

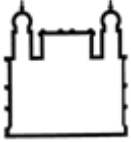
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“INFLUÊNCIA DE CITOCINAS E CÉLULAS DO SISTEMA
IMUNE NA ATIVIDADE DO INIBIDOR DA BIOSÍNTESE
DE ERGOSTEROL (POSACONAZOL) NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*”**

por

MARCELA LENCINE FERRAZ

Belo Horizonte – MG
Fevereiro de 2005.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**INFLUÊNCIA DE CITOCINAS E CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE
NA ATIVIDADE DO INIBIDOR DA BIOSÍNTESE DE
ERGOSTEROL (POSACONAZOL) NA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi***

por

MARCELA LENCINE FERRAZ

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre em Ciências, sub-área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Alvaro José Romanha

Belo Horizonte – MG
Fevereiro de 2005

FICHA CATALOGRÁFICA

FERRAZ, Marcela Lencine

“Influência de citocinas e células do sistema imune na atividade do inibidor da biossíntese de ergosterol (Posaconazol) na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.”. Belo Horizonte, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, 2005.

V, 87p.

Dissertação: Mestrado em Ciências da Saúde

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Quimioterapia experimental 3. Posaconazol 4.
Benzonidazol 5. Citocinas 6. Linfócitos 7. Camundongos knockouts

- I. Centro de Pesquisas René Rachou
- II. Mestre

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Esta dissertação intitulada:

“ Influência de citocinas e células do sistema imune na atividade do inibidor da biossíntese de ergosterol (Posaconazol) na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*”

apresentada por

Marcela Lencine Ferraz

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Alvaro José Romanha – Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ (Orientador)

Dra. Silvane Maria Fonseca Murta – Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ
(Membro titular)

Dr. Mauro Martins Teixeira – Universidade Federal de Minas Gerais (Membro titular)

Dra. Héliida Monteiro de Andrade – Universidade Federal do Piauí e Centro de Pesquisa
René Rachou/FIOCRUZ (Membro suplente)

Dissertação defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2005.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Alvaro José Romanha pela oportunidade de trabalho, orientação e principalmente pelo apoio dispensado sempre que precisei;

À Rosana de Oliveira Alves pela amizade e grande colaboração prestada neste trabalho;

À Maureen Rodarte pela amizade e pela ajuda constante;

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular: Fê Barbosa, Lú, Fê Freire, Silvane, Daniel, Bernardo, Flávio, Nilton, Kênia, Juciane, Marcilene, Sara, Lívia, Regina, Héliida, Paula, Carol, Fernanda Ludolf, Mariana, Taís, Núbia, Guilherme, Diana e Sílvia pelos ótimos momentos de convivência;

Aos colegas de Pós-graduação pelo bom convívio durante o período em que cursamos as disciplinas e em todos os momentos;

À Coordenadoria de Pós-graduação do Centro de Pesquisas René Rachou, representada pela coordenadora Dra. Virgínia Torres Schall, pela possibilidade de integrar o curso e por todo o apoio oferecido;

Aos funcionários do biotério Kátia, Marcílio, Jaci, D. Vera, Kelly, Vanderlei e S. Zé pelo apoio técnico;

Ao Segemar, pela empenho em conseguir os artigos que solicitei, e à Carol, pela paciência e auxílio na análise estatística;

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, representado por seu diretor Dr. Roberto Sena Rocha, pelo auxílio financeiro e estrutura para realização deste trabalho;

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto, Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais e Biotério de Criação do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo fornecimento dos camundongos;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

À Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, Dr. Mauro Martins Teixeira e Dra. Héliida Monteiro de Andrade por integrarem a banca avaliadora desta dissertação;

Aos amigos, Érica Miranda e Héilton Barros, pela acolhida, companheirismo e pelos bons momentos compartilhados;

Aos meus familiares, minha mãe Cildete, meus avós, tios e primos pelo amor, carinho, incentivo e apoio durante toda minha vida, e por estarem sempre presentes mesmo que à distância. Aos meus sogros e cunhados pela acolhida e constante torcida;

Ao meu grande amor Marcos, pelo carinho, convivência diária, companheirismo e incentivo que sempre me fazem prosseguir.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	04
Figura 2 -	Estrutura química do Benzonidazol e do Nifurtimox	13
Figura 3 -	Estrutura química do colesterol e ergosterol	14
Figura 4 -	Representação esquemática da via metabólica de biossíntese de ergosterol no <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 5 -	Derivados azólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, utilizados no tratamento experimental da doença de Chagas	17
Figura 6 -	Estrutura química do Posaconazol.	19
Figura 7 -	Parasitemia dos camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	37
Figura 8 -	Mortalidade dos camundongos C57Bl/6, infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	38
Figura 9 -	Parasitemia dos camundongos IFN- γ KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	40
Figura 10 -	Mortalidade e sobrevivência dos camundongos IFN- γ KO, infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	41
Figura 11 -	Parasitemia dos camundongos IL-12 KO, infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não	

tratados	43
Figura 12 - Mortalidade e sobrevivência dos camundongos IL-12 KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	44
Figura 13 - Parasitemia dos camundongos LT CD4 ⁺ KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	46
Figura 14 - Mortalidade e sobrevivência dos camundongos LT CD4 ⁺ KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	47
Figura 15 - Parasitemia dos camundongos LT CD8 ⁺ KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	49
Figura 16 - Mortalidade e sobrevivência dos camundongos LT CD8 ⁺ KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	50
Figura 17 - Parasitemia dos camundongos LB KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	52
Figura 18 - Mortalidade e sobrevivência dos camundongos LB KO infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol, Benzonidazol ou não tratados	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Camundongos utilizados, com suas deficiências e procedência	30
Tabela 2 – Parasitemia e mortalidade dos camundongos C57Bl/6 e knockouts infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol e Benzonidazol por 20 dias consecutivos	54
Tabela 3 - Cura parasitológica dos camundongos normais e knockouts, infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Posaconazol e Benzonidazol	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA SIGNIFICADO

BZ	Benzonidazol
cols.	Colaboradores
Dpi	Dias após a infecção
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IBES	Inibidores da biossíntese de ergosterol
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
INOS	Óxido Nítrico sintase indutível
Kg	Kilograma
KO	Camundongos knockouts
L	Litro
LB	Linfócito B
LIT	Meio <i>Liver Infusion Tryptose</i>
LT	Linfócito T
Mg	Miligrama
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
Mm	Milímetros
N	Número total de animais
NK	Células “Natural Killers”
NO	Óxido nítrico
NFX	Nifurtimox
POS	Posaconazol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RIL	Interleucina recombinante
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Th1	Resposta do Tipo 1 – Células T CD4 ⁺ secretoras de IL-2 e IFN- γ
Th2	Resposta do Tipo 2 – Células T CD4 ⁺ secretoras de IL-4, IL-5 e IL-10
TGF-β	Fator transformador de crescimento β (<i>Transforming growth factor β</i>)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor</i>)
v/v	Volume à volume
μl	Microlitros

