no Uruguai em 1997, no Chile em 1999, em oito dos 12 estados endêmicos do Brasil e de 16 províncias endêmicas da Argentina em 2000. Com essa iniciativa foram também reduzidas as taxas de infecção em grupos jovens e cuidados relativos aos bancos de sangue foram implementados. O acordo firmado entre as autoridades sanitárias permitiu que a transmissão do *T. cruzi*, através do vetor e da transfusão sanguínea, fosse interrompida em seis países da América Latina, reduzindo a incidência da doença de Chagas neste Continente como um todo. Após essa iniciativa dos países do Cone Sul, a Assembleia de Saúde Mundial criou uma resolução WHA 51.14 em 1998 para que essa iniciativa fosse estendida aos países Andinos (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) e aos da América Central (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá) (WHO, 2002).

Assim, na década passada, a maioria dos países endêmicos iniciou um forte programa de controle, com um sucesso similar ao dos países do Cone Sul, havendo, portanto na América Latina, de 1990 a 2006, um decréscimo de alguns indicadores epidemiológicos (DIAS et al., 2008), como pode ser demonstrado na tabela a seguir.

**Tabela 1** Mudanças em alguns parâmetros epidemiológicos após a interrupção da transmissão da doença de Chagas, 1999-2006.

<b>Parâmetros Epidemiológicos</b>	<b>1990</b>	<b>2000</b>	<b>2006</b>
Mortes anuais	>45,000	21,000	12,500
Casos de infecção humana	30 milhões	18 milhões	15 milhões
Incidência anual	700,000	200,000	41,200
População em risco	100 milhões	40 milhões	28 milhões
Distribuição	21 países	19 países	18 países

Fonte: Adaptado de DIAS et al, 2008.

A frequência da infecção do *T. cruzi* em humanos, através do vetor, está

intimamente relacionada ao nível econômico da população e ao caráter domiciliar do vetor, ocorrendo a transmissão da infecção em locais onde os triatomíneos infectados e o hospedeiro humano tenham um contato direto.

A doença de Chagas entra no grupo de doenças negligenciadas que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são aquelas que afetam milhares de pessoas, mas que não apresentam atrativos econômicos para o desenvolvimento de fármacos, por atingir populações socioeconomicamente carentes (BRASIL, 2009).

## 2.3 A DOENÇA DE CHAGAS

Na evolução natural da doença de Chagas distinguem-se três fases. A fase aguda, qualquer que seja a via de contágio, se inicia no momento em que se adquire a infecção e dura de dois a quatro meses, com pouca manifestação clínica e elevada parasitemia. A fase indeterminada é assintomática e pode perdurar por toda a vida. A fase crônica da doença se desenvolve em uma parte dos pacientes infectados e corresponde à lenta destruição das células infectadas pelo parasita (DIAS & COURA, 1997).

As principais alterações teciduais da doença de Chagas Humana estão localizadas no músculo cardíaco e no sistema digestivo. No, entanto, a patologia pode ser relacionada com o estágio da doença, com a cepa do *T. cruzi* e a resposta imune do hospedeiro (STEINDEL et al., 2005).

### 2.3.1 Fase Aguda

Esta fase pode ser inaparente ou levar a quadro de: febre, mal-estar e fraqueza, dor de cabeça, aumento do baço, do fígado e linfonodos. Em crianças, pode se apresentar numa forma grave, com miocardite aguda, falência cardíaca e meningoencefalite (ANDRADE, et al., 1994).

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada pela presença do parasito no sangue do hospedeiro, permitindo assim a observação de *T. cruzi*, na forma tripomastigota, pelo exame microscópico de um esfregaço de sangue fresco. Muitas vezes, a fase aguda da infecção não é percebida pelo paciente, pois as reações iniciais podem ser principalmente inespecíficas, motivo pelo qual é difícil

realizar tratamento farmacológico para promover a eliminação e/ou redução dos parasitos (DIAS & COURA, 1997).

### **2.3.2 Forma Indeterminada**

Após a fase aguda, aproximadamente 60% – 70% dos infectados evoluirão para uma forma indeterminada, sem qualquer manifestação clínica da doença de Chagas (BRASIL, 2009). Os fatores que promovem o desenvolvimento para a fase indeterminada da infecção pelo *T. cruzi*, sua duração e sua evolução não estão definidos (DIAS & COURA, 1997).

Durante esta fase, os pacientes permanecem assintomáticos com sorologia positiva, e não há sinais físicos ou evidência clínica de envolvimento de órgãos. No entanto, cerca de 2 a 5% destes evoluem para uma forma clínica manifestas da doença (BRENER et al., 2000).

### **2.3.3 Fase Crônica**

Segundo o Ministério da Saúde (2009), cerca de 30 % a 40 % dos seres humanos infectados pelo *T. cruzi*, desenvolverão formas clínicas crônicas, divididas em três tipos de acordo com as complicações apresentadas: cardíaca, digestiva ou mista (com complicações cardíacas e digestivas). A fase crônica é caracterizada por uma progressiva miocardite, que está associada com um intenso e difuso infiltrado inflamatório mononuclear, áreas de necrose de células cardíacas e formação da fibrose (ANDRADE et al., 1991; ANDRADE, 1999; ANDRADE et al., 2000). A inflamação é encontrada principalmente nas regiões perivasculares do miocárdio, sendo difícil à detecção do parasito. Essas lesões promovem hipertrofia do coração, insuficiência cardíaca, arritmias variadas, fenômenos tromboembólicos e morte súbita (ANDRADE et al., 2000). Há, nesta fase, gradativa redução da qualidade de vida e da capacidade de trabalho dos doentes, que passam a necessitar de atenção médica constante (MONCAYO, 2003).

### *Forma Cardíaca*

Achados epidemiológicos apontam que cerca de 30% dos indivíduos infectados evoluem para uma fase crônica cardíaca. O envolvimento cardíaco é a maior causa de morbidade e mortalidade da doença pelos diferentes níveis de dano no sistema de condução e pela ocorrência de falência cardíaca nos casos mais severos. Sintomas e sinais físicos da doença são de insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas e tromboembolismo arterial ou venoso (DIAS & COURA, 1997). A destruição direta causada pelo parasitismo intracelular resulta em necrose associada à inflamação. A fibrose causada pela doença de Chagas é mais intensa do que a fibrose associada a qualquer outra doença cardiológica. A fase crônica cardíaca também é caracterizada pela destruição das células e nervos cardíacos, que está associada com um intenso e difuso infiltrado inflamatório mononuclear, áreas de necrose de células cardíacas e formação da fibrose, causando dilatação e insuficiência cardíaca (ANDRADE et al., 2000).

### *Forma Digestiva*

Alterações do trato digestivo ocasionadas por lesões dos plexos nervosos (sistema nervoso entérico), com consequentes alterações da motilidade e morfologia dos órgãos comprometidos, constituindo a etapa inicial do processo patogênico que leva ao estabelecimento das dilatações. O megaesôfago e o megacólon são as manifestações mais comuns, representam a fase mais avançada e a expressão mais evidente do comprometimento digestivo (RASSI JUNIOR et al., 2012)

A destruição dos neurônios que ocorre de forma generalizada quanto à sua distribuição, determina alterações nas secreções, na absorção e, principalmente, na atividade motora do tubo digestivo. O intestino afetado pode ter uma aparência normal macroscopicamente, com perturbações funcionais peristálticas, como também pode ocorrer dilatação, levando ao megaesôfago ou megacólon (DUTRA & GOLLOB, 2008).

Caracteriza-se o megaesôfago pela falta de coordenação motora e dilatação do esôfago que dificultam deglutição, sendo frequentes desnutrição e pneumonia. A manifestação do megacólon é a dilatação do cólon (principalmente dos segmentos finais, o sigmóide e o reto), levando à constipação crônica (STEINDEL et al., 2005).



## 2.4 O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário parasita que infecta uma ampla gama de triatomíneos e espécies de mamíferos, incluindo o homem, causando uma das mais importantes infecções parasitárias na América Latina pelo impacto na saúde pública e na economia. A doença de Chagas não pode ser considerada erradicável, uma vez que a erradicação implicaria em uma interrupção definitiva da sua transmissão através dessa elevada diversidade de hospedeiros e reservatórios (DIAS et al., 2002).

A espécie *T. cruzi*, apresenta uma ampla diversidade a ponto de ter se defendido o uso do termo “Complexo cruzi” para designar esse protozoário (DEVERA et al., 2003), que apresenta variabilidade intraespecífica, detectável através da variação morfológica e relacionadas a diferentes manifestações histopatológicas, imunológicas e da virulência do parasito (ANDRADE, 1974, 1985).

O *T. cruzi* é um organismo diploide, com reprodução clonal, e possivelmente evolução antiga (TIBAYRENC et al., 1986), com uma multiplicidade de vetores e reservatórios e uma circulação natural amplamente disseminada. O seu trânsito se faz dentro de ecótopos silvestres e desses para o ambiente domiciliar e peridomiciliar.

A ingestão de sangue faz com que o vetor elimine fezes com as formas tripomastigotas metacíclicas na pele lesada. A fricção próxima à área da picada leva as fezes contaminadas com o *T. cruzi* (tripomastigotas metacíclicos) para o local. A conjuntiva ocular pode ser contaminada levando ao sinal de Romana. (SCHOFIELD & DIAS, 1999). Esta forma infectante do parasito invade macrófagos e transforma-se em amastigotas intracelulares. As amastigotas se multiplicam por fissão binária, ocorrendo proliferação intracelular e liberação de formas tripomastigota no espaço intercelular (COURA et al., 2002; MACHADO et al., 2001).

As formas tripomastigotas infectam novas células de vários tecidos (por exemplo, miocárdio, músculos esquelético, sistema nervoso) e se transformam em amastigotas intracelulares. Após a infecção, as respostas inflamatórias, lesões celulares, e fibrose acontecem sequencialmente, ocorrendo diversos ciclos de multiplicação parasitaria no interior das células. O curso da infecção no homem e em outros vertebrados determina as diferentes fases da doença de Chagas: fase aguda, fase crônica cardíaca ou digestiva e forma indeterminada (COURA et al., 2002).

## 2.4.1 Formas de transmissão da doença de Chagas

As principais formas de transmissão da doença de Chagas humana são aquelas ligadas diretamente ao vetor, à transfusão de sangue, à via congênita e as que ocorrem por via oral, pela ingestão de alimentos contaminados. Apesar do controle da transmissão da doença de Chagas através da eliminação do *Triatoma infestans*, principal vetor no país, existe ainda um número considerável de triatomíneos que podem se infectar naturalmente pelo *Trypanosoma cruzi* (FERREIRA, 2006).

### 2.4.1.1 Transmissão vetorial

A transmissão vetorial acontece pelo contato do homem suscetível com as excretas contaminadas do vetor. Este é considerado o mecanismo primário de difusão da doença, pois dele dependem as outras formas de transmissão. Entre as mais de 120 espécies de insetos vetores, todas da subfamília Triatominae, há consenso de que algumas espécies são vetores competentes para *T. cruzi*. Os principais vetores são *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* nos países do Cone Sul, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* nos países andinos do pacto e partes da América Central, e *T. dimidiata* e *Triatoma barberi* no México (RASSI JR et al., 2012).

### 2.4.1.2 Transmissão transfusional

A transmissão transfusional da doença de Chagas é a segunda via mais importante de propagação nos centros urbanos, sendo considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (Canadá, Espanha, EUA) e em países latino-americanos que estejam em processo de erradicação do vetor (LUQUETTI & RASSI, 2000). A situação de controle sobre a transmissão transfusional na maioria dos países é muito confortável, devido ao controle sorológico. Em áreas sem controles, como algumas regiões da Bolívia, a transmissão por meio de transfusões de sangue podem ocorrer em até 20% dos casos (COURA & DIAS, 2009).

#### 2.4.1.3 *Transmissão congênita*

A principal via da transmissão congênita é a transplacentária e pode ocorrer em qualquer fase da doença materna: aguda, indeterminada ou crônica. A transmissão também pode se dar em qualquer época da gestação ou ocorrer na passagem no canal do parto, pelo contato das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada. O inquérito de seroprevalência da doença de Chagas, feita em áreas rurais do Brasil, mostra baixo índice de infecção entre as crianças até cinco anos de idade e demonstrou uma taxa de 0,025% de transmissão congênita (STERMAYER et al.; 2011).

#### 2.4.1.4 *Transmissão por via oral*

A transmissão oral da doença de Chagas surgiu em situações imprevisíveis na região amazônica e, mais raramente, em áreas de não endêmicas. Comum entre animais no ciclo silvestre, é esporádica e circunstancial em humanos e ocorre pela ingestão de alimentos contendo triatomíneos ou suas dejeções. Os surtos aparecem de forma súbita, atingindo um número pequeno de pessoas. Geralmente coincidem com épocas de calor, de maior atividade dos triatomíneos. Geralmente essa transmissão ocorre em locais definidos, em um determinado tempo, por diferentes tipos de alimentos – geralmente encontrando-se vetores ou reservatórios infectados nas imediações da área de produção, manuseio ou utilização dos alimentos contaminados com fezes de triatomíneos, ou mesmo por ingestão de triatomíneos por hábitos alimentares regionais (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012).

### 2.4.2 **Cepas do *T. cruzi***

#### 2.4.2.1 *Biodemas*

ANDRADE et al. (1974), em estudos experimentais, analisando caracteres biológicos do *T. cruzi* definiram a ocorrência de diferentes cepas organizando-as em três tipos biológicos distintos Tipos I, II e III. As alterações tissulares predominantes dependem do tropismo da cepa e, conseqüentemente, do maior grau de parasitismo

das diferentes células, tecidos ou órgãos do vertebrado, sendo os diferentes Tipos designados como Biodemas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

As cepas caracterizadas como cepas do Biodema Tipo I, apresentam-se como macrofagotrópicas na fase inicial da infecção, ocorrendo parasitismo dos macrófagos em diversos órgãos do organismo, principalmente no baço, fígado e linfonodos. Essas cepas produzem picos parasitêmicos precoces e 100% de mortalidade entre 10 e 12 dias. Na fase mais avançada da infecção aguda, observa-se um miotropismo e lesões inflamatórias no coração e músculo esquelético (ANDRADE et al., 1974).

Cepas do Biodema Tipo II causam uma infecção com curso mais lento, com picos irregulares entre 12<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias de infecção, virulência muito variável com mortalidade média entre 20 e 25 dias. As lesões predominantes na fase aguda ocorrem em miocárdio, evoluindo para a destruição dos miócitos parasitados e necrose dos não parasitados, observando-se ainda intenso processo de miocardite além de lesões de músculo esquelético e de músculo liso (ANDRADE et al., 1974).

Na infecção com cepas do Tipo III, a parasitemia evolui lentamente, apresentando altos picos de parasitemia entre 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias da infecção e baixas taxas de mortalidade. Predominância de miotropismo em todo o curso da infecção, principalmente no músculo esquelético (ANDRADE et al., 1974).

#### 2.4.2.2 *Zimodemas*

Os zimodemas são padrões isoenzimáticos que, em conjunto, possibilitam a caracterização e o agrupamento das cepas de *T. cruzi*, pela análise genética da mobilidade eletroforética de enzimas multilocus em gel de amido. Sua classificação foi proposta por MILES et al.(1980), em 3 zimodemas Z1, Z2, Z3 e por ROMANHA (1982) em 4 zimodemas ZA, ZB, ZC, ZD.

Essa classificação é caracterizada pela combinação do perfil eletroforético de ASAT (aspartato amino-transferase), ALAT (alanina aminotransferase), PGM (fosfoglutomutase), GPI (glicose fosfoisomerase), ME (enzima málica) e G6PD (glicose 6-fosfato desidrogenase).

ANDRADE et al. (1983), correlacionando os padrões de isoenzimas propostos por MILES et al.(1980) para as enzimas PGM, GPI, ALAT e ASAT, aos tipos biológicos (Biodemas), demonstraram que a caracterização biológica tem

correspondência com os perfis isoenzimáticos. As cepas do Biodema Tipo II correspondem ao Zimodema 2 e as do Tipo III correspondem ao Zimodema 1. As cepas do Tipo I mostraram um perfil peculiar, sendo posteriormente identificadas em cepas da Bolívia (TIBAYRENC & MILES, 1983) e do Chile (MILES et al., 1984), sendo correspondente ao Zimodema Z2b.

Estudos posteriores (MAGALHÃES et al., 1985) mostraram que após passagens sucessivas em diferentes meios e em triatomíneos autóctones e alóctones, as cepas do Tipo I (Y), Tipo II (21SF) e Tipo III (Colombiana) não alteraram o comportamento biológico e o padrão isoenzimáticos.

#### 2.4.2.3 Esquizodemas

Assim como ocorre nos eucariontes, o *T. cruzi* apresenta dois genomas distintos, o nuclear e o mitocondrial. As mitocôndrias dos tripanosomas, diferente dos eucariontes, apresentam uma rede formada por milhares de moléculas circulares de DNA denominada de cinetoplasto (kDNA). O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares, que diferem em tamanho e função, denominadas de minicírculos e maxicírculos. Os minicírculos são compostos por regiões conservadas e variáveis, que não codificam peptídeos, e podem variar entre diferentes cepas ou isolados do parasita (SIMPSON, 1987)

As cepas também podem ser caracterizadas em função dos perfis eletroforéticos obtidos por digestão de kDNA com enzimas de restrição. A restrição de kDNA foi capaz de gerar padrões complexos de bandas de formas específicas para cada cepa. Tal grau de variabilidade tem sua origem na constituição heterogênea da população de minicírculos, em um mesmo parasito, ou de subpopulações de uma mesma cepa (MOREL et al., 1986).

MOREL et al (1980) demonstraram, pela primeira vez, a variabilidade do kDNA desse parasito por meio da análise de polimorfismo de tamanhos dos fragmentos de restrição do kDNA: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Através dessa técnica podem-se gerar perfis de bandas cepa-específica, que foram denominados esquizodemas, indicando diferentes graus de variabilidade intraespecífica nas sequências dos minicírculos do kDNA.