RESUMO

A doença de Chagas afeta aproximadamente 18 milhões de pessoas na América Latina. O Benzonidazol (BZ) é o único fármaco utilizado no Brasil para o tratamento e apresenta eficácia limitada na fase crônica da doença ou no tratamento de indivíduos imunossuprimidos. Na tentativa de identificar novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas, observou-se que o *Trypanosoma cruzi* necessita de ergosterol para a sua sobrevivência e seu crescimento. O parasito não pode utilizar o colesterol do hospedeiro e é sensível aos inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs). Os bis-triazóis são uma nova geração de IBEs, que foram ativos nas fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental. Entre eles, o Posaconazol (POS) destacou-se, apresentando eficácia no combate ao *T. cruzi* “in vitro” e “in vivo”. O POS é uma droga candidata ao tratamento clínico da doença de Chagas. Nesta dissertação, nós avaliamos a atividade do POS em camundongos deficientes em populações de linfócitos (TCD4⁺, TCD8⁺, B) e citocinas (IFN- γ e IL-12), na tentativa de identificar se há influência de alguns efetores da resposta imune na eficácia terapêutica da droga. Os camundongos deficientes (knockouts) foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (5000 tripomastigotas/camundongo) e foram tratados por 20 dias consecutivos. Para fins comparativos, camundongos deficientes também foram tratados com BZ, assim como camundongos selvagens C57Bl/6. A parasitemia foi realizada até 60 dias após a infecção, como descrito por Brener (1962). No mesmo período, a sobrevivência dos camundongos foi monitorada. Entre 30-40 dias após o término do tratamento, camundongos com parasitemia não detectável ao microscópio óptico foram submetidos à hemocultura, para determinar a cura. Considerando a sobrevivência e a cura dos camundongos knockouts infectados pelo *T. cruzi*, observamos que é necessária a interação entre o sistema imune do hospedeiro e as drogas estudadas, para que se obtenha cura parasitológica. Os linfócitos T CD4⁺ foram essenciais para a atividade do POS e BZ e a sua ausência torna os animais altamente suscetíveis. A citocina IFN- γ também foi essencial para o tratamento com BZ, porém, o POS foi menos influenciado por este componente. Os camundongos deficientes em linfócitos T CD8⁺ tiveram os melhores resultados quando tratados com BZ, ao contrário dos camundongos deficientes em linfócitos B que foram mais curados pelo POS. Nos camundongos deficientes em IL-12, o POS e o BZ tiveram a mesma atividade para reativação, mortalidade e cura. Os nossos resultados sugerem que ambas as drogas são influenciadas por componentes específicos do sistema imunológico. Porém, possuem mecanismos distintos de atuação e interação com o sistema imune.

ABSTRACT

Chagas disease affects 18 million people approximately in Latin America. Benznidazol (BZ) is the only drug used in Brazil for the treatment and it presents limited effectiveness in the chronic phase of the disease or in the treatment of individuals immunosuppressed. In the attempt of identifying new drugs for the treatment of Chagas disease, it was observed that the *Trypanosoma cruzi* needs of ergosterol for survival and growth. The parasite cannot use the cholesterol of the host and it is sensitive to the ergosterol biosynthesis inhibitors (IBEs). The bis-triazols are a new generation of IBEs, that were active in the acute and chronic phases of the experimental Chagas disease. Among them, Posaconazole (POS), presenting effectiveness in the combat to *T. cruzi* "in vitro" and "in vivo". POS is a drug of choice for clinical trials in human Chagas disease. In this dissertation, we evaluated the activity of the POS in deficient mice in populations of lymphocytes (TCD4⁺, TCD8⁺, B) and cytokines (IFN- γ and IL-12), in the attempt of identifying if there is influence of some effectors of the immune system in the therapeutic effectiveness of the drug. The deficient mice (knockouts) were infected with the Y strain of *T. cruzi* (5000 trypomastigotes/mice) and they were treated by 20 consecutive days. For comparative ends, deficient mice were also treated with BZ, as well as wild mice C57Bl/6. The parasitemia was accomplished up to 60 days after the infection, as described by Brener (1962). In the same period, the survival of the mice was monitored. Among 30-40 days after the end of the treatment, mice with parasitaemia no detectable to the optical microscope were submitted to the hemoculture, to determine the cure. Considering the survival and the cure of the mice knockouts infected by the *T. cruzi*, we observed that it is necessary the interaction between the immune system of the host and the studied drugs, so that it is obtained cure. The lymphocytes T CD4⁺ went essential for the activity of the POS and BZ and his absence turns the animals highly susceptible. The cytokine IFN- γ also went essential for the treatment with BZ, however, POS was it less influenced by this component. The deficient mice in lymphocytes T CD8⁺ had the best results when treaties with BZ, unlike the deficient mice in lymphocytes B that were more cured for the POS. In the deficient mice in IL-12, POS and BZ had the same activity for reactivation, mortality and cure. Our results suggest that both drugs are influenced by specific components of the immunological system. However, they possess mechanisms different from performance and interaction with the immune system.

SUMÁRIO

1 Introdução	01
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	03
1.2 Resposta imune na doença de Chagas	06
1.2.1 Resposta humoral, linfócitos B e anticorpos	07
1.2.2 Resposta celular e linfócitos T	07
1.2.3 Citocinas	08
1.2.3.1 Interferon gama (IFN- γ)	09
1.2.3.2 Interleucina 12 (IL-12)	10
1.3 Patogênese na doença de Chagas: autoimunidade e persistência do parasito.....	10
1.4 Imunossupressão na doença de Chagas	11
1.5 Tratamento etiológico da doença de Chagas	12
1.5.1 Nifurtimox e Benzonidazol	12
1.6 Quimioterapia experimental e os inibidores da biossíntese de ergosterol	14
1.6.1 Posaconazol	18
1.7 Evidências experimentais e clínicas de cooperação do sistema imune na eficácia do tratamento da doença de Chagas	19
1.8 Critério de cura na quimioterapia experimental	22
1.9 Utilização de camundongos normais e knockouts como modelo de estudo <i>in vivo</i> ..	23
2 Justificativa	25
3 Objetivos	27
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivo específico	28
4 Material e métodos	29
4.1 Local	30
4.2 Animais	30
4.3 Infecção	31
4.4 Parasitemia	31
4.5 Sobrevivência	32

4.6 Drogas	32
4.7 Tratamento	32
4.8 Hemocultura	33
4.9 Análise estatística	34
5 Resultados	35
5.1 Avaliação da parasitemia e da sobrevivência dos camundongos C57Bl/6	36
5.2 Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos camundongos IFN- γ KO	39
5.3 Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos camundongos IL-12 KO	42
5.4 Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos camundongos LT CD4 ⁺ KO	45
5.5 Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos camundongos LT CD8 ⁺ KO	48
5.6 Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos camundongos LB KO	51
5.7 Cura parasitológica dos camundongos normais e knockouts tratados com POS e BZ	55
6 Discussão	57
7 Conclusões	68
8 Referências Bibliográficas	70

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanosomíase americana é uma doença causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae. O *T. cruzi* têm como hospedeiro invertebrado insetos da Ordem Hemiptera (triatomíneos) e como hospedeiro vertebrado mamíferos, onde induz um quadro clínico com características e conseqüências variadas. Descoberta por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909) a doença vem desde então, se disseminando e tornando-se endêmica em muitas regiões, como conseqüência das precárias condições de habitação e sócio-culturais em que vive a população. Outro fator contribuinte para esse quadro, são as constantes migrações de indivíduos chagásicos para regiões onde existem vetores, completando o ciclo.