#### 2.4.2.4 *Distintas Unidades Típicas (DTUs)*

Várias abordagens têm sido utilizadas para caracterizar a estrutura de populações de *T. cruzi* e definir o número de subgrupos relevantes. Uma das possíveis causas da variabilidade clínica tem sido atribuída à elevada diversidade genética e multiclonalidade de populações naturais de *T. cruzi* (MACEDO & PENA, 1998). Esta diversidade foi amplamente demonstrada por diferentes grupos de pesquisa utilizando-se diferentes denominações, como biológicas (ANDRADE, 1974; (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), bioquímicas (MOREL et al., 1980), esquizodemas (MOREL et al, 1980), clones (TIBAYRENC & AYALA, 1991), as linhagens (SOUTO et al., 1996). Em 2009, um novo Consenso, estabeleceu uma subdivisão do *T. cruzi* em grupos descritos por TIBAYRENC (1998), como Distintas Unidades Típicas (DTUs) baseada nos caracteres genéticos de três genes polimórficos, estabelecendo os genótipos do *T. cruzi* I – VI. (ZINGALES et al., 2009).

Aplicando a nova nomenclatura, ANDRADE et al. (2011) fizeram um estudo comparativo da caracterização de cepas do *T. cruzi* baseada em biodemas e zimodemas com a atual nomenclatura, verificando correlação entre os caracteres biológicos e isoenzimáticos e os caracteres genotípicos.

#### 2.4.3 **Caracterização da Cepa 21SF do *Trypanosoma cruzi***

No início da década de 70 (ANDRADE et al., 1970; ANDRADE, 1974) foram realizados estudos com o objetivo de caracterizar biologicamente as cepas do *T. cruzi* bem como seus perfis histopatológicos em animais experimentais. Baseado nesses estudos, a cepa 21SF (que foi isolado a partir de um paciente durante a fase aguda da doença) foi classificada como Biodema Tipo II, possuindo multiplicação parasitária relativamente baixa e picos de parasitemia irregulares entre o 12º e 20º dias após a infecção. Apresentam a predominância de formas largas e miocardiotropismo (ROCHA FILHO, 1979).

Bioquimicamente esta cepa tem sido classificada por ANDRADE et al. (1984), através dos perfis enzimáticos, como zimodema 2 - Z2 (MILES et al., 1980). Em relação ao tratamento quimioterápico e as taxas de cura parasitológicas, estudos mostraram que cepas desse Biodema (Tipo II) apresentam uma média

suscetibilidade à quimioterapia com Rochagan® (Benzonidazol), sendo que o tratamento poderia selecionar clones mais resistentes explicando a persistência do parasitismo após quimioterapia (ANDRADE & FIGUEIRA, 1977).

Estudos anteriores com a Cepa 21SF demonstraram um alto grau de similaridade entre os clones isolados da cepa 21SF com relação às características biológicas e izoenzimáticas (CAMPOS, 1997). CAMPOS et al. (2005), avaliando a resposta da cepa 21SF ao quimioterápico e de cinco clones desta, demonstraram haver uma variabilidade no índice de cura de 25 a 100%.

## 2.5 QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A quimioterapia da doença de Chagas ainda é um desafio para saúde. Por se tratar de uma doença negligenciada, a terapia para esta doença sofre de uma combinação de desvantagens, incluindo resistência e efeitos secundários graves. Há duas drogas usualmente utilizadas para o tratamento específico da infecção pelo *T. cruzi*: o Benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-imidazolacetamida), produzido pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), o outro é o Nifurtimox produzido pela Bayer sob o nome comercial Lampit. No Brasil, o tratamento para a doença de Chagas resume-se ao uso do Benzonidazol. (DIAS & DESSOY, 2009). Entretanto, de acordo com vários autores, o tratamento combinado com diferentes drogas com efeito anti-*T. cruzi* já testado, ou novas drogas com diferentes mecanismos de ação anti-parasitária poderá vir a ser uma nova maneira de tratar a doença (COURA, 2009; ROMANHA et al., 2010).

Estudos mostram que quanto antes for iniciado o tratamento, maiores são as chances de resultados positivos, dependendo diretamente da fase da doença em que o paciente se encontra. Contudo, esses resultados podem variar entre diferentes países ou regiões geográficas de um mesmo país. Um dos fatores que contribui para esses diferentes resultados seria o tipo de cepa do parasito predominante em algumas regiões (ANDRADE et al., 1992).

Segundo ANDRADE (1985), diferentes aspectos da infecção pelo *T. cruzi*, bem como a presença do mesmo padrão biológico e izoenzimático da cepa em uma área endêmica são relevantes não só para observação do tipo predominante de manifestações clínicas e alterações teciduais, mas também em relação à resposta

quimioterápica. Estudos sobre a quimioterapia da doença de Chagas têm demonstrado nítidas diferenças referentes aos graus de suscetibilidade ao Benzonidazol e ao Nifurtimox, em relação às cepas do *T. cruzi* (ANDRADE & FIGUEIRA, 1977; FILARDI & BRENER, 1982). As variações de resistência foram relacionadas com os diferentes biotopos (ANDRADE et al., 1985). Estes estudos caracterizaram as cepas de Tipo I como de alta suscetibilidade, as de Tipo II como de média suscetibilidade e as de Tipo III como de alta resistência. Enquanto as cepas de Tipo I e III apresentam respectivamente, índices de cura uniformes, as cepas de Tipo II apresentaram uma alta variabilidade na resposta ao Benzonidazol.

O Benzonidazol é um nitro derivado que diminui a parasitemia abreviando o curso da infecção. Entretanto a sua eficiência na fase crônica ainda é discutida (COURA & CASTRO, 2002). O Benzonidazol atua nas formas circulantes e intracelulares do *T. cruzi* com efeito microbicida entre 60% e 90% (CANÇADO, 1985).

O tratamento com Benzonidazol pode proporcionar diferentes respostas quando avaliada a sua eficácia sobre diferentes cepas do *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1985). A resistência de cepas do *T. cruzi* à quimioterapia, aumenta quando parasitos são isolados de camundongos previamente tratados. Possivelmente, o tratamento inicial elimina parasitos sensíveis prevalecendo os resistentes, os quais se multiplicam e predominam na população (MARRETTO & ANDRADE, 1994).

Posteriormente MURTA & ROMANHA, (1998) selecionaram *in vivo* clones da cepa Y mantidos em passagens sucessivas por oito meses em animais tratados com uma única dose alta de Benzonidazol. Inicialmente os autores observaram que os parasitos sobreviventes e considerados resistentes apresentaram baixos níveis parasitêmicos bem como de mortalidade. Contudo este padrão de comportamento biológico gradativamente voltou a assumir o perfil clássico da cepa Y.

O papel da quimioterapia na infecção de animais experimentais infectados com clones isolados de diferentes cepas do *T. cruzi* tem sido estudado. Camundongos infectados com clones isolados da cepa Colombiana e submetidos ao tratamento com Benzonidazol apresentaram índice de cura que variaram de 0% a 16,7%, o que representa uma alta resistência dos clones à quimioterapia (CAMANDARROBA et al., 2003). Entretanto, camundongos infectados com clones da cepa 21SF e tratados com Benzonidazol apresentaram um melhor índice de cura que variou de 30% a 100% (CAMPOS et al., 2005).



### 2.5.1 Critérios de cura

Consideram-se curados aqueles pacientes cujos testes sorológicos e parasitológicos tornam-se negativos. A cura sorológica é determinada pela obtenção de resultados sorológicos pós-terapêuticos completamente negativos por longo período de acompanhamento (OLIVEIRA et al., 2008).

Os testes sorológicos, baseados na averiguação da resposta imunológica gerada pela presença do parasito ou de seus antígenos, podem permanecer positivos por longo tempo na ausência de *T. cruzi*. As técnicas sorológicas recomendadas são imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e hemaglutinação indireta (RASSI et al., 2002).

A IFI proposta por CAMARGO (1966) é uma reação muito sensível que consiste em fazer reagir sobre antígenos (formas de cultura de *T. cruzi*), pré-fixados em lâminas de microscópio, anticorpos específicos existentes no soro do paciente, adicionando posteriormente o conjugado (antiglobulina marcada com substância fluorescente).

Os exames parasitológicos devem ser realizados antes e depois do tratamento etiológico. Eles permitem a obtenção do perfil de parasitemia do paciente, o que auxilia seu seguimento clínico. Os métodos convencionais indiretos para a identificação do *T. cruzi*, xenodiagnóstico e hemocultura, reação em cadeia polimerase – PCR e parasitemia apresentam alta sensibilidade na fase aguda e nas reativações (CANÇADO, 1998).

Recentemente, técnicas moleculares, como a PCR, que amplifica determinadas sequências repetitivas de kDNA do parasito, têm sido propostos como uma ferramenta alternativa para a detecção de *T. cruzi* em sangue humano (CHIARI, 1999).

Campos e cols. (2002) investigaram a sensibilidade desta técnica para detectar a presença de tripomastigota adicionados em alíquotas conhecidas de sangue de ratos normais, mostrando uma alta sensibilidade de detecção da PCR. Entretanto, Camandaroba et al. (2003) não verificaram a mesma eficiência da PCR no controle de cura após tratamento de animais infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Os autores observaram que somente 37% das amostras de animais que apresentaram positividade por outros métodos parasitológicos foram positivas pela PCR. Dessa forma, A PCR mostrou um grau variável de eficiência, podendo

identificar falha terapêutica na detecção positiva de DNA de *T. cruzi*, mas não o sucesso do tratamento, isso não indica, necessariamente, cura parasitológica. Esses resultados indicam ausência de DNA do parasita na amostra no momento do teste (CAMANDARROBA et al., 2003).

Segundo o Ministério da Saúde (2009), o diagnóstico molecular da infecção por *T. cruzi* por meio da PCR é de uso restrito e realizado por centros colaboradores em caráter experimental até que se tenham protocolos definidos e procedimentos operacionais padronizados. Dessa forma, a sensibilidade e especificidade do método devem ser testadas tanto quanto ao período de realização pós-tratamento quanto referentes às diferentes áreas geográficas, sabendo-se que existe uma ampla variedade de manifestações clínicas desta doença (BRITTO, 2012).

### 3. JUSTIFICATIVA

Pacientes que residem em áreas endêmicas da doença de Chagas estão sujeitos a reinfecções sucessivas pelo *T. cruzi*, desde que permaneçam as mesmas condições socioambientais, com a presença dos vetores intradomiciliares ou peridomiciliares. Em uma mesma área endêmica predomina um mesmo tipo de cepa, como foi demonstrado em São Felipe - Bahia, no Recôncavo Baiano, com provável predominância de um clone principal. As múltiplas reinfecções são responsáveis por um maior índice de morbidade da doença de Chagas humana, como foi demonstrado por Macedo (1973). Sendo as cepas policlonais, os clones podem apresentar diferentes graus de virulência e diferenças nas respostas aos quimioterápicos. Deste modo, é de interesse se verificar qual a resposta ao Benzonidazol em camundongos com tríplice infecção pela inoculação sucessiva de clones de uma mesma cepa (21 SF), isolada em área endêmica da doença de Chagas, em comparação com a resposta da cepa parental, sabendo-se de antemão que as cepas deste mesmo Tipo (Biodema Tipo II, *T. cruzi* II) têm um comportamento diversificado em relação ao tratamento com Benzonidazol, variando os índices de cura entre 12,5% e 100% (ANDRADE et al., 1985), cuja média representaria uma média suscetibilidade.

#### 4. HIPOTESE DE INVESTIGAÇÃO

Tendo em vista que as cepas do *T. cruzi* representam populações multiclonais, levantamos a hipótese de que infecções sucessivas em camundongos por clones isolados da cepa 21SF determinariam uma intensificação das lesões tissulares e uma maior resistência ao Benzonidazol, quando comparada com a observada na infecção pela cepa parental.

## 5. OBJETIVOS

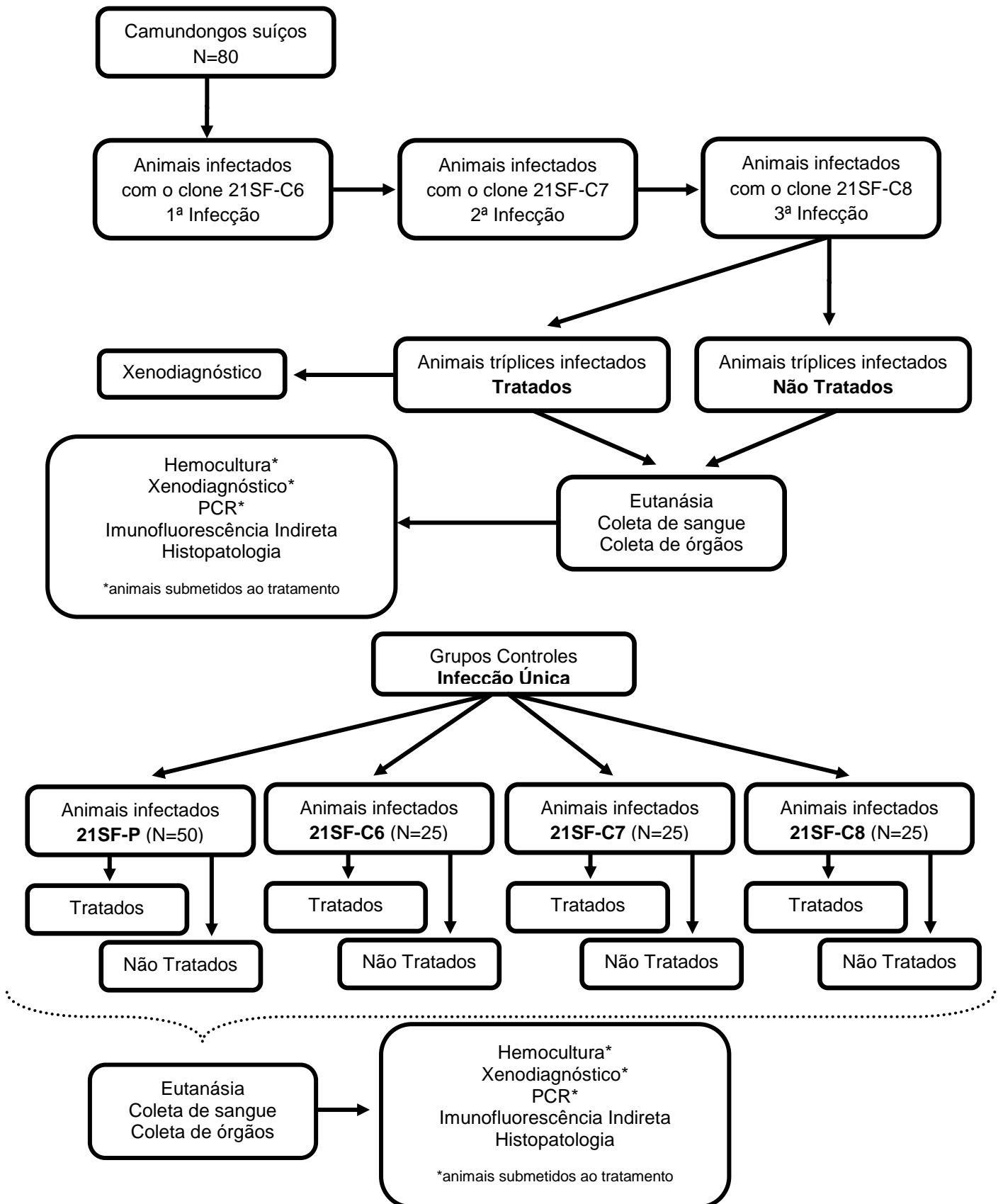
### 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta ao tratamento com Benzonidazol em camundongos submetidos a infecções com clones obtidos da cepa 21SF.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os índices de cura ao tratamento com Benzonidazol dos animais com tríplice infecção com os diferentes clones, com o obtido nos camundongos com infecção única com cada clone e com a cepa parental;
- Determinar a titulação de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais;
- Realizar a técnica da PCR nos animais com testes parasitológicos negativos e correlacionar os resultados com os índices de cura obtidos através da combinação dos testes parasitológicos com a sorologia;
- Analisar o quadro histopatológico em animais com tríplice infecção, tratados e não tratados, em comparação com os controles de infecção única.

## 6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



## 7. MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1 CEPA DO *T. cruzi*

A cepa 21SF do *T. cruzi* vem sendo mantida no biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM / FIOCRUZ, por passagens sucessivas em camundongos suíços, não isogênicos e também criopreservada em nitrogênio líquido no Laboratório de Doença de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular.

### 7.2 CLONAGEM DA CEPA 21SF DO *T. cruzi*

Para a seleção dos clones, camundongos infectados com a cepa 21SF foram eutanasiados por meio da secção do plexo axilar, após anestesia; o sangue foi coletado e centrifugado por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi coletado e submetido a diluições sucessivas em PBS 1x, e analisado em câmara de Neubauer, em 16 campos microscópicos (400X), até obter-se um baixo número de tripomastigotas. Em seguida 1 $\mu$ L do sobrenadante foi transferido para a placa de poços múltiplos, adicionando igual volume de PBS. Os poços foram analisados em microscópio óptico de inversão com aumento de 400X, e aqueles que apresentavam apenas uma forma tripomastigota foram imediatamente coletados e inoculados, individualmente em camundongos recém-desmamados (DVORAK, 1985).

Posteriormente, com o objetivo de adaptação dos clones da cepa e expansão parasitária, foram realizadas três passagens em camundongos suíços recém-nascidos, não isogênicos. Após essas passagens, os camundongos infectados com cada clone foram eutanasiados, tiveram o sangue coletado e criopreservado. Por este método foram obtidos clones da cepa 21SF, identificados como 21SF – C6, 21SF – C7 e 21SF – C8.

### 7.3 PASSAGENS E GRUPOS DOADORES

Alíquotas com clones de *T. cruzi* mantidas em nitrogênio líquido a -196°C foram descongeladas em banho-maria 37 °C e os parasitas foram inoculados

imediatamente em camundongos suíços não isogênicos de ambos os sexos, com 21 dias de idade, com a finalidade de serem doadores para realização dos grupos experimentais. Todos esses clones sofreram três passagens para readaptação dos parasitos ao animal experimental.

#### 7.4 CÁLCULO DO INÓCULO

O cálculo do número de parasitas, referente ao inóculo de formas tripomastigotas sanguícolas para cada animal infectado, foi realizado de acordo com a metodologia de BRENER (1967), segundo o qual o volume de 5 µL de sangue foi posto entre lâmina lamínula 22 x 22mm e examinado em 100 campos microscópicos com aumento de 400x, sendo calculado o inoculo para 0,1 mL.

O inóculo foi de  $5 \times 10^4$  formas tripomastigotas sanguícolas para cada animal dos grupos de infecção única e de  $1 \times 10^4$  para cada animal do grupo de infecção tríplice. O inóculo menor é devido à realização das múltiplas infecções, evitando um elevado índice de mortalidade.

Todos os animais foram infectados via intraperitoneal.