Encontrada de forma endêmica do Norte do México ao Sul da Argentina, a doença de Chagas afeta 16 a 18 milhões de pessoas na América Latina, deixando sobre risco de contraí-la cerca de 40 milhões (WHO, 2002; revisto por Urbina & Docampo, 2003). O quadro clínico da doença pode assumir gravidade e levar à morte, como demonstrado pelas estatísticas que indicam que aproximadamente 21.000 pessoas morrem por ano em conseqüência dessa enfermidade (revisto por Urbina e Docampo, 2003).

Nos últimos anos muitos progressos tem sido feitos em relação à profilaxia da doença de Chagas, principalmente no combate ao vetor (Dias et al. 2002). No Brasil, a partir de 1975 foram realizadas diversas medidas para controlar a transmissão da doença, que se intensificaram com a Iniciativa de Controle nos países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) a partir de 1991, havendo combate ao vetor e ampla triagem nos bancos de sangue. Apesar da redução da transmissão e de ser considerado livre de *Triatoma infestans*, o Brasil ainda é considerado endêmico para doença de Chagas, existindo cerca de 3 milhões de chagásicos. Além disso, há constante risco de estabelecer novos focos devido à presença de outras espécies vetoras aptas a participar do ciclo de transmissão domiciliar do *T. cruzi*, em diversas regiões do país. Em países como Paraguai e Bolívia, a transmissão vetorial continua intensa, principalmente através do *T. infestans* (Dias et al. 2002).

Clinicamente, a infecção pode levar ao desenvolvimento de complicações cardíacas e digestivas, sobretudo na fase crônica, que muitas vezes culmina com a morte do indivíduo. O Benzonidazol, que é o único medicamento com ação tripanosomicida empregado atualmente no Brasil, têm sua eficácia limitada (Cançado, 2002). Somado a isso, a doença de Chagas representa um importante problema social gerado principalmente pelo medo da morte súbita, a falta de um medicamento que seja eficaz nas duas fases da doença ou ainda em conseqüência do afastamento das funções profissionais devido a uma série de debilitações e

restrições impostas pela doença (Uchôa et al. 2002). Em razão disto, torna-se necessário a pesquisa de novas drogas capazes de curar o chagásico, independente da fase da doença. Além disso, atualmente existe pouca informação disponível sobre a interação existente entre o sistema imune do hospedeiro e a atividade dos fármacos utilizados para o tratamento.

A presente revisão bibliográfica, aborda os temas relacionados a investigação que realizamos, durante o desenvolvimento desta dissertação.

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta basicamente três formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. Elas são caracterizadas quanto à posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, flagelo e morfologia. Os tripomastigotas, com 25 µm de comprimento, são caracterizados pelo cinetoplasto (mitocôndria modificada rica em DNA) localizado entre o núcleo e a porção posterior, flagelo que atravessa toda a extensão do corpo do parasito e se externaliza com um pequeno segmento de membrana ondulante. Os amastigotas, com 4 µm de diâmetro, são caracterizados pelo formato ovóide ou arredondado, cinetoplasto visível, corpo achatado com flagelo interno e ausência de membrana ondulante. Os epimastigotas, com 20 a 40 µm de comprimento, têm forma de fuso, cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido. A forma tripomastigota é o estágio infectante, encontrado na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e na porção final do aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota é o estágio intracelular do parasito no organismo do hospedeiro vertebrado, enquanto a forma epimastigota é o estágio não infectante, encontrada no hospedeiro invertebrado (Rey, 2002).

Além das diferenças morfológicas existentes entre os diferentes estágios evolutivos do parasito, existe também uma variação genética, que produz um grande número de cepas com características individuais. As cepas conferem ao *T. cruzi* tipos de comportamento distintos, como tropismo por diferentes órgãos ou diferença na virulência (Camargos et al. 2000). Tais características podem ser determinadas pela localização geográfica associada às características fisiológicas naturais do protozoário.

A forma de transmissão do parasito ao homem e a outros mamíferos, com maior importância epidemiológica, é através da penetração do parasito na pele lesada ou mucosa íntegra, das formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminados nas fezes e/ou urina dos triatomíneos infectados, durante o repasto sanguíneo. Outras vias de transmissão observadas

são através de transfusão sanguínea, transmissão congênita, transmissão por acidentes de laboratório, transmissão oral e transmissão através do coito (Dias, 2000). O transplante de órgãos é uma forma de transmissão que emerge como um problema importante, haja vista a condição de imunossupressão em que se encontra o transplantado, o que pode agravar o quadro da doença (Riarte et al. 1999). Observa-se também, com o aumento do número de portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e com a utilização de medicamentos imunossupressores, a reativação de infecções crônicas em pacientes co-infectados pelo *T. cruzi*. Esses pacientes voltam a apresentar alta parasitemia, sinal clínico característico da fase aguda da doença (Galhardo et al. 1999; Rassi et al. 1999).

O ciclo biológico do *T. cruzi* envolve o hospedeiro invertebrado, que se infecta através da ingestão de sangue contendo tripomastigotas. Essas formas passam por transformações no tubo digestivo dos triatomíneos e são transmitidos ao hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) através da defecação que os insetos realizam logo após a hematofagia. No organismo do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas passam por novas transformações, formando amastigotas, que originam novos tripomastigotas que serão sugados pelo vetor, completando o ciclo (Figura 1). As principais espécies de vetores envolvidas na transmissão da doença de Chagas são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Rey, 2002).

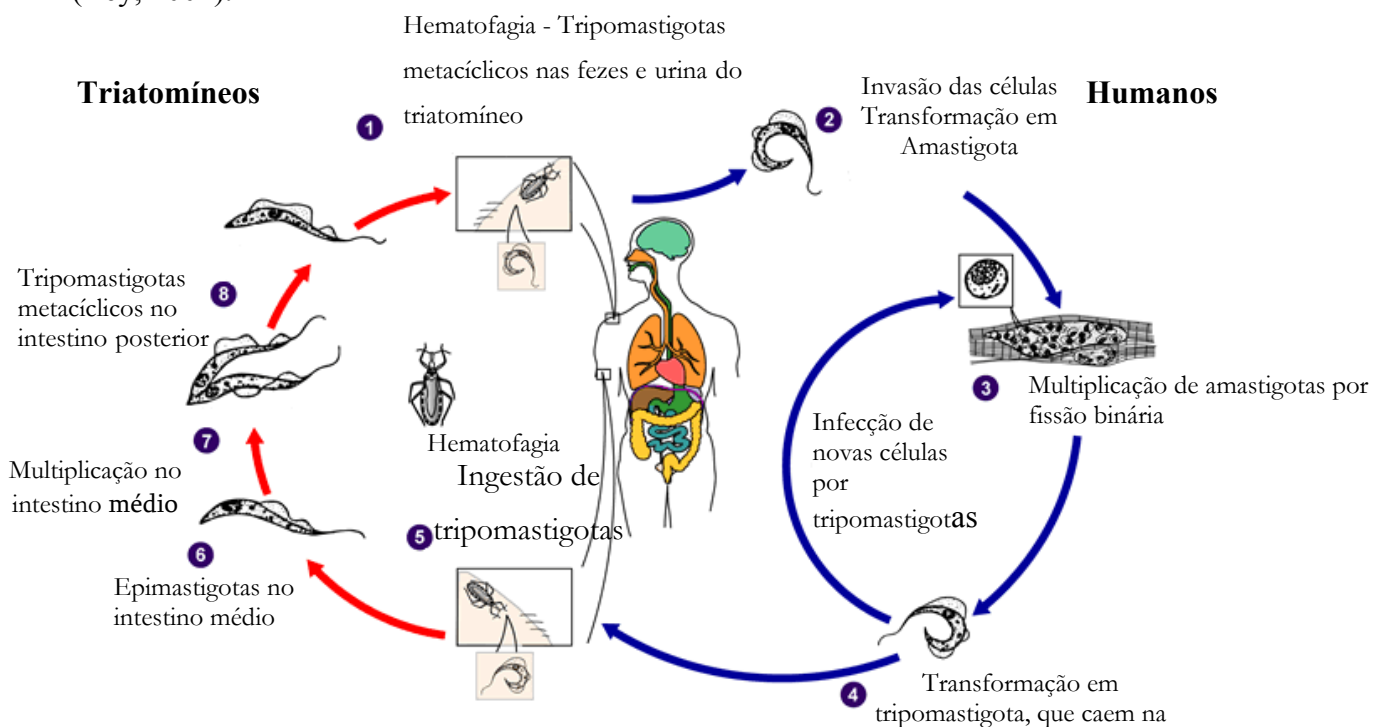


Figura 1 – Ciclo biológico do *T. cruzi* no homem. Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Após a infecção pelos tripanosomas, há um período de incubação (cerca de sete dias), com posterior invasão de vários tipos celulares como células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Porém, o *T. cruzi* têm tropismo preferencial por fagócitos mononucleares, células musculares, células adiposas e neurônios (Rey, 2002). Após a invasão, a patogênese da doença de Chagas pode ser classificada em fases aguda e crônica, de acordo com o tempo da infecção e características sorológicas.

A fase aguda, se prolonga por cerca de 30 a 90 dias, sendo caracterizada no geral, por um grande número de tripanosomas presentes na circulação (parasitemia patente). Em alguns casos, observam-se febre e manifestações clínicas nos locais de entrada como o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação. O comprometimento cardíaco nesta fase é frequente, podendo ocorrer miocardite, epicardite e endocardite aguda, assim como taquicardia. No sistema nervoso pode ser observado destruição neuronal intensa e nos órgãos do sistema digestivo podem ocorrer lesões discretas (Amato Netto et al. 1997, Ferreira et al. 2002). No entanto, a maioria das pessoas passa assintomática por essa fase, sem manifestações clínicas.

A fase crônica, é caracterizada pela parasitemia baixa e pelo elevado número de anticorpos circulantes. As manifestações observadas nesta fase, são decorrentes do curso intracelular do parasitismo. Ela pode ser dividida em diferentes formas clínicas, denominadas: indeterminada, cardíaca, digestiva, mista ou neurológica (Ferreira et al. 2002; Rey, 2002). A forma indeterminada é caracterizada por altos níveis de Imunoglobulina G (IgG) e corresponde ao período assintomático, podendo haver comprometimento cardíaco e digestivo, porém discreto (Macêdo, 1997; Ferreira et al. 2002; Rey, 2002).

A fase crônica sintomática é classificada de acordo com o quadro clínico apresentado pelo chagásico. Na forma cardíaca, ocorre principalmente miocardite crônica progressiva e fibrosante e/ou hipertrofia do coração (megacárdio). Essas alterações podem se manifestar através de arritmias e insuficiência cardíaca congestiva. A forma cardíaca é a principal responsável pela ocorrência de morte súbita, que é um fenômeno considerado como a principal causa de morte na doença de Chagas (Rassi Jr. et al. 2001). Os pacientes com a forma digestiva apresentam alterações hipertróficas no esôfago (megaesôfago) e colón intestinal (megacolón), que levam a problemas como disfagia, regurgitação e incoordenação motora (Rezende, 1997). A forma mista é caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitantemente. Na forma neurológica, observam-se alterações morfológicas no tecido nervoso central. Em pacientes chagásicos imunodeprimidos é comum o desenvolvimento de meningoencefalite (Rocha et al. 1994).

A duração destas fases pode ser diferente entre os indivíduos, mas em geral o que se observa é um período de até 90 dias para a fase aguda, de até 20 anos para fase crônica indeterminada e um período muito variável para fase crônica sintomática, dependente da forma clínica e gravidade do quadro desenvolvido pelo paciente.

1.2 Resposta imune na doença de Chagas

Muitas das manifestações clínicas observadas na doença de Chagas devem-se diretamente a resposta imune elaborada pelo hospedeiro contra o parasita (Brodskyn & Barral-Netto, 2000). Em cada fase da infecção, existe uma resposta imune específica com um repertório de células, citocinas e outras substâncias, que reduzem a carga parasitária, auxiliando na defesa do organismo, mas que podem também estar envolvidos no desenvolvimento da patologia. Em consequência disto, tem sido realizados muitos trabalhos, principalmente experimentais, buscando a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro frente à infecção.

No início da infecção experimental são observados eventos desencadeados pela imunidade inata do hospedeiro, como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia regional, atrofia dos linfonodos mesentéricos e do timo (Ferreira et al. 2002). Essas alterações são acompanhadas pela ativação policlonal de linfócitos T e B, hipergamaglobulinemia, seguido por uma imunossupressão da resposta linfocitária e aumento da apoptose (revisto por Brener & Gazzinelli, 1997; DosReis, 1997). A resposta imune no princípio da infecção visa a redução e controle da replicação do parasito, além do preparo e otimização do sistema imune para gerar a resposta imune adquirida Th1 (revisto por Reis & Lopes, 2000).

Com a infecção começa o processo inflamatório, através do recrutamento de células “Natural Killers” (NK), neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (revisto por Olivieri, 2004). Todas essas células possuem receptores, que com o auxílio do fator de necrose tumoral (TNF)- α , ativam macrófagos para produzir citocinas (IL-1 e IL-6) e óxido nítrico (NO) (Gazzinelli et al. 1992; Brener & Gazzinelli, 1997).

As células NK são capazes de produzir interferon- γ (IFN- γ) durante a fase aguda da doença, em resposta às formas tripomastigotas e independente das células T. Camundongos resistentes à infecção pelo *T. cruzi*, tornam-se suscetíveis ao receberem anticorpo monoclonal anti-células NK, reduzindo drasticamente os níveis de IFN- γ e aumentando os de IL-10, produzidos em resposta as formas tripomastigotas (Cardillo et al. 1996). Embora em menor intensidade, as células NK estão envolvidas na destruição das células infectadas quando há

alteração no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) do tipo 1. Porém, os macrófagos é que são as células fundamentais para o controle da replicação do parasito através da fagocitose, síntese de citocinas pró-inflamatórias e NO (Brener & Gazzinelli, 1997).