## 8. GRUPOS EXPERIMENTAIS

### 8.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 205 camundongos suíços de 21 dias e 45 camundongos suíços recém-nascidos para formação dos grupos experimentais, não isogênicos, de ambos os sexos, mantidos em gaiolas e alimentados com ração padronizada. Esses animais foram cedidos pelo Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fiocruz / Unidade Bahia.

#### 8.1.1 Infecção tríplice com os clones da Cepa 21SF

80 camundongos foram infectados primeiro com o clone 21SF-C6 obtido da cepa parental 21SF do *Trypanosoma cruzi*. Após 25 dias da primeira inoculação os camundongos sobreviventes foram reinoculados (dupla infecção) com o clone 21SF-C7. Após 50 dias da 2ª inoculação todos os animais sobreviventes à dupla infecção



foram reinoculados com o terceiro clone 21SF-C8 correspondendo à infecção tríplice.

#### **8.1.2 Infecção com a Cepa Parental 21SF**

50 camundongos foram infectados com a cepa 21SF parental.

#### **8.1.3 Infecção com o clone 21SF – C6**

25 camundongos foram infectados com o clone 21SF – C6 da cepa 21SF.

#### **8.1.4 Infecção com o clone 21SF – C7**

25 camundongos foram infectados com o clone 21SF – C7 da cepa 21SF.

#### **8.1.5 Infecção com o clone 21SF – C8**

25 camundongos foram infectados com o clone 21SF – C8 da cepa 21SF.

#### Identificação dos grupos experimentais

**GRUPO A:** 80 camundongos infectados com os clones C6/C7/C8 da cepa 21SF

**A 1** – Grupo de camundongos tratados com Benzonidazol (40 camundongos)

**A 2** – Grupos camundongos não tratados (40 camundongos)

**GRUPO B:** 50 camundongos infectados com cepa parental 21SF

**B 1** – Grupo camundongos tratados com Benzonidazol (25 camundongos)

**B 2** – Grupo camundongos não tratados (25 camundongos)

**GRUPO C:** 25 camundongos infectados com única infecção (21SF – C6)

**C 1** – Grupo de camundongos tratados com Benzonidazol (15 camundongos)

**C 2** – Grupo camundongos não tratados (10 camundongos)

**GRUPO D:** 25 camundongos infectados com única infecção (21SF – C7)

**D 1** – Grupo de camundongos tratados com Benzonidazol (15 camundongos)

**D 2** – Grupo camundongos não tratados (10 camundongos)

**GRUPO E:** 25 camundongos infectados com única infecção (21SF – C8)

**E 1** – Grupo de camundongos tratados com Benzonidazol (15 camundongos)

**E 2** – Grupo camundongos não tratados (10 camundongos)

## 9. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Todos os animais dos grupos com infecções únicas (clones 21SF-C6, 21SF-C7 e 21SF-C8 e 21SF-P), juntamente com os animais do grupo de tríplice infecção com os três clones da cepa, foram avaliados quanto à parasitemia, mortalidade, estudo histopatológico e sorologia.

Os animais submetidos ao tratamento com o quimioterápico Benzonidazol, além dos procedimentos citados, foram submetidos aos testes de cura, como o xenodiagnóstico e hemocultura.

### 9.1 PARASITEMIA

Foi avaliada pelo exame microscópico direto, entre lâmina e lamínula 22 x 22mm em 50 campos microscópicos 400X, do sangue periférico obtidos pela secção da cauda de cada animal infectado (5 camundongos por grupo). Os resultados são representados pela média aritmética das contagens obtidas nos cinco animais (ANDRADE, 1974).

A parasitemia foi avaliada 5x por semana a partir do 7º dia de infecção até trinta dias após sua negatização. Após esse período, a avaliação passou a ser feita 1x por semana.

### 9.2 MORTALIDADE

Foi acompanhada diariamente durante o curso da infecção em todos os grupos experimentais através da mortalidade cumulativa.

### 9.3 TRATAMENTO

O Benzonidazol (N-benzyl-2-nitro-1-acetamida) foi administrado em suspensão de goma arábica, por via intragástrica, com dose de 100 mg/kg/dia, sendo o total de 60 doses, iniciado no 14º dia pós infecção nos grupos de infecção única e, no grupo triplamente infectado, trinta dias após a terceira infecção.

## 9.4 EUTANÁSIA

Após 4-6 meses do final do tratamento, os animais sobreviventes dos grupos foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia com Ketamina e Xilasina em PBS, na proporção de 1:1:1.

## 9.5 CRITÉRIOS DE CURA

A cura pós-tratamento foi estabelecida através dos seguintes critérios: 1) Testes parasitológicos com objetivos de identificar a presença do parasito no sangue periférico dos animais tratados; 2) Testes sorológicos de imunofluorescência indireta para avaliar os títulos de anticorpos específicos, considerando o título máximo de negatividade de 1:20;

## 9.6 TESTES DE CURA PARASITOLÓGICOS

Entre 5 e 6 meses após o término do tratamento os camundongos tratados, foram submetidos à avaliação da parasitemia e ao xenodiagnóstico, utilizando ninfas de *Triatoma dimidiata*. Sessenta dias após esses testes, os animais foram eutanasiados e tiveram o sangue coletado, através da punção cardíaca para hemocultura e obtenção de soro para imunofluorescência indireta.

### 9.6.1 Parasitemia

Foi realizado exame direto no sangue periférico em microscópio, usando-se lâmina e lamínula, para a pesquisa da presença de parasitos nos camundongos tratados, 5x por semana, 50 dias após o termino do tratamento. Após esse período a parasitemia era realizada 1x por semana. Os camundongos que exibiram parasitemia negativa ao exame direto da amostra de sangue foram submetidos aos outros testes de cura parasitológicos.

### 9.6.2 Xenodiagnóstico

Para realização do xenodiagnóstico foram utilizados, para cada animal, cinco ninfas de III e IV estágios, da espécie *Triatoma dimidiata*, acondicionadas em recipientes apropriados cobertos com nylon na parte superior. Para realização desta

etapa, os animais foram anestesiados e imobilizados em sacos constituídos com telas e colocados em decúbito dorsal, sendo as ninfas, então colocadas sobre o abdômen de cada animal, por um período de 30 minutos. Após 30 e 60 dias da preparação dos xenodiagnósticos, as ninfas tinham seu abdômen comprimido para a obtenção o conteúdo biológico (fezes) que foi diluído em PBS e examinado em 50 campos microscópicos, com aumento de 400X, para detecção das formas parasitárias.

### **9.6.3 Hemocultura**

Amostra de sangue coletada (0,5 mL), após a eutanásia do animal que apresentava parasitemia negativa, foi semeada em tubo de ensaio contendo meio Warren (WARREN, 1960) e mantida a 37°C.

Para a determinação da positividade, foram feitos exames microscópicos das culturas com 30 e 45 dias de cultivo.

## **9.7 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

Os animais infectados e tratados, de todos grupos, que apresentaram testes parasitológicos negativos, foram submetidos ao teste molecular da PCR.

### **9.7.1 Obtenção do kDNA**

Os parasitos serão obtidos de animais coletando-se 450 µL de sangue que foram imediatamente preservados em 50 µL EDTA, a 5%, e congelados a -70 °C até o momento da extração do DNA.

### **9.7.2 Extração do DNA**

Após o descongelamento, retirou-se uma alíquota de 100 µL de sangue e transferiu-se para a coluna filtrante acoplada ao tubo eppendorf. Foi adicionado a este volume, 34 µL do tampão de lise e 134 µL do tampão de extração. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (rotação por minuto em centrífuga Mikro 120, Hettick Zentrifugen D-78532 Tuttlingen) por 10 min, descartando o líquido filtrado, repetindo o procedimento por duas uma vez. À amostra foi adicionado SDS 20%, e foram mantidas, por 2 horas, a 65°C. Foi adicionado à amostra, 100µL de solução Wash e 250 µL de Fenol-clorofórmio-álcool, centrifugando a 12.000 rpm por 10 min.

As amostras foram diluídas em água ultra-pura-estéril para PCR adicionando 50 µL na coluna filtrante e preservando, por 2 horas a -70°C. A amostra foi centrifugada por 10 min a 10.000 rpm, seguido de lavagem com etanol a 70%. centrifugando a 10.000 rpm por 10 min. As amostras de DNA foram secadas e mantidas em câmara fria a -20° C até o momento do uso.

### 9.7.3 Oligonucleotídeos sintéticos (primers)

Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados visando a amplificação das sequencias de minicírculo do kDNA (Tabela 2).

**Tabela 2** Primers utilizados na reação da PCR.

<b>Primers</b>	<b>DNA Amplificado</b>	<b>Sequências 5' → 3'</b>
<b>S35</b>	kDNA	AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA
<b>S36</b>	kDNA	GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT

Estas sequências amplificam um fragmento de 330pb da região variável do minicírculo, o qual representa uma região variável mini-repetida do minicírculo da molécula do kDNA (AVILA et al., 1980).

### 9.7.4 Amplificação pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As amostras foram amplificadas em um termociclador de temperatura de DNA, composto de um ciclo inicial de desnaturação de 5 min, a 94 °C; seguido de 35 ciclos de 45 segundos, a 94 °C, para a abertura da fita de DNA; seguido de 30 min, a 55 °C, para o pareamento dos primers; e de 30 min, a 72 °C, para extensão da fita de DNA e um ciclo final para a duplicação da fita de DNA. A reação foi realizada em um volume final de 50 µL com os seguintes componentes: 25 mM Tampão (11x); 11 mM de DNTp's; 22 pmol de primers P35/36; 62,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 3,3 µL de TaqPolymerase e 2 µL DNA da amostra. Os controles da reação foram uma amostra de água estéril ultrapura.

### 9.7.5 Eletroforese em gel de agarose

As amostras do kDNA foram submetidas a corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, em tampão TAE (50X), corado pelo Brometo de Etídio por 1 h, 100v e

30 mA. O controle negativo foi uma amostra de água ultrapura estéril. O marcador Ladder foi de 100 pb. As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob a luz ultravioleta e fotografadas no sistema EagleEye II.

## 9.8 EXAME SOROLÓGICO

Animais de todos os grupos tiveram o soro coletado e estocado a uma temperatura de -20 °C para titulação de anticorpos específicos pela técnica de imunofluorescência indireta (CAMARGO, 1966). Para a titulação dos anticorpos foram preparadas diluições seriadas do soro em PBS em placas de múltiplos poços, de fundo arredondado. Após essa etapa o volume de 10 µL das diluições de cada poço foi distribuído nas lâminas contendo o antígeno. O antígeno utilizado foi constituído por formas de cultura em meio Warren, fixadas em formol e em seguida distribuídas em lâminas apropriadas, que foram tratadas com IgG anti-camundongo, ligado à fluoresceína. A titulação dos anticorpos foi feita pela diluição progressiva do soro, nos Títulos de 1:10 , 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280.

Em seguida as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por um período de 30 minutos. Passado o período de incubação as lâminas foram submetidas a três lavagens sequenciais com PBS pH 7,4, por um período de 5 minutos em cubetas próprias e secas a temperatura ambiente. Posteriormente, foram aplicadas 10µL do anticorpo IgG anti-mouse conjugado ligado à fluoresceína (Sigma), sobre cada poço das várias laminas sendo em seguida incubadas a 37°C na estufa por mais 30 minutos em câmara úmida.

Retiradas da estufa após o período de incubação as lâminas foram submetidas a três lavagens seguidas com PBS de 5 minutos, secadas e montadas com tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9,6 (0,02M) e analisadas no microscópio Zeiss de epifluorescência com lâmpada halogênica.

- Reações positivas - as formas do parasita são vistas como estruturas bem coradas, nitidamente delimitadas por fluorescência verde;
- Reações negativas - os parasitas permanecem como manchas foscas e irregulares com fraca fluorescência interior.

Foram consideradas positivas, ponto de corte, as reações fluorescentes em soros com diluição  $\geq 1:40$ , conforme recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998).

#### 9.9 ÍNDICE DE CURA DOS ANIMAIS TRATADOS COM BENZONIDAZOL

Os índices de cura foram estabelecidos pela combinação dos resultados dos testes parasitológicos e dos títulos de imunofluorescência. Foram considerados curados animais que não apresentavam positividade em nenhum dos testes citados.

A PCR foi utilizada como técnica complementar para o diagnóstico de cura nos camundongos infectados e tratados com Benzonidazol que apresentaram testes parasitológicos negativos.

#### 9.10 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Foram feitas autopsias completas e coletadas secções de fígado, baço, coração, músculo esquelético para fixação em Formol Milloning, inclusão em parafina para obtenção de secções de 5  $\mu\text{m}$  e coloração em hematoxilina e eosina (H&E) para estudo histopatológico.

O estudo histopatológico foi feito em camundongos infectados com o *T. cruzi*, comparando-se a intensidade das lesões fibrótico-inflamatórias do miocárdio e de músculo esquelético entre os grupos de infecção não submetidos a tratamento e os grupos tratados com o Benzonidazol.

Foi feita uma análise semi-quantitativa onde a intensidade das lesões inflamatórias foi expressa em +, ++ e +++ com a seguinte correspondência: (+) lesão discreta, correspondendo a escasso e difuso infiltrado mononuclear e/ou pequenos focos de infiltração mononuclear; (++) lesão moderada, representada por difuso infiltrado mononuclear mais acentuado do que no grau + e focos inflamatórios localizados, com lesão focal de miócito; (+++) lesão intensa que corresponde a denso infiltrado difuso e/ou infiltrados focais extensos e confluentes e a necrose de miócitos.

### 10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparações das parasitemias nos grupos tratados com Benzonidazol e controles, foi aplicado o teste de Mann-Whitney, para comparação entre as parasitemias dos subgrupos tratados entre os grupos foi utilizado o teste de Dunnett, para comparações múltiplas após ANOVA; para análise de sobrevida foi utilizado o teste Log-rank (TESTON et al., 2013). O programa utilizado foi o Software GraphPad Prism, versão 5. As diferenças foram consideradas significativas se o valor de p foi menor que 0,05.

## **11. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Para a realização do presente estudo, o projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética e pesquisa no uso de animais de Laboratório (CEUA), sob o protocolo L-IGM – 013/2010, do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / Fiocruz - Unidade Bahia. Todas as atividades relacionadas ao uso e manipulação desses animais estão de acordo com as normas éticas definidas pelo referido comitê.



## 12. RESULTADOS

Os resultados foram avaliados através da análise de diferentes parâmetros, com o objetivo de avaliar a resposta quimioterápica de infecções sucessivas em camundongos com clones do *Trypanosoma cruzi* de um mesmo Biodema, bem como essa resposta quimioterápica em animais de infecção única, com cada clone em comparação com a cepa parental 21SF.

Os parâmetros utilizados foram análise da parasitemia, mortalidade cumulativa e testes de cura parasitológicos, avaliação de títulos sorológicos.

### 12.1 INFECÇÃO COM A CEPA 21SF

#### 12.1.1 Análise da Parasitemia

Camundongos infectados com a cepa 21SF e tratados com Benzonidazol apresentaram uma curva parasitêmica com pico irregular entre o 11º e o 15º dia de infecção, enquanto que os camundongos controles não tratados apresentaram pico parasitêmicos entre 11º e 19º dia de infecção. A negatização da parasitemia foi observada no 32º dia de infecção para os animais tratados e no 50º dia de infecção para os controles não tratados (Figura 1A).

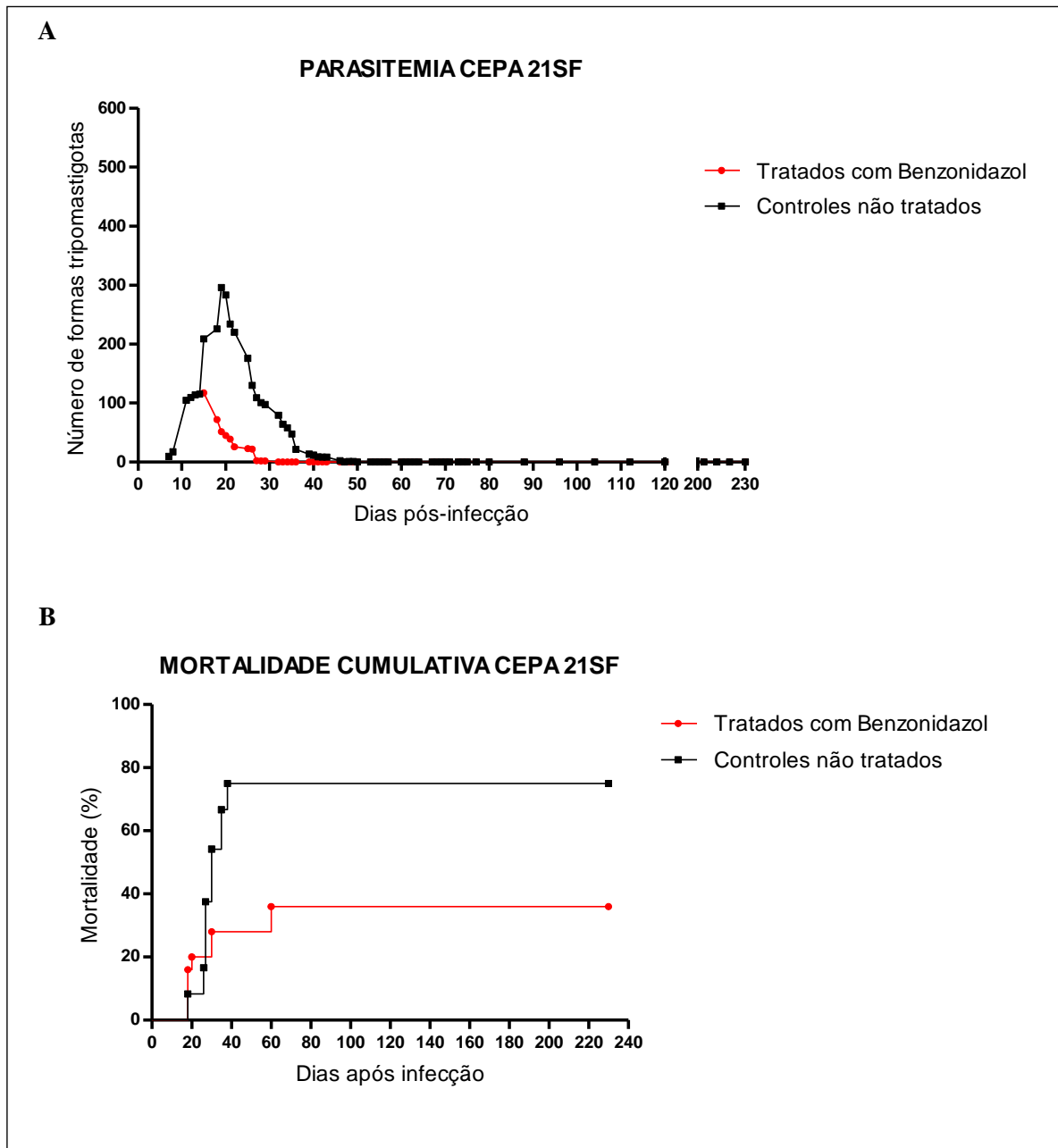
#### 12.1.2 Índice de Mortalidade Cumulativa

A mortalidade dos camundongos foi de 36% para os camundongos infectados com a cepa 21SF e tratados com Benzonidazol e 76% para os controles não tratados (Figura 1B).