1.2.1 Resposta humoral, linfócitos B e anticorpos

Estudos da resposta imune humoral demonstram que os anticorpos são instrumentos importantes de defesa do hospedeiro, durante a infecção. No início da infecção, o parasito induz uma resposta humoral poliotípica (principalmente IgM e IgG), com predominância de anticorpos que diferem em nível e atividade funcional (Bouhdid et al. 1994). A ativação policlonal dos linfócitos B é dependente de linfócitos T (LT) CD4⁺ (Minoprio et al. 1986) e contribui para uma redução da parasitemia e eliminação das formas sanguíneas. Cordeiro et al. (2001) observaram que os pacientes chagásicos com a forma clínica indeterminada apresentavam altos níveis de imunoglobulinas da classe IgG, em especial IgG1 e IgG3, sugerindo o envolvimento desses isotipos no controle da doença. Em estudos recentes, Michailowsky e cols. (2003) notaram os mesmos isotipos como reconhecedores de proteínas paraflagelares de *T. cruzi*, no soro de pacientes infectados.

Krettli & Brener (1982) demonstraram a existência de anticorpos protetores contra formas sanguíneas vivas de *T. cruzi*, denominados anticorpos líticos. Esses anticorpos induzem a lise dos parasitos mediada por complemento e diferem dos anticorpos convencionais detectados nos diagnósticos sorológicos. Os anticorpos líticos participam da resistência à infecções com cepas virulentas e desaparecem após a cura. A lise mediada por complemento (LMC) muitas vezes se torna gradualmente negativa após a quimioterapia específica, enquanto que a sorologia convencional permanece positiva. Desta forma, a LMC é um importante parâmetro para medir a cura parasitológica pós-tratamento (Krettli et al. 1982).

1.2.2 Resposta celular e Linfócitos T

A resposta celular é a mais importante no combate ao *T. cruzi* na fase inicial da doença, correspondendo a uma resposta sistêmica que protege contra a replicação de amastigotas intracelulares. O *T. cruzi* é um potente ativador da resposta Th1 (resposta

celular), sendo capaz de estimular melhor a síntese de citocinas pró-inflamatórias do que os protozoários do gênero *Leishmania* sp. (Oliveira et al. 2000).

A resposta celular é mediada nas fases aguda e crônica, principalmente pelos linfócitos T CD4⁺, que são responsáveis pela indução da imunidade protetora (Brener & Gazzinelli, 1997), ativando macrófagos, linfócitos T CD8⁺ através de citocinas. Além disso, os LT CD4⁺ são necessários para a produção dos anticorpos líticos.

Os LT CD8⁺ são um outro importante grupo de células, que estão envolvidos na produção de citocinas e na atividade citolítica, controlando a replicação *in vivo* do parasito e permitindo a resistência do hospedeiro (Brener & Gazzinelli, 1997). A contribuição desta célula é relevante, devido a habilidade apresentada pelo *T. cruzi* de infectar células não linfóides, onde é expresso apenas o MHC I, que é reconhecido pelos LT CD8⁺ (revisto por Reis & Lopes, 2000).

O MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) humano, é dividido em classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) e classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). Ambos são formados por duas cadeias polipeptídicas denominadas α e β . Em camundongos, os genes do MHC recebem outra nomenclatura: para o MHC de classe I são H-2K, H-2D e H-2L e para o MHC de classe II são I-A e I-E. Tanto em humanos quanto em camundongos, os MHC de classe I e II têm uma importante função na regulação da resposta imune, ligando e apresentando os antígenos às células T (LT CD8⁺ e LT CD4⁺, respectivamente). Desse modo, acionam a seleção do repertório de células que atuará na defesa do hospedeiro (Abbas et al. 2002, Cruz-Robes e cols. 2004).

Na imunidade mediada por célula, os macrófagos atuam principalmente através da produção de óxido nítrico (NO), sendo um efetor essencial no desenvolvimento da resposta Th1 contra *T. cruzi*, controlando a replicação através secreção de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-12) e aumento de substâncias co-estimulatórias (Brener & Gazzinelli, 1997).

1.2.3 Citocinas

Além das células efectoras, as citocinas são importantes mediadores que regulam a duração e a intensidade da resposta imune. São proteínas solúveis ou glicoproteínas produzidas por leucócitos e outros tipos celulares, que atuam como mediadores químicos (Abbas et al. 2002). Roggero et al. (2002) pesquisaram os fatores que influenciam no agravamento da doença de Chagas em linhagens de camundongos, sendo uma resistente e outra suscetível à infecção. Os autores observaram que a disparidade na relação entre as

citocinas pró e anti-inflamatórias foi a variável associada com o aumento da morbidade e não os níveis de parasitos. De fato, a resistência à infecção durante a fase aguda está diretamente relacionada à ativação de macrófagos mediada por citocinas (DosReis, 1997).

1.2.3.1 Interferon gama (IFN- γ)

Entre as citocinas, o IFN- γ apresenta um papel crucial, por ser um potente ativador de macrófagos, aumentando a atividade antiparasitária contra o *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* sp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* sp. (Nabors & Tarleton, 1991). Torrico et al. (1991) avaliando a contribuição do IFN- γ no modelo murino da doença de Chagas, observaram que camundongos que receberam anticorpo monoclonal anti-IFN- γ , foram mais suscetíveis à infecção, apresentando parasitemia mais acentuada e mortalidade precoce, em relação aos camundongos selvagens.

Durante a fase inicial da doença, a síntese de IFN- γ é estimulada pela IL-12 e realizada pelas células NK, células TCR (Receptor de Célula T) $\alpha\beta$ duplo negativas, macrófagos e posteriormente pelos LT ($CD4^+$ e $CD8^+$) (Reis & Lopes, 2000). O IFN- γ leva a produção de óxido nítrico e diferenciação para a resposta imune adquirida Th1. Essa produção de IFN- γ é regulada pelas citocinas IL-10, IL-4 e o fator transformador de crescimento- β (TGF- β) (revisto por DosReis, 1997, Brener & Gazzinelli, 1997). Porém, apesar dos seus efeitos benéficos, o IFN- γ tem sido relacionado ao desenvolvimento de cardiopatia na fase crônica (Gomes et al. 2003).

Assim como IFN- γ , o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma importante citocina pró-inflamatória, com papel crucial na modulação da resposta imune que induz resistência à infecção pelo *T. cruzi* (Abrahamsohn & Coffman, 1995; Aliberti, et al. 2001). O TNF- α está envolvido na ativação de leucócitos inflamatórios, estimulação de fagócitos mononucleares para produção de citocinas, co-estimulação dos linfócitos T e potenciação da lise mediada por linfócitos T citotóxicos (Abbas et al. 2002). Tais atividades são realizadas sinergicamente ao IFN- γ e são cruciais para a resistência à infecção. Moretti e cols. (2002) pesquisaram os níveis de citocinas no soro de crianças com 1 a 13 anos, agudamente infectadas pelo *T. cruzi* em uma área endêmica da América Latina. Os autores observaram altos níveis de TNF- α associado com alta parasitemia, provavelmente devido ao envolvimento desta citocina nos processos inflamatórios.

1.2.3.2 Interleucina 12 (IL-12)

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, sintetizada pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) durante a infecção e é capaz de induzir a síntese de IFN- γ , através das células NK ou células T. O uso de rIL-12 em conjunto com anticorpo neutralizante de IL-4, conferiu grande proteção de camundongos contra desafios oral e mucoso com *T. cruzi*, desenvolvendo uma resposta polarizada do tipo Th1 (Hoft & Eickhoff, 2002).

Estudos em camundongos Knockouts (KO) infectados com *T. cruzi*, evidenciam a importância do eixo IL-12/IFN- γ /iNOS. A doença é agravada e gera alta letalidade em camundongos destituídos do gene que codifica a IL-12 (Muller et al. 2001, Silva et al. 2003). Com o auxílio das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, a IL-12 atua no controle do parasitismo do tecido cardíaco, inflamação e resistência do hospedeiro à infecção aguda (Michailowsky et al. 2001). De acordo com Abrahamsohn et al. (2000), a administração de rIL-4 e rIL-10 para camundongos das linhagens 129/J, BALB/c e C57Bl/6, reduz a quantidade de IFN- γ endógeno, exacerbando a carga parasitária dos animais.

Desta forma, os diversos trabalhos encontrados na literatura científica, tornam evidente que não apenas a IL-12, mas outras citocinas e células efetoras do sistema imune, são elementos essenciais da defesa do hospedeiro, desenvolvendo uma proteção sistêmica contra infecção chagásica e auxiliando no controle da replicação do parasito.

1.3 Patogênese na doença de Chagas: autoimunidade e persistência do parasito

Algumas pesquisas indicam que apesar de auxiliar na proteção do organismo contra o parasitismo, a resposta imune do hospedeiro talvez possa assumir um caráter auto-imune e contribuir para o desenvolvimento de patologia. Gomes et al. (2003) relacionaram a resposta Th1 ao desenvolvimento de formas graves da doença de Chagas. O possível envolvimento do IFN- γ foi sugerido devido aos altos níveis dessa citocina no sobrenadante de cultura de células sanguíneas periféricas mononucleares de pacientes com a forma cardíaca da doença. Em contraponto, a IL-10 foi identificada como a citocina predominante nas culturas de células de pacientes com a forma indeterminada. Segundo hipótese dos autores, os níveis elevados de IFN- γ favorecem a cura durante a fase aguda, mas podem influenciar no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica posteriormente. A autoimunidade pode ser um dos mecanismos responsáveis pela doença cardíaca, supondo-se que ocorra através da ativação policlonal de

linfócitos, mimetismo molecular ou pela exposição de moléculas crípticas existentes nas células do hospedeiro (Leon & Engman, 2003).

Seguindo uma outra vertente, pesquisadores têm relacionado o desenvolvimento da doença cardíaca com a persistência do parasito no tecido, que muitas vezes só é possível detectar através de técnicas altamente sensíveis como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou imunohistoquímica. Esse fato pode também ser confirmado em pacientes crônicos que passam por um estado de imunossupressão, deixando o estado de equilíbrio para apresentar parasitemia elevada (Tarleton & Zhang, 1999; Soares et al. 2001).

1.4 Imunossupressão na doença de Chagas

Em casos de imunossupressão, como na co-infecção *T. cruzi*-HIV, observa-se a ocorrência de reativação de infecções crônicas que retornam a um quadro agudo, possivelmente em razão do baixo número de linfócitos T CD4⁺. No entanto, não é completamente conhecido o mecanismo efetor desta reagudização (Brenner & Gazzinelli, 1997). Galhardo et al. (1999) analisaram em uma paciente chagásica, o ressurgimento de infecção aguda após anos de doença crônica indeterminada e relacionaram o evento ao diagnóstico positivo para o vírus HIV. Indivíduos co-infectados, em geral apresentam uma forma clínica muito grave da doença de Chagas, decorrente da imunodeficiência, como a meningoencefalite, que é um evento raro em chagásicos HIV-soronegativos (Antunes et al. 2002). Os problemas mais frequentes em imunossuprimidos, são a miocardite e a tripanosomíase cerebral (meningoencefalite), com grave comprometimento do sistema nervoso central.

A imunossupressão medicamentosa também é um evento causador de reativação de infecções crônicas. Rassi et al. (1997) observaram um aumento da parasitemia em pacientes na fase crônica da doença de Chagas que receberam tratamento com corticóides em decorrência de outras afecções associadas. Santos-Neto et al. (2003) também observaram alta parasitemia em uma paciente chagásica crônica tratada com corticóide devido à ocorrência de lupus eritematoso sistêmico.

Na literatura científica existem relatos de reativação da infecção em pacientes chagásicos transplantados, que passam por um processo de imunossupressão induzida a fim de evitar a rejeição do novo órgão. Riarte e cols. (1999) notificaram o aumento da parasitemia pós-transplante de rim em 5 pacientes (21,7%) de um total de 23 chagásicos receptores. Além disso, 10 pacientes (43,4%) tiveram aumento da reatividade sorológica.

Os eventos de imunossupressão como terapêutica, transplante de órgãos e co-infecção com HIV, merecem mais estudos devido à emergência da reativação de infecções crônicas, que representam um risco ao paciente chagásico pela possibilidade do surgimento de um quadro clínico grave ou o agravamento de uma situação pré-existente.

1.5 Tratamento etiológico da doença de Chagas

O tratamento da doença de Chagas é uma questão ainda não completamente resolvida e tem sido alvo de muitas pesquisas na busca de novas drogas que sejam eficazes no combate ao *T. cruzi*, principalmente durante a fase crônica da doença de Chagas. Essa fase corresponde ao período em que a maioria dos pacientes é diagnosticada. Os primeiros compostos utilizados para o tratamento clínico, não apresentavam eficácia. Entre eles podemos citar atoxil, fucsina, antimônio pentavalente e cloreto de mercúrio (revisto por Coura & Castro, 2002). Em 1957, Packchanian (citado por Brener, 1984) demonstrou resultados promissores com a Nitrofurazona, confirmados por Brener em 1961. No entanto, este fármaco foi posteriormente substituído por outro nitrofurano, o Nifurtimox (NFX).

1.5.1 Nifurtimox e Benzonidazol

Os únicos medicamentos prescritos clinicamente para o tratamento de pacientes chagásicos, Nifurtimox (NFX) e Benzonidazol (BZ), são muito limitados e a cura depende da suscetibilidade das cepas de *T. cruzi*, estágio da doença e fisiologia do hospedeiro. Estes medicamentos tem sido úteis para o tratamento na fase aguda e para prevenir a evolução e o agravamento da doença na fase crônica.

O NFX (1,1-dióxido de tetraidro-3-metil-4[(5-nitrofurilideno)amino]-2H-1,4-tiazina) é um nitrofurano produzido pelo Laboratório Bayer, lançado em 1972 com o nome comercial de Lampit® (Figura 2) e utilizado para o tratamento da doença de Chagas (Brener, 2000). Considerado tóxico ao homem, teve sua comercialização cancelada em diversos países, inclusive no Brasil (Luquetti, 1997). O BZ é uma droga nitroheterocíclica (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) produzida pelo Laboratório Roche desde 1978, comercializado sob o nome de Rochagan® e atualmente é o único fármaco empregado no tratamento humano da doença de Chagas no Brasil (Figura 2).