#### 12.1.3 Resultado dos testes de cura

Os camundongos eutanasiados com, aproximadamente, 5 meses após o término do tratamento apresentaram positividade nos testes parasitológicos. A avaliação sorológica dos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* variou de 1:20 a 1:1280

para os animais infectados e tratados com Benzonidazol, sendo que apenas 6,6% foram considerados negativos (Tabela 3).



**Figura 1** Camundongos infectados com a cepa 21SF do *T. cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/kg/dia, e grupo controle não tratado. (A) Curvas das médias de parasitemia,  $p=0,009$  (Teste Mann Whitney). (B) Mortalidade Cumulativa (%),  $p=0.01$  (Teste Log-rank).

**Tabela 3** Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com a cepa 21SF do *T. cruzi*, tratados com Benzonidazol, 100 mg/kg/dia.

Código	Parasitológico			Sorológico	Molecular
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI - Títulos	PCR
21SF-P / T1	NEG.	POS.	NR	1:320	POS.
21SF-P / T2	NEG	POS.	NR	1:320	NR
21SF-P / T4	NEG	NEG.	NEG.	1:20	POS.
21SF-P / T5	NEG	POS.	NR	1:80	POS.
21SF-P / T6	NEG	NEG.	NEG.	1:40	POS.
21SF-P / T9	NEG	POS.	NR	1:320	POS.
21SF-P / T12	NEG	NEG.	NEG.	1:320	POS.
21SF-P / T13	NEG	POS.	NR	1:160	NR
21SF-P / T14	NEG	NEG.	NEG.	1:160	POS.
21SF-P / T15	NEG	NEG.	NEG.	1:1280	POS.
21SF-P / T16	NEG	NEG.	NEG.	1:320	POS.
21SF-P / T17	NEG	NEG.	NEG.	1:80	POS.
21SF-P / T18	NEG	POS.	NR	1:80	NR
21SF-P / T19	NEG	POS.	NR	1:160	POS.
21SF-P / T20	NEG	POS.	NR	1:160	POS.

NR: Teste não realizado

## 12.2 INFECÇÃO COM CLONES DACEPA 21SF

### 12.2.1 Análise da Parasitemia

Os camundongos infectados com o clone C6 da cepa 21SF e tratados, apresentaram uma curva parasitêmica com picos irregulares entre o 14<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dia de infecção, enquanto os camundongos controles não tratados apresentaram pico parasitêmicos entre 15<sup>o</sup> e 26<sup>o</sup> dia de infecção. A negatização foi constatada no 39<sup>o</sup> dia de infecção para os animais infectados e tratados e no 60<sup>o</sup> dia de infecção nos controles não tratados (Figura 2A).

Os camundongos infectados com o clone C7 da cepa 21SF e tratados apresentaram uma curva parasitêmica com picos irregulares entre o 10<sup>o</sup> e o 22<sup>o</sup> dia de infecção, enquanto que os camundongos controles não tratados apresentou pico parasitêmicos no 16<sup>o</sup> dia de infecção. A negatização foi constatada no 35<sup>o</sup> dia de infecção para os animais infectados e tratados e no 44<sup>o</sup> dia de infecção nos controles não tratados (Figura 2B).

Os camundongos infectados com o clone C8 da cepa 21SF e tratados, apresentaram uma curva parasitêmica com pico no 14<sup>o</sup> dia de infecção, enquanto que os camundongos controles não tratados apresentou picos parasitêmicos irregulares entre 11<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> dia de infecção. A negatização foi constatada no 31<sup>o</sup> dia de infecção para os animais infectados e tratados e no 46<sup>o</sup> dia de infecção nos controles não tratados. A brusca queda da parasitemia para o grupo controle é devido ao óbito do camundongo responsável pela alta parasitemia (Figura 2C).

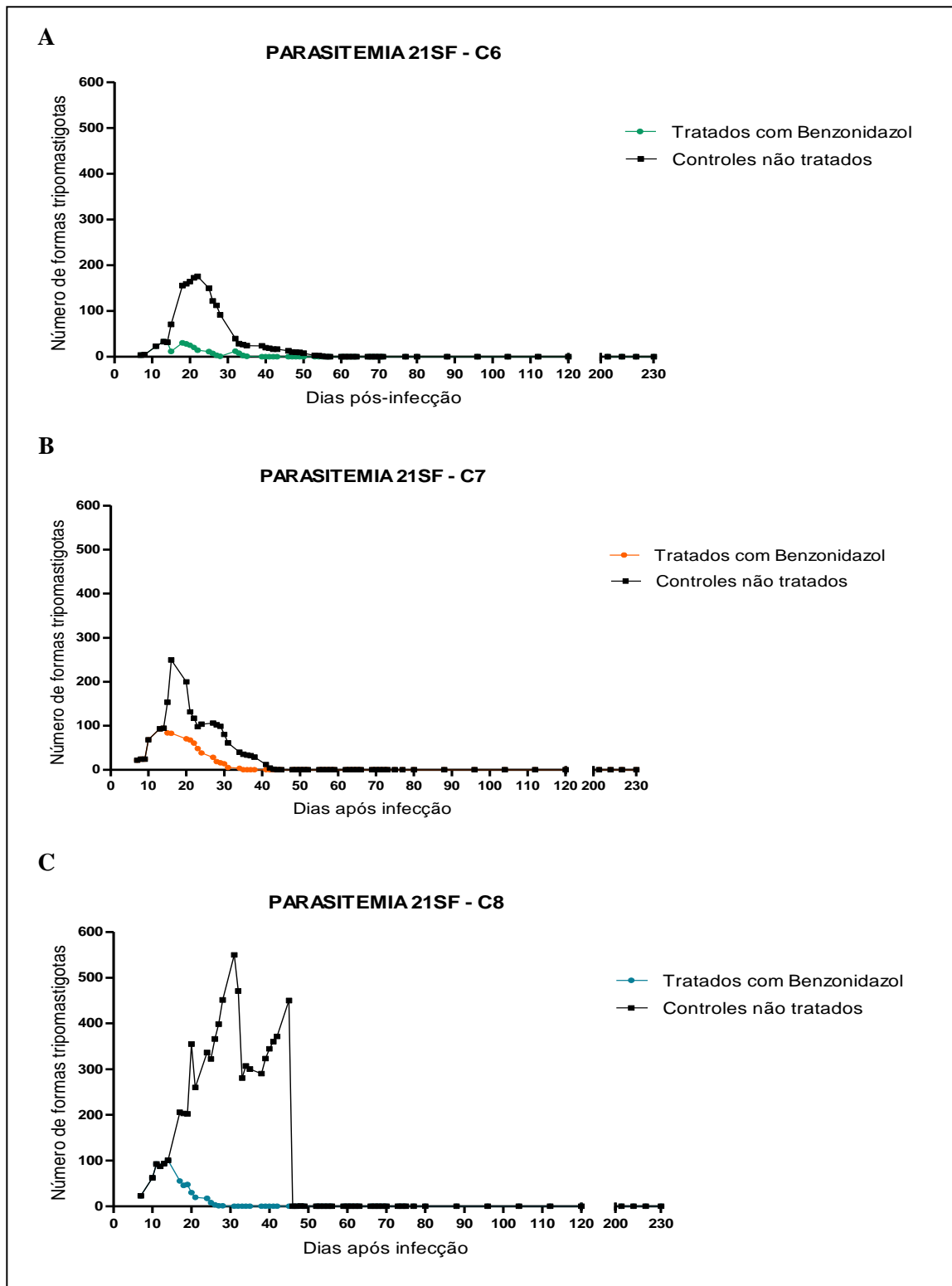
Os dados de cada grupo inoculado com clones da cepa 21SF em comparação com os obtidos com o grupo da cepa parental, não apresentaram diferenças significativas entre eles.

### **12.2.2 Índice de Mortalidade Cumulativa**

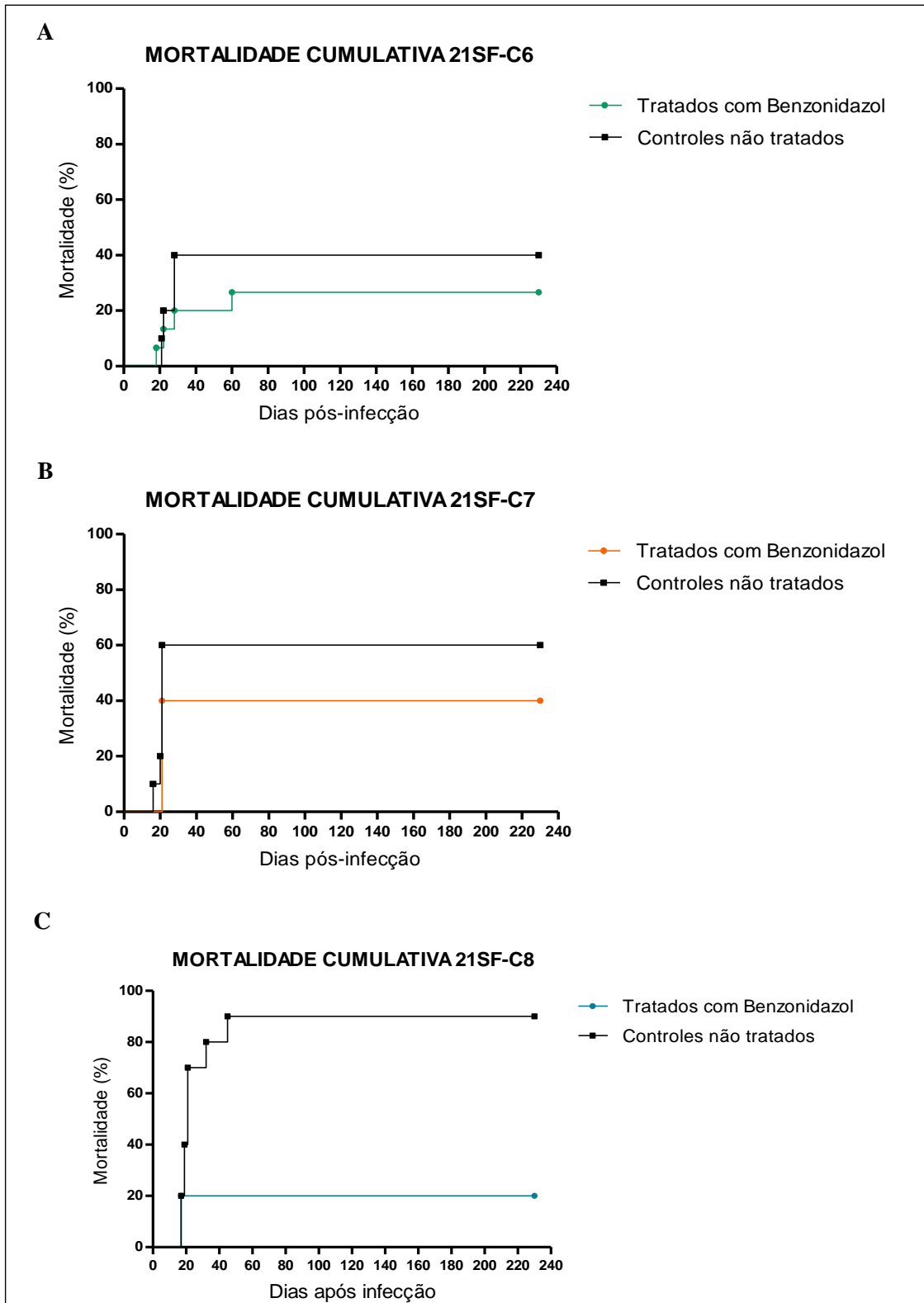
A avaliação dos índices de mortalidade nos animais tratados variou de 26,4% para os camundongos infectados com o clone C6, 40% para o grupo infectado com o clone C7 e 20% pra os camundongos infectados com o clone C8. A mortalidade dos camundongos para os grupos controles não tratados foi de 40%, clone C6; 60%, clone C7; 90%, clone C8 (Figura 3).

### **12.2.3 Resultado dos testes de cura**

Todos os grupos de infecção única com clones da cepa 21SF foram eutanasiados com, aproximadamente, 5 meses após o termino do tratamento. Os camundongos, nos três grupos, apresentaram positividade nos testes parasitológicos. No grupo 21SF-C6 (Tabela 4), os títulos sorológicos variaram de 1:20 a 1:160 e de 1:40 a 1:1280 para o grupo 21SF-C7 (Tabela 5) e no grupo 21SF-C8 variaram de 1:10 a 1:128 (Tabela 6).



**Figura 2** Curvas das médias de parasitemia em camundongos infectados com clones da cepa 21SF do *T. cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/Kg/dia, e grupo controle não tratado. (A) Infecção com o clone 21SF-C6,  $p=0,002^*$ ; (B) Infecção o clone 21SF – C7,  $p=0,04^*$ ; (C) Infecção com o clone 21SF - C8\*,  $p=0,0001$  (\*Teste Mann Whitney).



**Figura 3** Mortalidade Cumulativa (%) em camundongos infectados com clones da cepa 21SF do *T. cruzi*, submetidos ao tratamento com Benzonidazol, 100mg/kg/dia, e controles não tratado. (A) Infecção com o clone 21SF-C6,  $p=0,049^*$ ; (B) Infecção o clone 21SF – C7,  $p=0,119^*$ ; (C) Infecção com o clone 21SF - C8\*,  $p=0,001^*$  (Teste Log-rank).

**Tabela 4** Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com o clone C6 da cepa 21SF do *T. cruzi*, tratados com Benzonidazol, 100 mg/kg/dia.

Código	Parasitológico			Sorológico	Molecular
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI - Títulos	PCR
C6/ T1	NEG	NEG	NEG	1:10	POS.
C6/ T2	NEG	NEG	NEG	1:20	POS.
C6/ T3	NEG	NEG	NEG	1:40	POS.
C6/ T4	NEG	POS	NR	1:40	NR
C6/ T5	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
C6/ T6	NEG	NEG	POS	1:80	POS.
C6/ T7	NEG	POS	NR	1:20	NR.
C6/ T8	NEG	NEG	POS	1:160	POS.
C6/ T10	NEG	POS	NR	1:160	NR.
C6/ T11	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
C6/ T14	NEG	NEG	NEG	1:40	POS.

NR: Teste não realizado

**Tabela 5** Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com o clone C7 da cepa 21SF do *T. cruzi*, tratados com Benzonidazol, 100 mg/Kg/dia.

Código	Parasitológico			Sorológico	Molecular
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI - Títulos	PCR
C7/ T1	NEG	POS	NR	1:320	NR
C7/ T2	NEG	POS	NR	1:1280	NR
C7/ T3	NEG	POS	NR	1:640	NR
C7/ T5	NEG	POS	NR	1:1280	NR
C7/ T6	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
C7/ T7	NEG	POS	NR	1:40	NR
C7/ T8	NEG	POS	NR	1:80	NR
C7/ T9	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
C7/ T10	NEG	NEG	NEG	1:160	POS.

NR: Teste não realizado

**Tabela 6** Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com o clone C8 da cepa 21SF do *T. cruzi*, tratados com Benzonidazol, 100 mg/kg/dia.

Código	Parasitológico			Sorológico	Molecular
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI - Títulos	PCR
C8/ T1	NEG	POS	NR	1:40	NR
C8/ T2	NEG	POS	NR	1:40	NR
C8/ T4	NEG	NEG	NEG	1:10	POS.
C8/ T5	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
C8/ T6	NEG	NEG	NEG	1:1280	POS.
C8/ T7	NEG	NEG	NEG	1:320	POS.
C8/ T8	NEG	NEG	NEG	1:40	POS.
C8/ T9	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
C8/ T10	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
C8/ T11	NEG	NEG	NEG	1:160	POS.
C8/ T12	NEG	NEG	POS	1:1280	NR
C8/ T13	NEG	NEG	POS	1:160	POS.

NR: Teste não realizado

## 12.3 TRIPLICE INFECÇÃO COM CLONES DA CEPA 21SF

### 12.3.1 Análise da Parasitemia

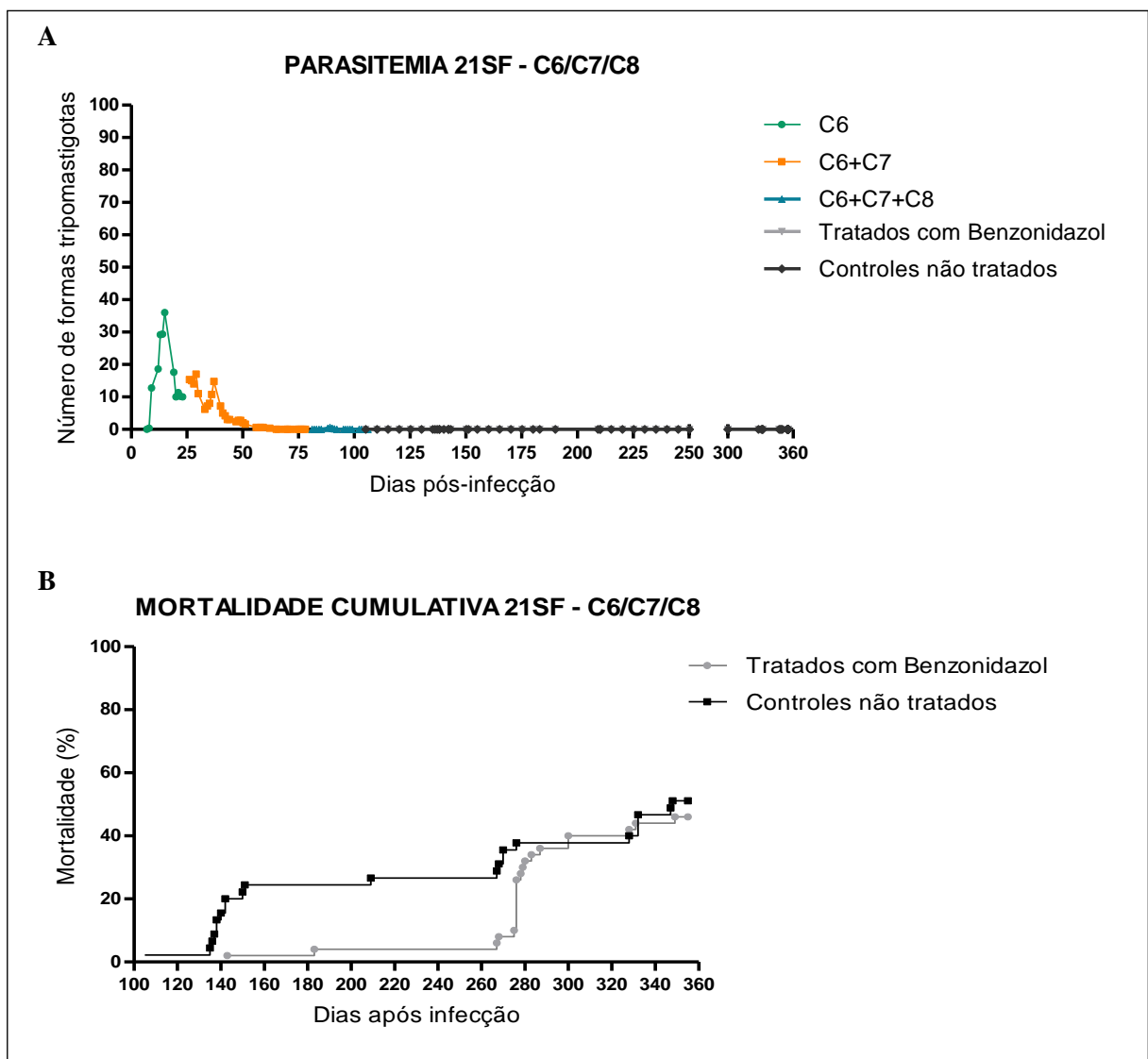
Os camundongos triplamente infectados com clones da cepa 21SF (C6, C7 e C8) apresentaram uma curva parasitêmica com pico entre o 13<sup>o</sup> e o 15<sup>o</sup> dia de infecção, durante a primeira infecção (21SF-C6). Na segunda infecção (21SF-C7) os picos parasitêmicos foram irregulares entre o 4<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia após a segunda infecção ou 29<sup>o</sup> e 37<sup>o</sup> dia após a primeira infecção. Durante a terceira infecção praticamente não houve parasitos no sangue circulante, negatizando a partir do 10<sup>o</sup> dia após terceira infecção com 21SF-C8 (Figura 4A).



### 12.3.2 Índice de Mortalidade Cumulativa

A mortalidade dos camundongos foi de 46% para os camundongos com infecção tríplice e tratados com Benzonidazol e 50,6% para os controles não tratados (Figura 4B).

Os animais só foram subdivididos em grupos tratados e controles não tratados após as três infecções, sendo o tratamento quimioterápico iniciado trinta dias após a última infecção.



**Figura 4** Camundongos triplamente infectados com os clones 21SF - C6/C7/C8 do *T. cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/kg/dia, e controle não tratado. (A) Curvas das médias de parasitemia. (B) Mortalidade Cumulativa (%),  $p=0.45$  (Teste Log-rank).

### 12.3.3 Resultados dos testes de cura

Os camundongos triplamente infectados com os clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF foram eutanasiados com 6 meses após o término do tratamento. Todos os animais apresentaram positividade nos testes parasitológicos. A avaliação sorológica dos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* variou de 1:10 a 1:1280 para os animais infectados e tratados com Benzonidazol (Tabela 7).

## 12.4 TITULAÇÃO SOROLÓGICA - CONTROLES

A avaliação sorológica dos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* nos camundongos controles triplamente infectados com clones da cepa 21SF variou de 1:80 a 1:1280. Já nos animais controles infectados com a cepa 21SF variou de 1:80 a 1:1280 (Tabela 8).

Os títulos sorológicos no grupo 21SF – C6 variaram de 1:160 a 1:640, no grupo 21SF – C7 variaram de 1:320 a 1:1280 e no grupo 21SF – C8 variaram foi de 1:640, todos animais controles não tratados. (Tabela 9).

**Tabela 7** Resultado dos testes de cura parasitológicos, molecular e sorológico dos camundongos suíços inoculados com os clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF do *T. cruzi*, tratados com Benzonidazol, 100 mg/kg/dia.

Código	Parasitológico			Sorológico	Molecular
	Parasitemia	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI - Títulos	PCR
TT / 1	NEG	POS	*	NR	NR
TT / 2	NEG	POS	NR	1:1280	NR
TT / 3	NEG	NEG	NEG	1:20	POS.
TT / 5	NEG	POS	NR	1:10	NR
TT / 7	NEG	NEG.	NEG	1:320	POS.
TT / 8	NEG	NEG	NEG	1:80	NR
TT / 11	NEG	NEG	NEG	1:160	POS.
TT / 12	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
TT / 13	NEG	NEG	NEG	1:320	POS.
TT / 14	NEG	NEG	*	NR	NR
TT / 15	NEG	NEG	*	NR	NR
TT / 16	NEG	POS	NR	1:1280	NR
TT / 17	NEG	NEG.	NEG	1:160	POS.
TT / 18	NEG	NEG	NEG	1:320	POS.
TT / 20	NEG	POS	NR	1:160	NR
TT / 21	NEG	NEG.	*	NR	NR
TT / 23	NEG.	NEG	*	NR	NR
TT / 24	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
TT / 25	NEG	POS	NR	1:640	NR
TT / 27	NEG	NEG.	NEG	1:160	NR
TT / 29	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
TT / 30	NEG	NEG	NEG	1:10	POS.
TT / 32	NEG	NEG	NEG	1:160	POS.
TT / 33	NEG	NEG	NEG	1:80	POS.
TT / 34	NEG	POS	NR	1:640	NR
TT / 35	NEG	POS	NR	1:80	NR
TT / 36	NEG	NEG.	NEG	1:160	POS.
TT / 37	NEG	NEG	NEG	1:80	NR
TT / 39	NEG	NEG	NEG	1:10	POS.
TT / 40	NEG	NEG	NEG	1:160	POS.

\*Óbito

NR: Teste não realizado

**Tabela 8** Titulação sorológica de camundongos triplamente infectados com 3 clones da cepa 21SF e camundongos infectados com a Cepa Parental 21SF do *T. cruzi*, ambos controles não tratados com Benzonidazol.

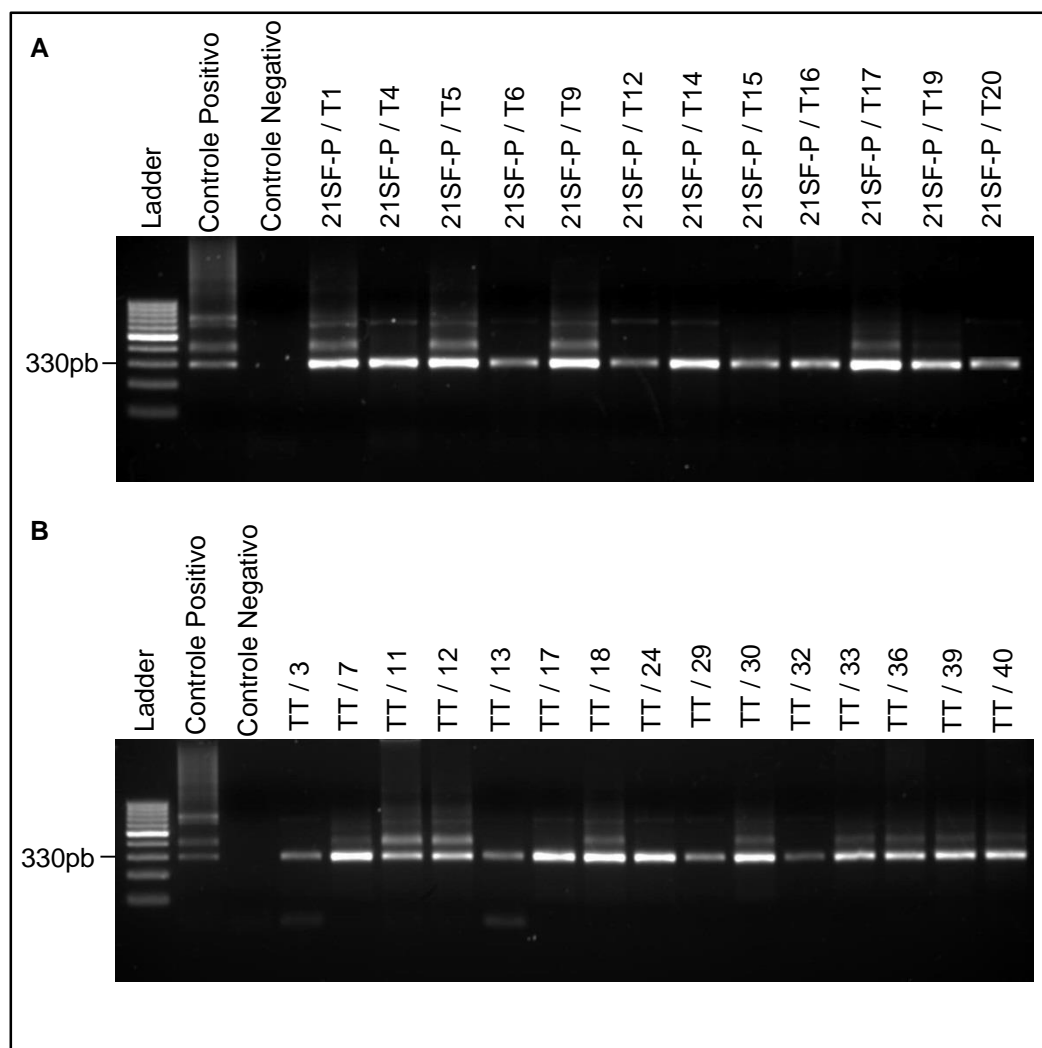
21SF-C6/C7/C8		21SF-P	
Código	Títulos	Código	Títulos
TNT / 1	1:320	21SF-P / NT1	1:1280
TNT / 3	1:1280	21SF-P / NT2	1:1280
TNT / 4	1:320	21SF-P / NT3	1:640
TNT / 5	1:640	21SF-P / NT4	1:640
TNT / 7	1:160	21SF-P / NT5	1:1280
TNT / 9	1:640	21SF-P / NT6	1:640
TNT / 11	1:160		
TNT / 12	1:320		
TNT / 14	1:640		
TNT / 19	1:320		
TNT / 20	1:160		
TNT / 21	1:320		
TNT / 22	1:80		
TNT / 23	1:320		
TNT / 26	1:320		
TNT / 27	1:80		
TNT / 29	1:160		
TNT / 30	1:160		

**Tabela 9** Titulação sorológica de camundongos infectados com clones da Cepa 21SF do *T. cruzi*, controles não tratados com Benzonidazol.

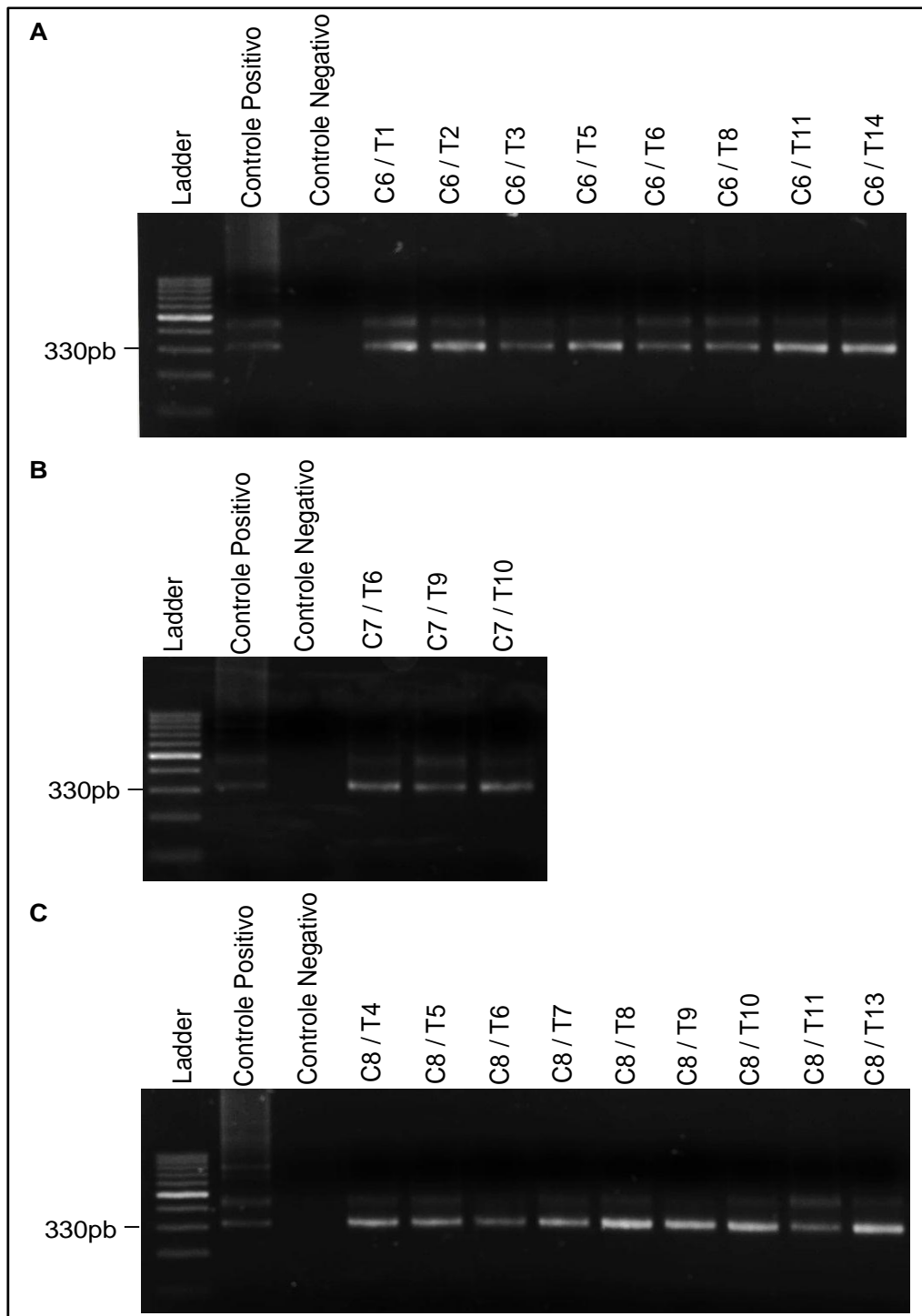
21SF-C6		21SF-C7		21SF-C8	
Código	Índices	Código	Índices	Código	Índices
C6/ NT1	1:320	C7/ NT1	1:640	C8/ NT3	1:640
C6/ NT3	1:640	C7/ NT2	1:1280		
C6/ NT4	1:640	C7/ NT3	1:1280		
C6/ NT5	1:160	C7/ NT5	1:320		
C6/ NT7	1:640				
C6/ NT9	1:320				

## 12.5 AMPLIFICAÇÃO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A amplificação pela PCR revelou a presença de fragmentos de 330pb da amplificação dos fragmentos dos minicírculos do K-DNA, para todos os grupos, tanto os infectados com a cepa Parental 21SF (Figura 1A) e os triplamente infectados com 3 clones da cepa 21SF (Figura 5B), como os controles de infecção com clones isolados C6, C7 e C8 (Figura 6). O controle negativo não apresentou aparecimento de bandas, demonstrando que não houve contaminação por DNA exógeno.



**Figura 5** Amplificação pela PCR e revelação em gel de agarose: K-DNA das amostras dos animais tratados, com teste de cura parasitológica negativos, A: Infecção com a cepa 21SF e B: infecção tríplice, com clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF.



**Figura 6** Amplificação pela PCR e revelação em gel de agarose: K-DNA das amostras dos animais tratados, com teste de cura parasitológica negativos, de infecção única com clones da cepa 21SF. A: Infecção com 21SF-C6; B: Infecção com 21SF-C7; C: Infecção com 21SF-C8

## 12.6 ÍNDICES DE CURA

Os camundongos eutanasiados 5 meses após o término do tratamento, foram avaliados cumulativamente aos testes de cura aos quais foram submetidos. Dessa maneira, os índices de positividade variam de 26,7 a 66,7%, quando analisamos apenas testes parasitológicos e de 72,7 a 100% se analisarmos apenas o teste sorológico (Tabela 10). A Tabela 11 demonstra os índices de cura baseado na combinação entre os testes parasitológicos e sorológico anti-*T. cruzi*, variando de 0 a 18,2%.

**Tabela 10** Resultado da positividade dos testes de cura parasitológicos e sorológicos em camundongos infectados com a cepa 21SF do *T. cruzi* e 3 clones, tratados com Benzonidazol.

Grupo	Inoculo	Parasitológicos		Sorológico	
		Pos. / Total	Pos %	Pos. / Total	Pos %
21SF-P	5 x 10 <sup>4</sup>	8 / 15	54,4	14 / 15	93,4
21SF-C6	5 x 10 <sup>4</sup>	5 / 11	45,4	8 / 11	72,7
21SF-C7	5 x 10 <sup>4</sup>	6 / 9	66,7	9 / 9	100
21SF-C8	5 x 10 <sup>4</sup>	4 / 12	33,4	11 / 12	91,7
TRÍPLICE	1 x 10 <sup>4</sup>	8 / 30	26,7	21 / 25	84

P= Parental; C = clone; Tríplice = 21SF C6+C7+C8; Pos = positividade.

**Tabela 11** Índices de cura em camundongos infectados com a cepa 21SF do *T. cruzi* e 3 clones, tratados com Benzonidazol, baseado na combinação dos testes parasitológicos e sorológicos.

Grupo	Inoculo	Pos. / Total	Índice de cura (%)
21SF - P	5 x 10 <sup>4</sup>	14 / 15	6,6
21SF - C6	5 x 10 <sup>4</sup>	9 / 11	18,2
21SF - C7	5 x 10 <sup>4</sup>	9 / 9	0
21SF - C8	5 x 10 <sup>4</sup>	11 / 12	8,3
Tríplice	1 x 10 <sup>4</sup>	22 / 25	12

P= Parental; C = clone; Tríplice = 21SF C6+C7+C8; Pos = positividade.