O mecanismo de ação do NFX envolve a produção de radicais livres através da redução do grupamento nitro, o que leva a uma intoxicação do parasito (revisto por Urbina,

1999). Como conseqüência, os tecidos dos hospedeiros podem também serem lesados, produzindo dermatites por hipersensibilidade, anorexia, vômito, polineurite e depressão da medula óssea (Cançado, 2002). O BZ também causa efeitos colaterais semelhantes ao NFX, porém de uma forma menos intensa. Ele age em uma via diferente, seus intermediários nitrorreduzidos se ligam a macromoléculas, sem gerar radicais livres (Urbina, 1999).

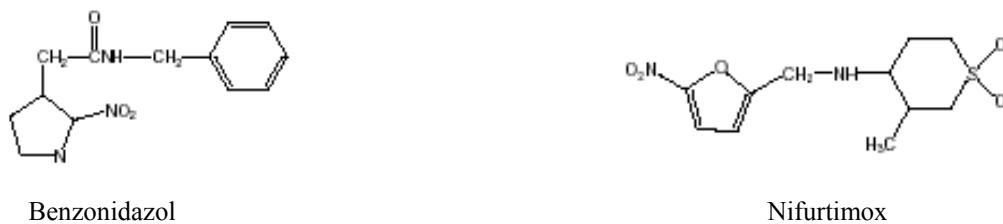


Figura 2 – Estrutura química do Benzonidazol e do Nifurtimox.

A falha terapêutica dos nitroheterocíclicos (BZ e NFX), no tratamento de infecções crônicas em pacientes chagásicos, vêm sendo constatada em diversos trabalhos (Urbina, 1999; Braga, et al. 2000; Cançado, 2002). Além disso, o tratamento é ineficaz em casos de imunossupressão medicamentosa ou ainda para portadores da SIDA. Um grande obstáculo para obtenção da cura parasitológica é a grande variabilidade genética das populações de parasitos (Brener & Chiari, 1967) e a existência de cepas naturalmente resistentes às drogas (Filardi & Brener, 1987), o que pode estar relacionado à origem geográfica das mesmas (Murta et al. 1998).

Cançado (1999) publicou uma avaliação do tratamento etiológico da doença de Chagas com o BZ. Foram incluídos neste estudo 21 pacientes tratados na fase aguda e acompanhados de 13 a 21 anos após o tratamento, e 113 pacientes tratados na fase crônica, acompanhados de 6 a 18 anos após o emprego da medicação. O autor observou que o BZ curou 76% dos pacientes chagásicos tratados na fase aguda e apenas em 8% dos pacientes tratados na fase crônica, ficando evidente que a fase da doença influencia na eficácia terapêutica.

1.6 Quimioterapia experimental e os inibidores da biossíntese de ergosterol

Desde o surgimento dos nitroderivados, muitas tentativas tem sido feitas, testando inúmeras drogas e princípios ativos provenientes de produtos naturais na busca de atividade anti-*T. cruzi* (Brener, 1984; de Castro, 1993; Coura & de Castro, 2002). As substâncias testadas são escolhidas através de estudos que identificam alvos metabólicos do parasito ou de forma empírica.

Atualmente, os alvos bioquímicos da quimioterapia experimental incluem a síntese de ergosterol, enzimas como a tripanotona redutase, cisteína protease, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerases, dihidrofolato redutase e farnesilpirofosfato sintase (Urbina, 1999; Coura & de Castro, 2002).

Entre os compostos ativos sobre a síntese de ergosterol, estão sendo testados os inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs), muito eficazes na depleção do ergosterol endógeno ou no acúmulo de intermediários tóxicos (Urbina et al. 1997). O ergosterol é uma substância fundamental para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do *T. cruzi*, além de ser importante para sua proliferação *in vitro*. Por essa razão, é um alvo potencial para a pesquisa de quimioterápicos (Urbina, 1999). Contrariamente ao *T. cruzi*, as células do hospedeiro vertebrado são dependentes de colesterol e não de ergosterol. O colesterol e o ergosterol apresentam diferenças estruturais bem características. O ergosterol possui o carbono 24 (C24) da cadeia lateral metilado, ao contrário do colesterol que não possui substituinte nesta posição. Além disso, o colesterol possui apenas uma insaturação no anel B (C^{5,6}), enquanto que o ergosterol possui duas insaturações no anel B (C^{5,6} e C^{7,8}) e uma insaturação na cadeia lateral (C^{22,23}) (Figura 3).

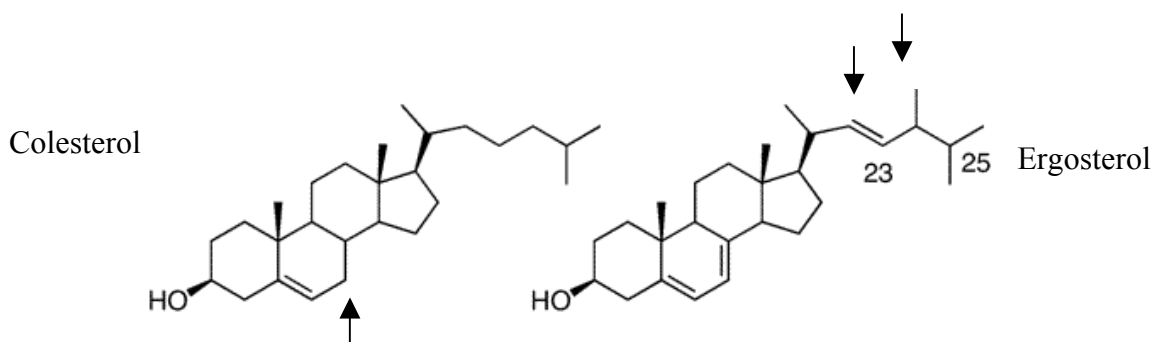


Figura 3 – Estrutura química do colesterol e ergosterol. As setas indicam as diferenças estruturais entre as duas moléculas.