## 12.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

No estudo da resposta ao tratamento quimioterápico com Benzonidazol em camundongos com tríplice infecção determinada pela inoculação sucessiva de três clones isolados da cepa 21 SF do *T. cruzi* (Biodema Tipo II, *T. cruzi* II), procurou-se registrar o efeito do tratamento sobre as lesões inflamatórias e necróticas, envolvendo o miocárdio e o músculo esquelético, nos camundongos cronicamente infectados (tratados e não tratados), dos diversos grupos experimentais: 1) infecção única pela cepa parental; 2) infecção única por cada clone estudado; 3) infecção tríplice pelos três clones estudados.

As lesões necrótico-inflamatórias em cada grupo de animais infectados não tratados foram comparadas com os grupos correspondente, tratado com Benzonidazol:

### **12.6.1 Camundongos infectados com a cepa 21SF (parental), grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol**

#### *12.6.1.1 Grupo controle*

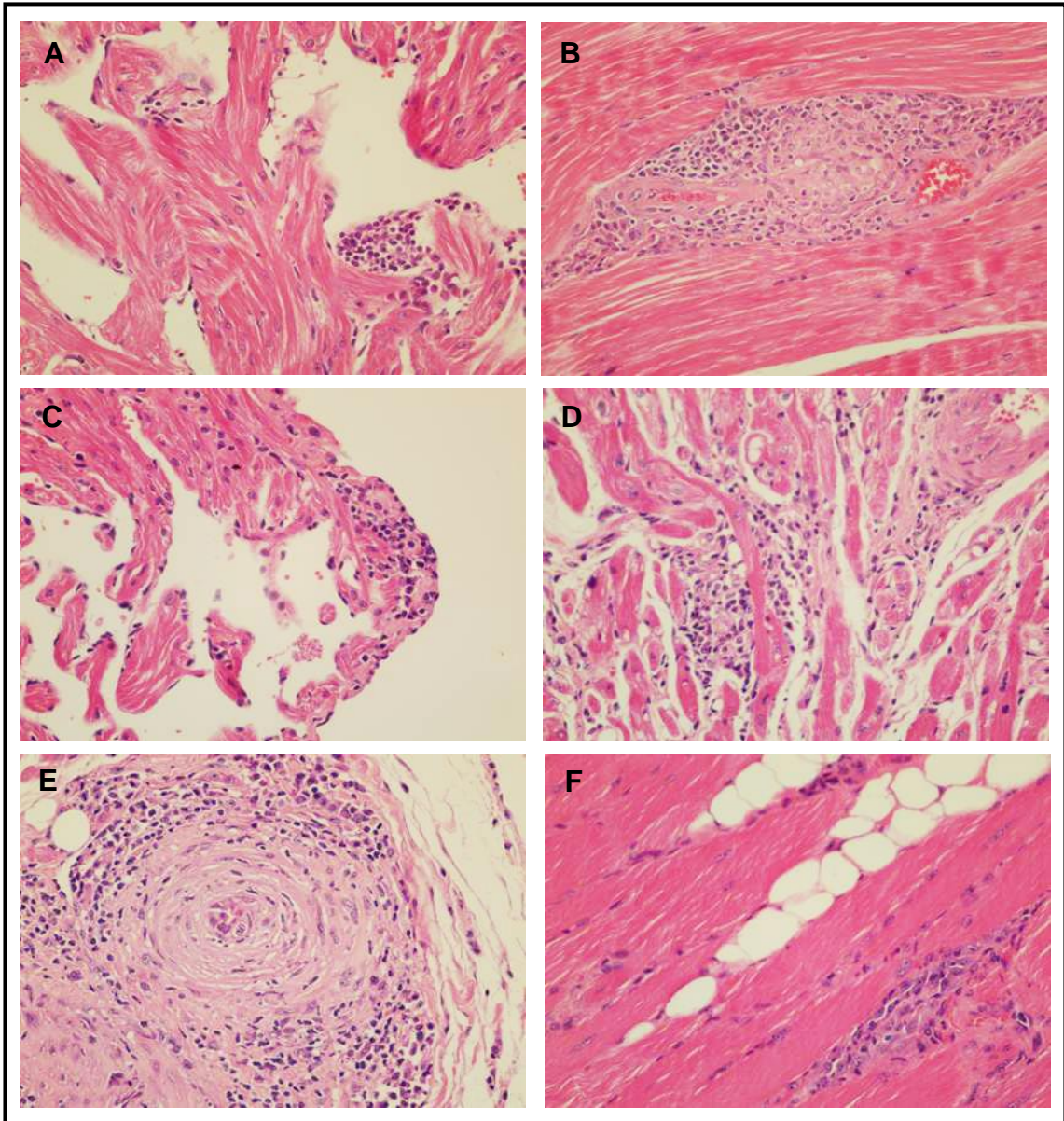
Miocárdio: as alterações inflamatórias foram discretas, representadas por infiltrados focais de células mononucleares, predominando os subepicárdicos em átrios, raramente sendo vistas áreas com moderada infiltração mononuclear difusa, com dissociação das fibras cardíacas. Músculo esquelético: foram observadas lesões inflamatórias periarteriolas variando de discretas a moderadas, focos de hialinização das fibras musculares e focos de calcificação.

#### *12.6.1.2 Grupo tratado com Benzonidazol*

Miocárdio: lesões inflamatórias focais discretas, predominando em átrios, na região subepicárdica; em um caso foram vistas lesões inflamatórias focais moderadas em ventrículos. Músculo esquelético: na maioria dos casos (7/10), não foram vistas alterações histopatológicas; nos demais casos foram vistos infiltrados focais intersticiais discretos e arteriolite isolada.



Em conclusão, a infecção com a cepa parental determinou na fase crônica lesões discretas a moderadas, predominantes em átrios; as lesões crônicas observadas nos animais não tratados e nos tratados, foram semelhantes.



**Figura 7** Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com a cepa 21SF, no 230º dia de infecção, controles não tratados (A e B) e tratados com Benznidazol (C, D, E e F), corados com H & E (400X). A: secção de átrio, com infiltrado mononuclear focal discreto; B: músculo esquelético com lesão inflamatória perivascular moderada; C: secção de átrio com lesões inflamatórias subepicárdicas focais discretas; D: seção de miocárdio com lesões inflamatórias, mononucleares, focais moderadas em ventrículo; E: arteriolite, em músculo esquelético, com acentuado infiltrado perivascular, mononuclear, com oclusão da luz; F: músculo esquelético com lesão inflamatória focal e área de substituição de fibra muscular por adipócito.

## **12.6.2 Camundongos infectados com clones C6 da cepa 21SF, grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol**

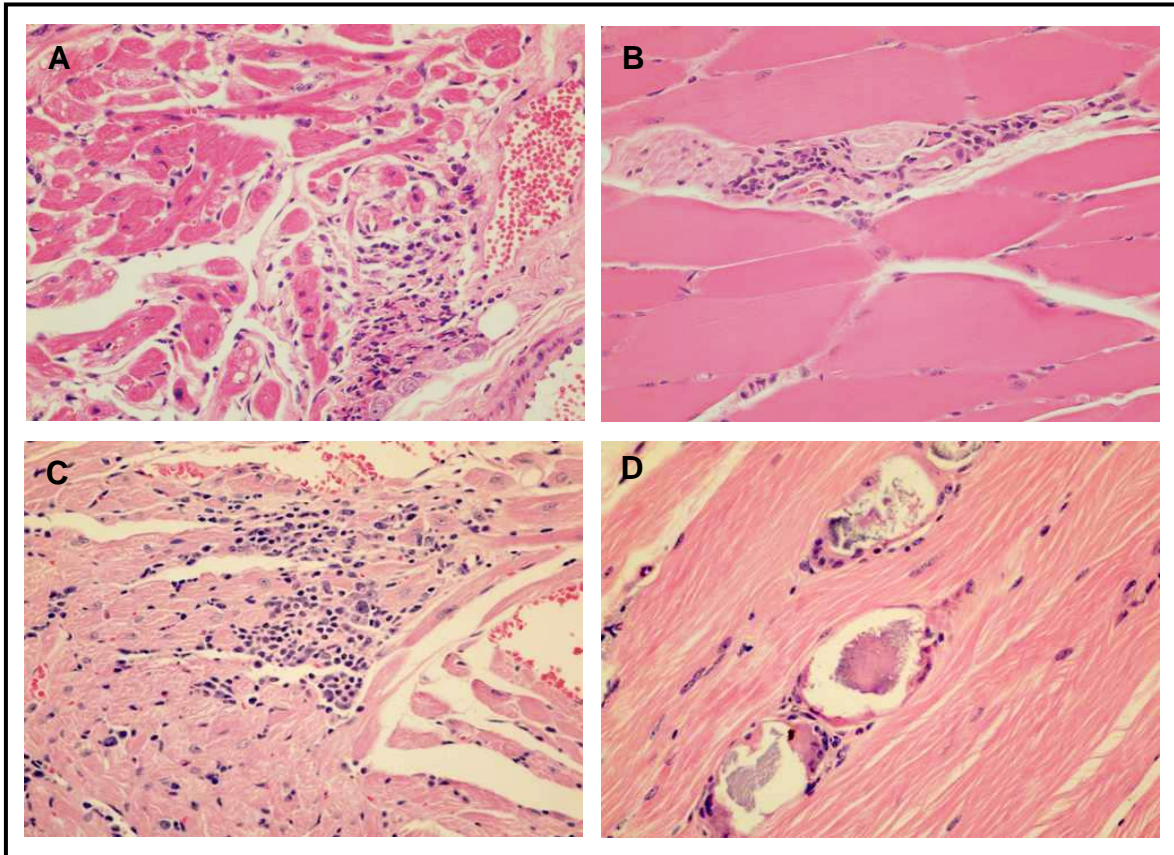
### *12.6.2.1 Grupo controle*

Miocárdio: presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso, moderado e infiltrados focais perivascularares e subepicárdicos discretos no miocárdio, na região dos átrios. Foi vista fibrose intersticial difusa variando de discreta a moderada, excepcionalmente formando uma área extensa de fibrose em ventrículo. Músculo esquelético: havia discretos infiltrados de mononucleares, periarteriolares; em um caso foi vista necrose focal de fibras musculares, com infiltrado inflamatório mononuclear moderado.

### *12.6.2.2 Grupo tratado com Benzonidazol*

Miocárdio: infiltrados inflamatórios focais variando de discretos a moderados, em 11/12 casos, predominando em átrios, sendo difuso em algumas áreas dos ventrículos. Em apenas um caso foi registrada fibrose discreta. Músculo esquelético: em 8/12 casos não foram vistas alterações a não ser por presença de infiltrados mononucleares discretos, focos de calcificação, presença de infiltração adiposa.

Em resumo, as alterações observadas na fase crônica da infecção com o clone C6, foram idênticas às vistas com a cepa parental. As lesões crônicas observadas nos animais não tratados e nos tratados, foram semelhantes.



**Figura 8** Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone C6 da cepa 21SF, no 230º dia de infecção, controles não tratados (A e B) e tratados com Benzonidazol (C e D), corados com H & E (400X). A: infiltrado inflamatório focal perivascular e subepicárdico discreto no miocárdio apresentando fibrose intersticial difusa; B: músculo esquelético mostrando feixe vículo-nervoso com infiltrado mononuclear, perivascular; C: átrio com discreto infiltrado inflamatório difuso e área de moderado infiltrado focal; D: musculo esquelético com áreas focais de necrose com calcificação.

### **12.6.3 Camundongos infectados com clones C7 da cepa 21SF, grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol**

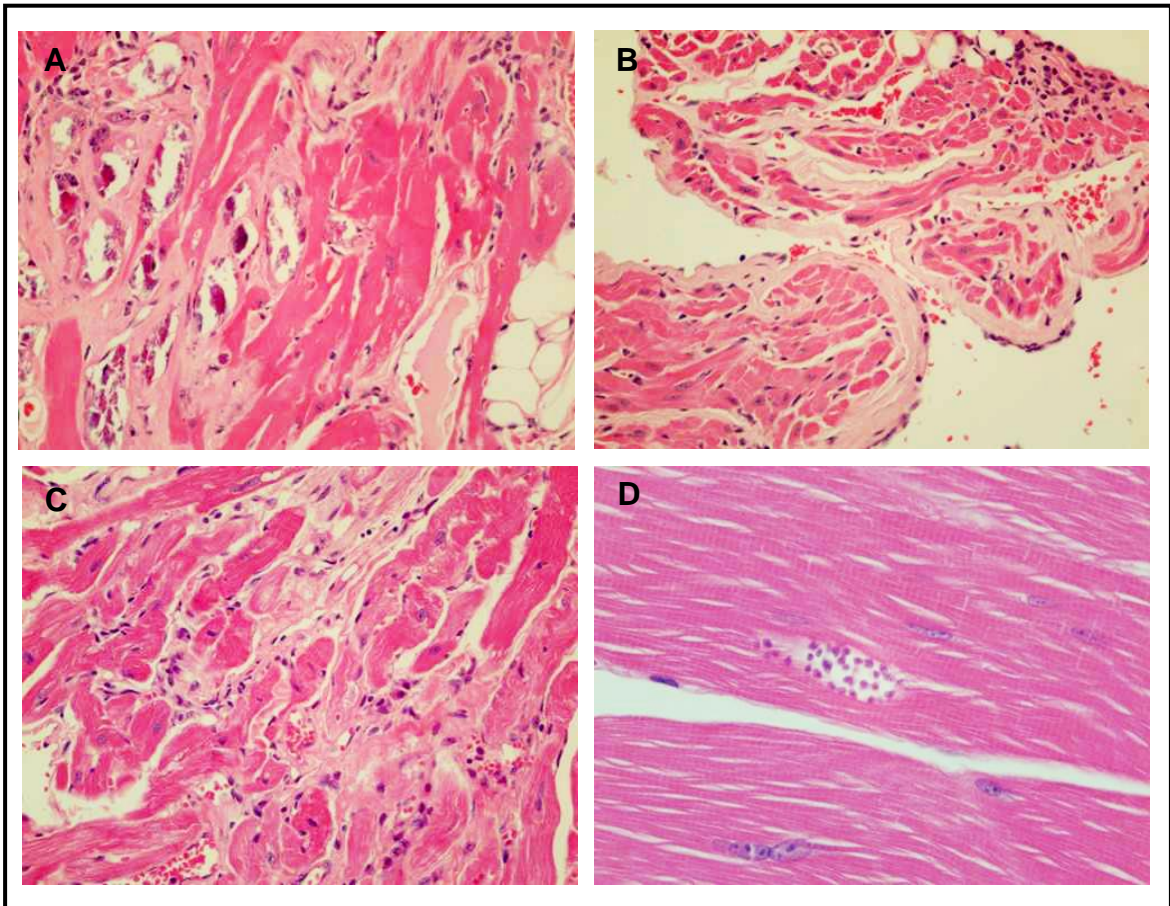
#### *12.6.3.1 Grupo controle*

Miocárdio: em todos os casos o miocárdio mostra infiltrado intersticial mononuclear difuso, discreto em átrios, infiltrados focais discretos e áreas de calcificação. Presença de fibrose moderada, intersticial difusa e subepicárdica; áreas de calcificação e fibrose em torno de grandes vasos da base. Músculo esquelético: sem alterações, a não ser por discreto infiltrado intersticial, focal mononuclear em um caso.

#### *12.6.3.2 Grupo tratado com Benzonidazol*

Miocárdio: presença de infiltrado intersticial discreto, difuso, em átrio, com discreta fibrose intersticial em 3/8 casos. Músculo esquelético: em 6/8 casos não foram vistas alterações com exceção de um caso em que foi visto um ninho parasitário contendo formas amastigotas do *T. cruzi* e infiltrado intersticial difuso e perivascular e hialinização de fibra muscular.

Em conclusão, na infecção pelo clone C7 as lesões foram idênticas às observadas com a cepa parental. Tanto nos animais não tratados como nos tratados observam-se lesões de baixa intensidade, limitadas aos átrios; a fibrose intersticial difusa, moderada, ocorreu apenas nos não tratados. Observou-se diminuição do infiltrado difuso e da fibrose nos animais tratados.



**Figura 9** Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone C7 da cepa 21SF, no 230º dia de infecção, controles não tratados (A e B) e tratados com Benzonidazol (C e D), corados com H & E (400X). A: miocárdio apresentando infiltrados inflamatórios focais discretos, áreas de calcificação e presença de fibrose moderada, intersticial difusa; B: secção de átrio com fibrose intersticial difusa, predominando na região subepicárdica e infiltrado inflamatório focal; C: miocárdio com infiltrado intersticial discreto, difuso, em átrio, com moderada fibrose intersticial; D: secção de músculo esquelético, com ninho parasitário contendo formas amastigotas do *T. cruzi*.

#### **12.6.4 Camundongos infectados com clones C8 da cepa 21SF, grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol**

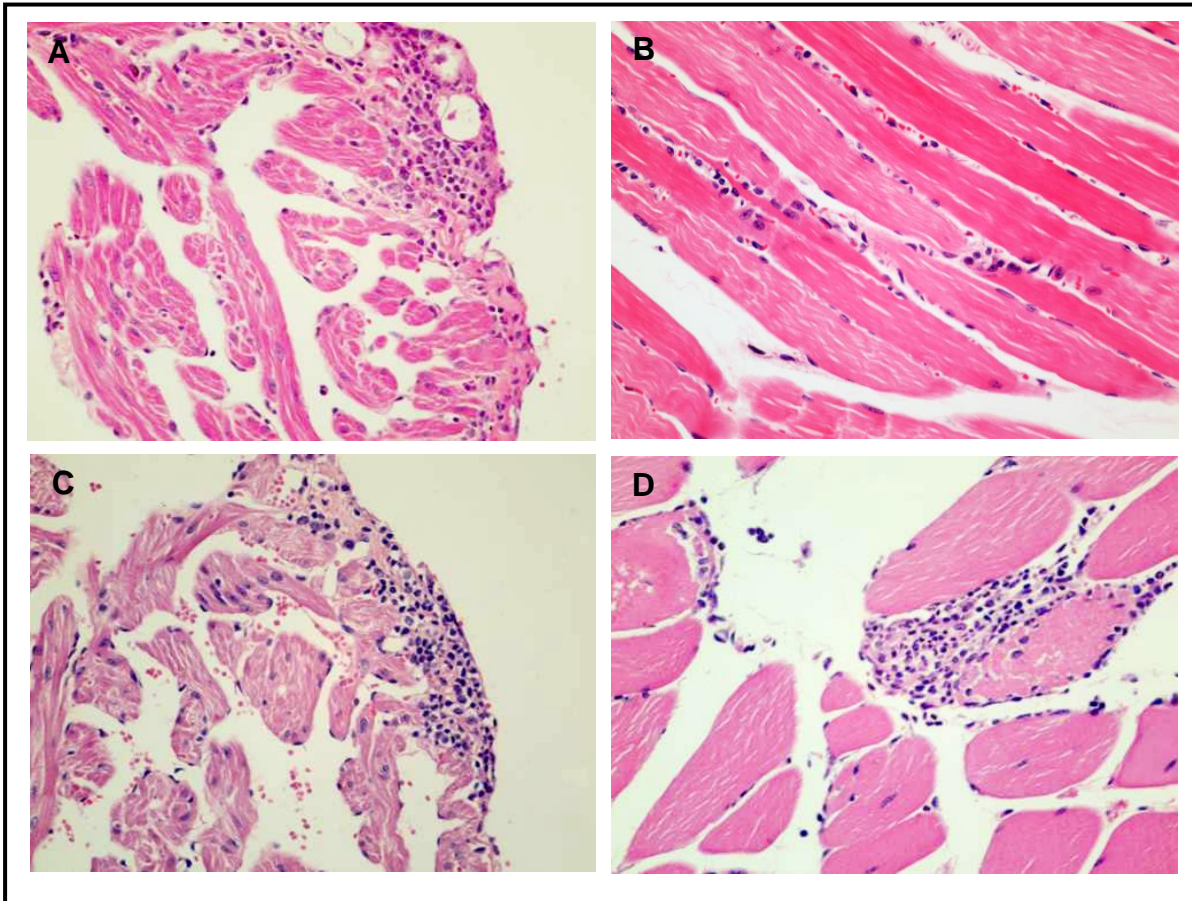
##### *12.6.4.1 Grupo controle*

Miocárdio: difuso e discreto infiltrado mononuclear em átrios e infiltrados focais subepicárdicos. Músculo esquelético: presença de infiltrado intersticial discreto com moderado envolvimento de arteríolas.

##### *12.6.4.2 Grupo tratado com Benzonidazol*

Miocárdio: Na maioria dos casos, (7/13), foi visto infiltrado mononuclear difuso, discreto ou moderado, com adensamentos focais subepicárdicos, restritos aos átrios. Em 4/13 casos o infiltrado foi considerado moderado. Discreta fibrose intersticial. Destruição focal de fibras cardíacas. Músculo esquelético: lesões em geral discretas com infiltrado intersticial difuso. Em um caso foi vista área focal de necrose de fibra muscular com infiltrado de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos.

Em conclusão, no único camundongo não tratado, sobrevivente da fase aguda, havia lesões inflamatórias discretas a moderadas, em miocárdio e em músculo esquelético, semelhantes às observadas no grupo infectado com a cepa parental. Nos camundongos tratados com Benzonidazol foram vistas lesões inflamatórias discretas a moderadas e discreta fibrose intersticial, além de alterações focais de fibras musculares, com necrose e hialinização.



**Figura 10** Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone C8 da cepa 21SF, no 230º dia de infecção, controles não tratados (A e B) e tratados com Benzonidazol (C e D), corados com H & E (400X). A: miocárdio com infiltrado inflamatório mononuclear, difuso e discreto, em átrio e moderado infiltrado focal subepicárdico; B: músculo esquelético apresentando infiltrado inflamatório intersticial discreto; C: átrio com infiltrado inflamatório mononuclear difuso e discreto, e focal moderado subepicárdico; D: músculo esquelético apresentando área focal de necrose de fibra muscular com infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos.



## **12.7.8 Camundongos triplamente infectados com clones C6+C7+C8 da cepa 21SF, grupo controle e grupo tratado com Benzonidazol**

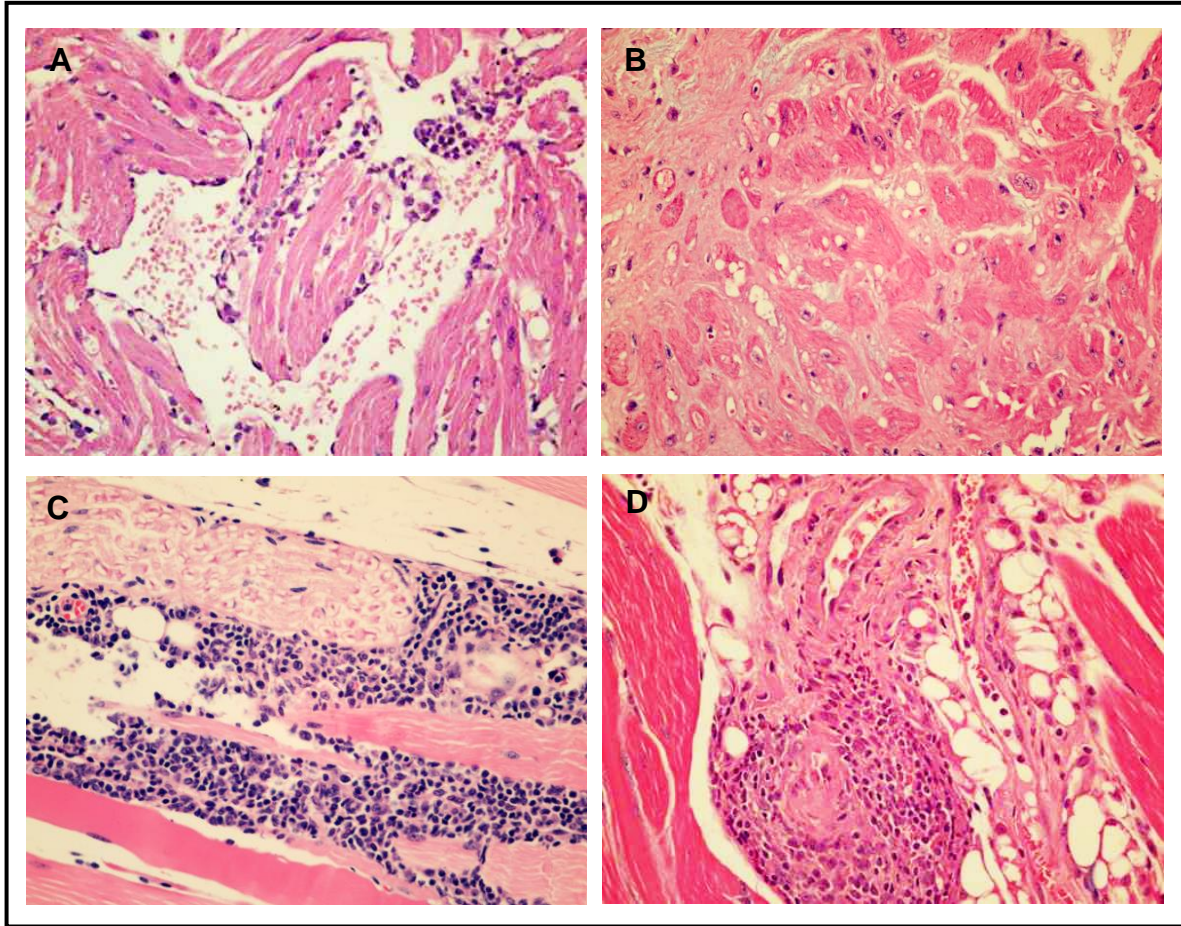
### *12.6.4.3 Grupo controle*

Miocárdio: o exame do coração mostrou lesões variando de discretas e moderadas a intensas, sendo que em 7/18 casos havia apenas infiltrados focais ou difusos discretos. Em 3 casos, as lesões inflamatórias eram intensas em átrios, com miocardite crônica, caracterizada pela presença de infiltrado mononuclear difuso e focal e infiltrados focais. Em 4 /18 casos havia necrose de fibras cardíacas em átrios e ventrículos e fibrose intersticial difusa, com envolvimento de ventrículos. Músculo esquelético: foram vistas intensas alterações, com intenso infiltrado intersticial envolvendo feixe vâsculo-nervoso, necrose de fibras musculares, lesões intersticiais intensas e difusas com arterite acentuada.

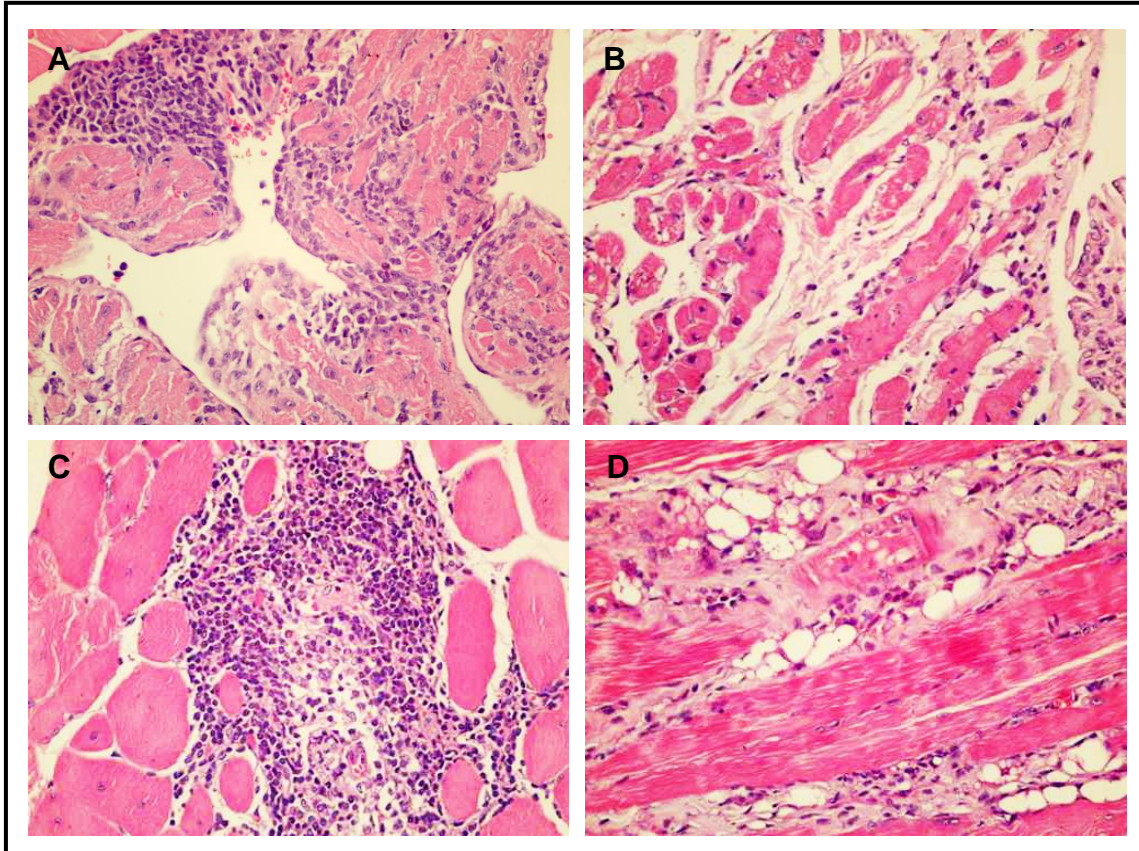
### *12.6.4.4 Grupo tratados com o Benzonidazol*

Miocárdio: Infiltrados focais e difusos no miocárdio, variando de discretos a intensos, com envolvimento de átrios, raramente ocorrendo em ventrículos. Presença de necrose de fibras miocárdicas em 3/20 casos e fibrose difusa, discreta. Músculo esquelético: sem alterações em 11/20 casos e fibrose difusa. Em 4/20 casos o músculo esquelético apresentou áreas de necrose e infiltrados inflamatórios densos, em geral perivasculares.

Em conclusão, nos controles, com tríplice infecção, ao contrário do que ocorreram nos demais grupos, há um comprometimento tanto dos átrios como dos ventrículos, com intensa miocardite crônica, e difusa fibrose intersticial. O músculo esquelético está muito comprometido, por vezes com lesões intensas e difusas, com arterite e lesões intersticiais perivasculares intensas. Nos casos tratados houve nítida redução das lesões inflamatórias tanto em miocárdio como em músculo esquelético.



**Figura 11** Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos triplamente infectados com os clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF, no 350º dia de infecção, controles não tratados, corados com H & E (400X). A: secção do miocárdio com difusa e discreta infiltração mononuclear e infiltrados focais subepicárdicos; B: secção de ventrículo mostrando fibras cardíacas com citoplasma homogêneo e acentuada eosinofilia (necrose hialina) e presença de depósito matricial intersticial denso e difuso; C: secção do músculo esquelético apresentando intenso infiltrado intersticial envolvendo feixe vâsculo-nervoso e destruição de fibras musculares; D: Feixe vascular com arterite e denso infiltrado periarteriolar em músculo esquelético.



**Figura 12** Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos triplamente infectados com os clones C6, C7 e C8 da cepa 21SF, no 350º dia de infecção, tratados com Benzonidazol, corados com H & E (400X). A: átrio com intenso infiltrado mononuclear focal e difuso; B: miocárdio com difuso e moderado infiltrado intersticial e discreto depósito matricial; C: área de destruição focal de fibras musculares substituída por intenso infiltrado mononuclear; D: fibras musculares com desagregação das fibras musculares, substituídas por infiltrado inflamatório intersticial e infiltração adiposa.

### 13. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho confirmam dados anteriormente obtidos que demonstram o agravamento da infecção experimental por infecções sucessivas com diferentes cepas, indicando a importância do controle da transmissão vetorial nas áreas endêmicas. Considerando a relevância da distribuição geográfica de cepas do *T. cruzi*, tem sido constatado que cepas predominantes no Recôncavo Baiano pertencem ao Biodema Tipo II, *T. cruzi* II e apontam para a importância da composição clonal, tendo em vista que as cepas e seus clones podem diferir no seu comportamento biológico e no seu perfil genotípico.

Essa variabilidade comportamental encontrada dentro da espécie *T. cruzi* pode ser explicada por se tratar de uma espécie constituída de múltiplas populações clonais apresentando uma ampla diversidade genotípica e fenotípica, provavelmente decorrente da evolução de múltiplas linhagens (TIBAYRENC et al. 1986, TIBAYRENC & AYALA, 1998; ANDRADE, 1999). Estudos anteriores indicam que os clones da cepa 21SF apesar de apresentarem o mesmo genótipo demonstrado pela técnica do RFLP e mesmo perfil do Biodema (Tipo II, *T. cruzi* II) de seus clones isolados, apresentam diferentes graus de resistência ao quimioterápico Benzonidazol diferindo da cepa parental (CAMPOS et al., 2005).

A estrutura clonal de uma cepa pode ser homogênea embora os clones possam apresentar diferentes graus de virulência, com predominância de um clone principal responsável pelo seu comportamento no animal experimental. As cepas podem apresentar constituição clonal heterogênea e o comportamento no animal experimental, depende das características dos clones predominantes. Vários estudos usando clones de cepas de *T. cruzi* apoiam esta hipótese, inclusive no que diz respeito à resposta terapêutica (TOLEDO et al., 2003; TOLEDO et al., 2004; CAMPOS et al., 2005). Desde o início dos estudos da susceptibilidade da cepa 21SF (Biodema Tipo II, *T. cruzi* II), foi visto que há variabilidade da resposta quimioterápica (28,5 a 100% de cura) entre as diversas cepas existentes na área endêmica de São Felipe, Bahia (ANDRADE et al., 1985) e que os clones desta cepa estudados por Campos et al. (2005) também apresentaram a mesma variabilidade que o estudo anterior.

A demonstração da eficácia do tratamento é muito complexa devido às dificuldades com o estabelecimento de critérios de cura e às limitações dos métodos disponíveis para detectar a cura da infecção pelo *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1991).

Os trabalhos prévios em que os critérios de cura parasitológica foram estabelecidos (ANDRADE et al. 1985), estes foram baseados nos testes de cura parasitológicos, incluindo parasitemia, xenodiagnóstico, hemocultura e subinoculação em camundongos recém-nascidos, combinados com os títulos da sorologia específica e estabelecendo como *cut off* o Título de 1:20. No presente estudo, foram realizados os testes parasitológicos (com exclusão da subinoculação em camundongos recém-nascidos) e o teste sorológico por imunofluorescência indireta.

A definição de cura por sorologia convencional é muitas vezes complicada porque os exames sorológicos podem permanecer positivos por um longo tempo após a cura. Na infecção experimental com *T. cruzi* em camundongos, foi demonstrado anteriormente (ANDRADE et al.,1991), que as células dendríticas foliculares do baço, capturam os antígenos parasitários e os apresentam aos linfócitos B, determinando uma “memória imunológica” que mantém a sorologia positiva. No presente estudo, observou-se em animais tratados com Benzonidazol, a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* em 89,3% (42/47), referente a todos os grupos de infecção única, e 74 % (21/25) no grupo com infecção tríplice. Nos controles não submetidos ao tratamento a positividade foi de 100% em todos os grupos. Na presente investigação, analisando apenas os testes parasitológicos, os resultados aqui obtidos corroboraram essa hipótese de média susceptibilidade apresentada por essa cepa, apresentando índices de cura que variaram de 33,3 a 73,3%. Quando se correlacionam os testes parasitológicos com os títulos sorológicos, os índices de cura variam de 0% a 18,2%.

Mais recentemente tem sido utilizada a técnica da PCR com o objetivo de esclarecer aqueles casos em que os exames parasitológicos permanecem negativos e a sorologia apresenta títulos abaixo do limite estabelecido (1:20). Campos e cols. (2002) investigaram a sensibilidade da PCR para detectar a presença de tripomastigotas adicionados em alíquotas conhecidas de sangue de camundongos normais, mostrando uma alta sensibilidade de detecção da PCR.

A PCR mostrou resultados positivos em casos em que os testes parasitológicos foram negativos, porém não está esclarecido se a positividade da

PCR é devida exclusivamente à presença de DNA de parasitos vivos no sangue do animal, significando uma falha terapêutica, ou de restos de fragmentos do DNA resultantes de parasitos em desintegração devido ao tratamento. No presente estudo a PCR detectou kDNA do parasito em 100% das amostras de sangue provenientes de animais infectados e tratados, com testes parasitológicos negativos. Estes resultados estão de acordo com os demonstrados por Miyamoto et al. (2007), onde a PCR foi capaz de detectar DNA de *T. cruzi* em 100% dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*, independente do genótipo do parasito.

Considerando a frequente ocorrência de reinfecções pelo *T. cruzi* em uma área endêmica e também o fato de que esse tipo de infecção produz alterações significativas na relação parasito-hospedeiro em modelos experimentais, é provável que infecções múltiplas influenciem na eficácia do tratamento etiológico da infecção pelo *T. cruzi*. Nesse contexto, o objetivo dessa investigação foi avaliar a resposta à quimioterapia com Benzonidazol em camundongos com infecção tríplice por clones da cepa 21SF do *T. cruzi*.

O quadro histopatológico da fase crônica, observado no presente estudo, nos animais tratados com Benzonidazol e controles não tratados, submetidos a uma única infecção (grupos controles) com clones da cepa 21SF, revelou lesões que variavam de discretas a moderadas, semelhantes às achadas na infecção única com a cepa parental. Quando submetidos à infecção tríplice, esses animais demonstraram uma exacerbação das lesões tanto no miocárdio quanto no músculo esquelético, sendo que neste último, apresentaram lesões mais intensas. Andrade et al. (2006), estudando o papel das reinfecções com diferentes cepas do *T. cruzi* observaram que as inoculações sucessivas poderiam influenciar nos mecanismos de resposta imunológica no camundongo, potencializando e intensificando a resposta inflamatória, demonstrando que houve uma intensificação das lesões encontradas em camundongos triplamente infectados.

Embora as cepas do Biodema Tipo II tenham alta variabilidade na sua resposta ao quimioterápico, é de se supor que o comportamento das mesmas esteja dependendo da predominância de um clone principal provavelmente resistente. Desta mesma cepa foram previamente isolados clones com diferenças na sua resposta ao Benzonidazol (CAMPOS et al., 2005), embora mantendo o mesmo padrão biológico e o mesmo padrão na análise do RFLP.

Tendo em conta a resistência ao tratamento em diferentes cepas, podemos referir que as cepas do Tipo II demonstraram uma variabilidade muito ampla na resposta quimioterápica; estas cepas foram classificadas como medianamente susceptíveis podendo ser necessária uma avaliação individual devido à vasta gama de respostas encontradas (ANDRADE et al., 1985).

A resistência do *T. cruzi* ao Benzonidazol tem sido descrita como um fator importante para explicar as baixas taxas de cura detectadas em pacientes chagásicos (OLIVEIRA et al., 2008). As observações relacionadas à constituição clonal da cepa 21SF (Biodema Tipo II), em estudos anteriores por Campos e Andrade (1996), têm mostrado uma homologia entre os clones isolados. Pacheco e Brito (1999) estudando a população de parasitos em camundongos, revelaram a evidência de que o polimorfismo em sequências de minicírculos pode surgir durante a infecção com um único clone de *T. cruzi*. Considerando que a característica genética pode ser um dos fatores que modulam a resposta ao Benzonidazol no processo de resistência/sensibilidade, a variação da susceptibilidade observada pode refletir nessa plasticidade genética do *T. cruzi*, já demonstrada por vários autores (PACHECO & BRITO, 1999).

Caldas et al. (2008) demonstraram que a indução de resistência de cepas do *T. cruzi* ao Benzonidazol também pode ocorrer durante a infecção por longo tempo no hospedeiro vertebrado, e submetido a sucessivas passagens em camundongos, na ausência do tratamento. Isto pode explicar, em parte, a ausência de cura observada em indivíduos com doença de Chagas crônica tratados com Benzonidazol.

A eficácia e a indicação do tratamento etiológico específico para a doença de Chagas ainda são temas controversos, pois muitos autores recomendam o tratamento tanto na fase aguda quanto na crônica, enquanto outros afirmam que somente na fase aguda se terá sucesso terapêutico, isso devido à escassez de evidências de estudos utilizando modelos experimentais ou de pacientes chagásicos crônicos. Os dados sugerem que a partir de um ponto de vista sorológico e parasitológico, as taxas de cura determinadas pelo tratamento são altamente variáveis na fase crônica da doença (COURA, 2003; RASSI JR et al., 2012). Visando estudos que avaliem a eficácia do tratamento etiológico da doença de Chagas em pacientes crônicos cardíacos e sua evolução clínica, está em andamento uma nova investigação multicêntrica, internacional, randomizada, duplo-

cego e controlada por placebo, com duração de 5 anos, denominado de BENEFIT - BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (MARIN-NETO et al., 2008).

A comprovação da cura no tratamento da doença de Chagas em humanos e a determinação de métodos seguros para comprovar a erradicação do parasito no animal experimental utilizado para os testes de eficácia de novas drogas são dados essenciais para a avaliação da eficácia do tratamento.

A comprovação da cura nos modelos experimentais permite uma avaliação mais aprofundada dos efeitos do tratamento sobre as lesões determinadas pela infecção, não só em relação ao processo inflamatório como em relação à regressão da fibrose cardíaca após tratamento curativo (ANDRADE et al., 1991).

No presente trabalho, comparando-se os resultados obtidos pela combinação dos testes parasitológicos e sorológicos (que revelaram índices baixos a médios de cura), com os resultados da PCR, que revelaram índice de cura nulo, pode-se constatar o fato de que os critérios de cura devem ser melhor avaliados e que nem sempre os métodos empregados respondem à pergunta fundamental sobre a cura parasitológica, que corresponderia à eliminação dos parasitos do organismo. Deste modo, o acréscimo do teste da PCR como um método diagnóstico poderia revelar a presença de fragmentos de DNA parasitário ou de parasitos em desintegração, e não de parasitos vivos, falseando o resultado do diagnóstico de cura parasitológica. Entretanto o real significado da positividade da PCR deve ser avaliada, com o estabelecimento do prazo pós-tratamento necessário para que fragmentos do DNA parasitário decorrentes da desintegração do *T. cruzi* pelo tratamento, e que podem ser seqüestrados por células dendríticas foliculares no baço ou células dendríticas intersticiais do coração, sejam eliminados destes tecidos para que os dados sejam interpretados corretamente.



## 14. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados da quimioterapia com Benzonidazol em animais triplamente infectados, considerando os testes parasitológicos e sorológicos, revelaram baixos índices de cura;
- 2) O tratamento com Benzonidazol dos animais com infecção única, pela cepa parental e pelos clones da cepa, também determinou baixos índices de cura quando considerados os testes parasitológicos e sorológicos;
- 3) Todos os animais controles, infectados, não tratados, dos diferentes grupos experimentais, apresentaram títulos mais elevados de anticorpos anti-*T. cruzi* quando comparados aos animais tratados com Benzonidazol;
- 4) A técnica da PCR apresentou elevada sensibilidade, revelando índices nulos de cura, quando comparada à combinação dos testes parasitológicos com sorológicos, que revelaram índices baixos de cura;
- 5) Houve um agravamento nas lesões miocárdicas e de músculo esquelético nos camundongos submetidos a tríplice infecção com clones obtidos da cepa 21SF, não submetidos a tratamento, em comparação com os tratados; Observou-se intensificação das lesões necrótico-inflamatórias do coração e músculo esquelético em camundongos triplamente infectados quando comparados aos camundongos dos grupos controle, de infecção única.

## 15. REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosomacruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, S. G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 39-46, 1985.

ANDRADE, S. G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 185-187, 1999.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, V.; ROCHA, F. D. F; BARRAL, M. N. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 23, p. 245-250, 1981.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; SOUZA, K. S. C.; MAGALHÃES, J. B; GUEDES, R. S. P.; GUERREIRO, M. L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi* , of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice  
Reinfecções com cepas do *Trypanosoma cruzi* de diferentes biotomas como fator agravante da miocardite e miosite em camundo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2006.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; STEINDEL, M.; GUERREIRO, M. L.; MAGALHAES, J. B.; ALMEIDA, M. C.; REIS, J. N.; SANTOS, V. C.; VALADARES, H. V. S.; GALVÃO, M.; MACEDO, A. M. . Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: its correspondence with the new *T. cruzi* Taxonomy Consensu. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 948-56, dez 2011.

ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L.; CAMPOS, R. F.; ANDRADE, Z. A. Recuperação e caracterização de tripanosomas inoculados em animais imunes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 12, p. 395-402, 1970.

ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M. Experimental study on the therapeutic action of Ro 7-1051 on infections caused by different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 19, n. 5, p. 335-341, 1977.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 27-35, 1997.

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. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 4, p. 721-726, 1985.

ANDRADE, S. G.; PIMENTEL, A. R.; ANDRADE, Z. A. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 64-70, 2000.

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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 6, p. 624-6, 1992.

ANDRADE, S. G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A. S.; GRIMAUD, J. A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 187-200, 1991.

ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; CAMPOS, R. F. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 70, p. 32-42, 1970.

ANDRADE, S.G.; FREITAS, L.A.R.; PEYROL, S.; PIMENTEL, A.R; SADIGURSKY, M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 69, n. 2, p. 191-197, 1991.

ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S. G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6, p. 796-799, 1983.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; CORREA, R.; SADIGURSKY, M.; FERRANS, V. J. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 144, n. 6, p. 1403-1411, 1994.

AVILA, H.; GONÇALVES, A.M.; NEHME, N.S.; MOREL, C. M. . S. L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR- amplified minicircle variable region sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, p. 175-188, 1980.

BERTOLI, M.; ANDO, M. H.; TOLEDO, M. J. O.; ARAUJO, S. M.; GOMES, M. L. Infectivity for mice of *Trypanosoma cruzi* I and II strains isolated from different hosts. **Parasitology Research**, v. 99, n. 1, p. 7-13, 2006.

BRASIL. **Doença de Chagas – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde público**. Ministério ed. Brasília: , Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids., 1998. p. 76

BRASIL. **Vigilância em saúde: zoonoses**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. , 2009

BRENER, Z. **Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi***.pdf. . [S.l.]: Revista do Instituto de Medicina Tropical. , 1967

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Guanabara ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2000. p. 431

BRITTO, C. **Doença de Chagas. Diagnóstico Molecular da doença de Chagas**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=168>>. Acesso em: 12 out. 2012.

BUSTAMANTE, J. M.; RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; PALMA, J. A.; PAGLINI-OLIVIA, P. A. Trypanosoma cruzi reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 889-896, 2002.

CALDAS, S.; SANTOS, F. M.; LANA, M.; DINIZ, L. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VELOSO, V. M.; BAHIA, M. T. Trypanosoma cruzi: acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 3, p. 315-23, mar 2008.

CAMANDAROBA, E. L. P. .; REIS, E. A. G.; GONÇALVES, M. S.; REIS, M. G.; ANDRADE, S. G. Trypanosoma cruzi: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 201-209, 2003.

CAMANDAROBA, E. L.; CAMPOS, R. F.; MAGALHÃES, J. B.; ANDRADE, S. G. Clonal structure of Trypanosoma cruzi Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 151-157, 2001.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 8, p. 227-235, 1966.

CAMPOS, R. F. . **Estudo de populações clonais provenientes de Cepa de trypanosoma cruzi, isoladas da área endêmica da Doença de Chagas, após longa permanência em laboratório.** [S.l.]: Instituto Oswaldo Cruz, 1997.

CAMPOS, R. F.; GONÇALVES, M. S; REIS, E. A.; 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 of predominance of a principal clone in this area. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 23-29, 1999.

CAMPOS, R. M.; ANDRADRE, S. G. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 795-800, 1996.

CAMPOS, R.F.; GUERREIRO, M. L. S.; SOBRAL, K. S. C.; LIMA, R. C. P. C.; ANDRADE, S. G. Response to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biodeme Type II, *Trypanosoma cruzi* II). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 142-146, 2005.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico. **Cardiopatia chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985. p. 327-355.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico da doença de Chagas crônica pelo Benzonidazol. **Revista de Patologia Tropical Patol Trop**, v. 27, p. 21-23, 1998.

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 morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHIARI, E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 94 (Suppl.), p. 299-300, 1999.

COURA, J. R. Tripanosomose , Doença de Chagas. **Ciência e Cultura.**, v. 1, n. 4, p. 30-33, 2003.

COURA, J. R. & DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol.104 supl.1, 2009.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-54, jul 2009.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, jan 2002.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 171-176, 2002.

DEVERA, R. FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should Trypanosoma cruzi be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2003.

DIAS, J. C. P. **Atualidade de Carlos Chagas. Os 90 anos do descobrimento e a importância social da doença de Chagas.** Disponível em: <<http://www.prossiga.br/chagas>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. p. 486

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (ORG. . **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas.** 20. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. p. 486

DIAS, J. C. P.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 193-196, 2008.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 287-292, 2008.

DVORAK, J. A. Single cell isolates of Trypanosoma cruzi: how an why? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p. 28-38, 1985.

ENGEL, J. C.; DVORAK, J. A.; SEGURA, E. L.; CRANE, M. S. Trypanosoma cruzi: biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. **The Journal of protozoology**, v. 29, n. 4, p. 555-560, 1982.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, P. T. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo Triatoma infestans no Brasil: um fato histórico. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, 39(5), 507–509, 2006.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental Trypanosoma cruzi infections. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 293-297, 1982.

KROPF, S; MASSARANI, L. **Carlos Chagas, a ciência para combater doenças tropicais**. Museu da V ed. Rio de Janeiro: [s.n.], p. 16, 2009.

LENT, H. ET AL. Addenda et corrigenda. In: AL, C. R. ET (Ed.). **Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 1183–1192, 1999.

LUQUETTI, A. & RASSI, A. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo Trypanosoma cruzi. In: **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas** - Z Brener, Z Andrade, M Barral-Neto (eds),, 2º ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 344-378, 2000.

MACEDO, V. O. **Influência da exposição a reinfecção na evolução da doença de Chagas. Estudo longitudinal de 5 anos. Tese (Doutorado)**. [S.l: s.n.], 1973.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of Trypanosoma cruzi: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, 1998.

MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. J.; MURTA, S. M.; VITOR, R. W.; CAMILO, D. J.; PINHEIRO, S. W.; LOPES, E. R.; ADAD, S. J.; ROMANHA, A. J.; DIAS, J. C. P. A study of experimental reinfection by Trypanosoma cruzi in dogs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 958-965, 2001.

MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L.; ANDRADE, S. G. Comportamento das cepas Y e Peruana do Trypanosoma cruzi no camundongo, após passagem em diferentes meios. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 41-50, 1985.



MARIN-NETO, J. A.; RASSI JUNIOR, A.; MORILLO, C. A.; AVEZUM, A.; CONNOLY, S. J.; SOSA-ESTANI, S.; ROSAS, F.; YUSUF, S. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American Heart Journal**, v. 156, n. 1, p. 37-43, 2008.

MARRETTO, J. P. M.; ANDRADE, S. G. Biochemical behavior of Trypanosoma cruzi isolated from mice submitted to specific chemotherapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 209-215, 1994.

MARTINS, H. R.; TOLEDO, M. J. O.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Trypanosoma cruzi: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 237-46, abr 2006.

MENEGHELLI, U. G. Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. **Brazilian journal of medical and biological research Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas Sociedade Brasileira de Biofisica et al**, v. 18, n. 3, p. 255-264, 1985.

MILES, M. A.; LANHAM, S. M.; SOUZA, A. A.; POVOA, M. Further enzymic characters of Trypanosoma cruzi and their evaluation for strain identification. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 2, p. 221-237, 1980.

MIYAMOTO, C. T.; GOMES, M. L.; MARANGON, A. V.; ARAUJO, S. M.; LIBERATI, A. P. T.; CABRAL, R. F. P.; BAHIA, M. T.; LANA, M.; TOLEDO, M. J. O. Reação em cadeia da polimerase ( PCR ) no diagnóstico da infecção pelo Trypanosoma cruzi em camundongos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 4, p. 275-278, 2007.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MOREL, C. M.; DEANE, M. P.; GONÇALVES, A. M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. **Parasitology today Personal ed**, v. 2, n. 4, p. 97-101, 1986.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.

MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. **Parasitology**, v. 116 ( Pt 2, p. 165-171, 1998.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA JUNIOR, A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento Etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

PACEHCO, R. S.; BRITO, C. M. Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 199-201, jan 1999.

RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-91, jun 2012.

ROCHA FILHO, F. D. **Estudo Comparativo de Cepas do T. cruzi de Diferentes Procedências (Aspéctos Antigênicos, Morfológicos e Histopatológicos)**. [S.l.]: MSc Thesis, Universidade Federal da Bahia, Salvador,, 1979.

ROMANHA, A. L. **Heteropatogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi***. [S.l.]: Universidade Federal de Minas Gerais, 1982.

ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L.; SOEIRO, M.N.C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVEIRI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROME, Z. A. In vitro and in vivo experimental models for

drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233-8, mar 2010.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 1-27, 1999.

SHIKANAI-YASUDA, M. A; CARVALHO, N. B. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**. 54(6): 845-852, 2012.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 363-382, 1987.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, p. 141-152, 1996.

STEINDEL, M.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. Doença de Chagas – mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v. 37, p. 34-40, 2005.

STERMAYER, A. L.; PASSOS, A. D. C.; SILVEIRA, A. C.; FERRERIA, A. W.; MACEDO, V.; PRATA, A. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.44 Suppl 2:S108-21, 2011.

TESTON, A. P. M., MONTEIRO, W. M., REIS, D., BOSSOLANI, G. D. P., GOMES, M. L., DE ARAÚJO, S. M., BAHIA, M. T., BARBOSA, M. G. V. AND TOLEDO, M. J. O. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. **Tropical Medicine & International Health**, 18: 85–95, 2013.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **Int J Parasitol**, v. 28, p. 85-104, 1998.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a Population Genetics of Micro- organisms : The Clonal Theory of Parasitic Protozoa. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 228-232, 1991.

TIBAYRENC, M.; BRENIERE, S. F. Trypanosoma cruzi: major clones rather than principal zymodemes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83 Suppl 1, p. 249-255, 1988.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 115-9, jan 1986.

TOLEDO, J. M. O.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TIBAYRENC, M.; BARNABE, C.; TAFURI, W. L.; LANA, M. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for Mice Infected with Different Trypanosoma cruzi Clonal Genotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 233-30, 2003.

TOLEDO, M. J. O.; BAHIA, M. T.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ALVES, C. F.; MARTINS, H. R.; CRUZ, R. E.; TAFURI, W. L.; LANA, M. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different Trypanosoma cruzi clonal genotypes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 1045-53, jun 2004.

WARREN, L. G. Metabolism of Schizotrypanum cruzi Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **Journal of Parasitology**, v. 46, p. 529-39, 1960.

WHO. **Control of Chagas' disease**. . Geneva: Technical Report Series 905. , 2002

WHO. **Chagas disease ( American trypanosomiasis )**. . [S.I.]: Fact sheet, 340. , jun 2010

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.