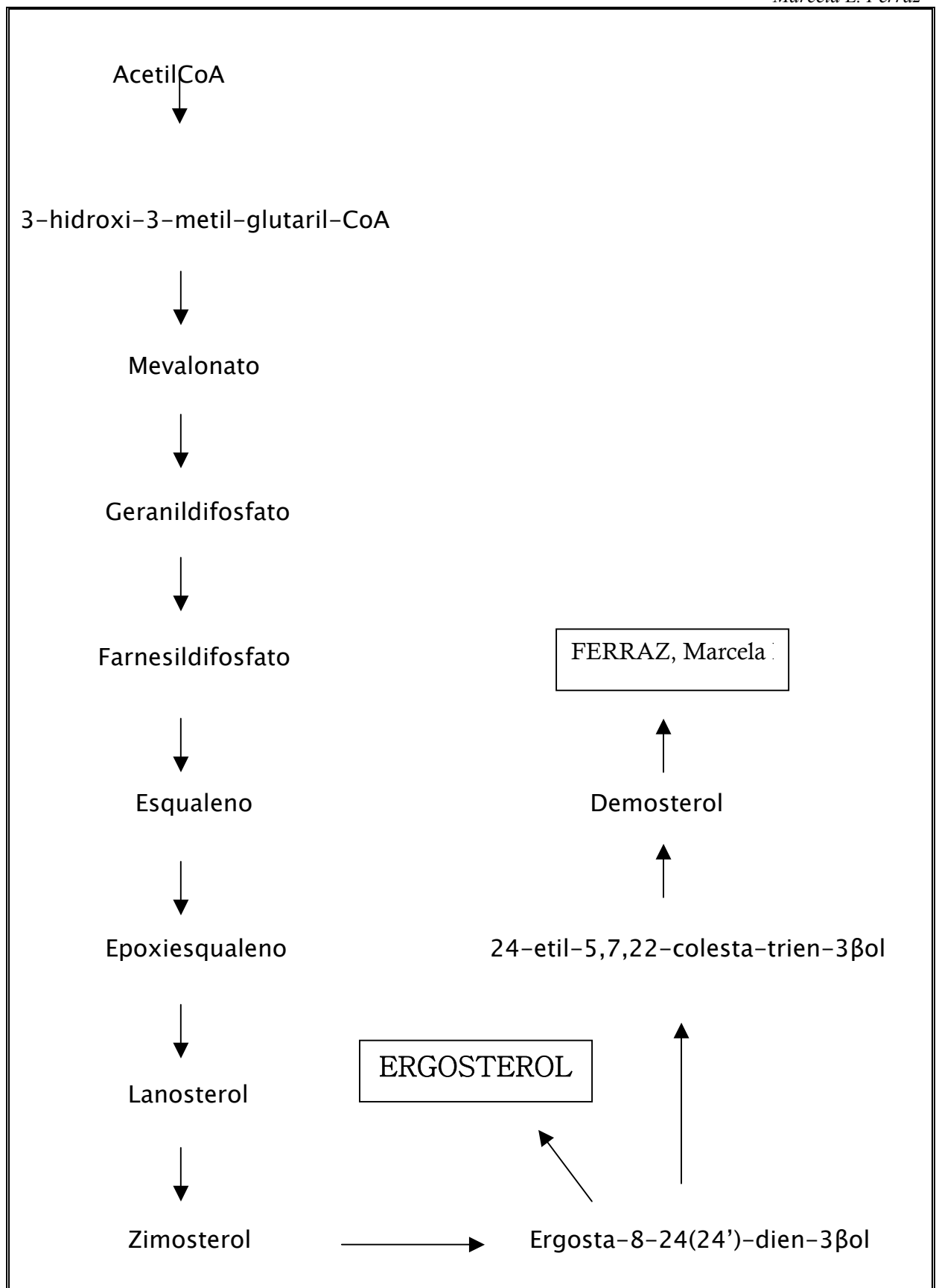


Figura 4 – Representação esquemática da via metabólica da biossíntese de esteróis no *Trypanosoma cruzi*. A ação dos derivados azólicos está indicada pela seta verde (Modificado de Urbina, 1997).

Entre os IBEs, existem compostos que atuam em diferentes etapas do ciclo do ergosterol (Figura 4). Entre os inibidores já estudados para o tratamento experimental da doença de Chagas estão: estatinas (Urbina et al. 1993), bifosfonatos (Martin e cols. 2001), inibidores da esqualeno sintase (Urbina et al. 2004), alilaminas (Lazardi et al. 1990), oxidosqualeno ciclase (Buckner et al. 2001) e azasteróis (Urbina e cols. 1996a). Entretanto, os mais promissores e mais estudados foram os derivados azólicos, que estão disponíveis comercialmente ou sendo testados contra outras infecções. Alguns triazóis já foram testados experimentalmente e até mesmo clinicamente para o tratamento da doença de Chagas. Este é o caso do Fluconazol e do Itraconazol (Lauria-Pires et al. 1988; Moreira et al. 1992) e do Cetoconazol (McCabe, 1988; Brener et al. 1993), porém não tiveram muito sucesso.

Uma nova geração de derivados azólicos foram desenvolvidos, os bis-triazóis (Figura 5). Eles tem demonstrado grande eficácia e atividade contra *T. cruzi*, agindo sobre os alvos específicos do metabolismo de ergosterol, principalmente sobre a enzima C14 α demetilase, impedindo a formação de zimosterol a partir do lanosterol e impedindo a formação do ergosterol (Urbina, 1997). Buckner e cols. (2003) demonstraram que o gene da enzima C14- α demetilase é expresso no parasito tanto nos estágios do ciclo de vida no mamífero, quanto no inseto, sendo potencialmente um alvo metabólico muito importante.

O D0870 (Zeneca Pharmaceuticals, Reino Unido), é uma droga com ampla atividade anti-micótica, que demonstrou excelente ação anti-*T. cruzi*. Em experimentos *in vitro* atuou sobre as formas amastigotas e *in vivo* alcançou uma taxa de cura de 70-100%, em camundongos infectados com sete diferentes cepas de *T. cruzi*, incluindo cepas resistentes ao BZ. Na fase crônica, os resultados também foram satisfatórios, pois houve cura em 30-45% dos animais; ao mesmo tempo não foi constatada eficácia do BZ na fase crônica (Urbina et al. 1996b; Molina et al. 2000a). Possivelmente, devido à sua toxicidade, a utilização do D0870 foi descontinuado, mas esses resultados incentivaram pesquisas subseqüentes com outros derivados triazólicos.

A droga UR-9825 (Uriach & Cia., Espanha), conhecida como Albaconazol, foi extremamente ativa contra formas epimastigotas e amastigotas *in vitro*, sendo mais eficaz que o Cetoconazol, no controle da proliferação de formas amastigotas (Urbina, et al. 2000). Recentemente, Guedes e cols. (2004) realizaram o tratamento de cães infectados com as cepas Y e Berenice-78 de *T. cruzi*. Os autores verificaram que a droga conseguiu suprimir a parasitemia e curou entre 25-100% dos cães, sendo bem tolerada em esquemas prolongados de tratamento (60-150 dias).

Urbina e cols. (2003a) analisaram a atividade de outro derivado triazólico, o Ravuconazol (Bristol-Myers Squibb, Estados Unidos) desenvolvido como um anti-micótico sistêmico. A eficácia da droga foi verificada em ensaios *in vitro* e *in vivo* na doença de Chagas murina, com 70% de cura na fase aguda. Todavia, durante a fase crônica, esta droga não demonstrou atividade anti-parasitária. A TAK-187 (Takeda Chemical Industries, Japão), como os outros derivados azólicos descritos anteriormente, apresentou propriedades farmacocinéticas importantes, como longa meia-vida e grande volume de distribuição no organismo. Além disso, a cura foi possível em 60-100% dos casos de infecção em camundongos (inclusive com cepas resistentes ao BZ), durante as fases aguda (cepas CL, Y e Colombiana) e crônica (cepa Bertoldo), com 100% de sobrevivência dos animais (Urbina et al. 2003b).

Os IBEs foram ativos também sobre o *T. gondii*. As drogas 22,26 azasterol e 24,25 (R,S)-epiminolanosterol alteraram a ultraestrutura da membrana de taquizoítos *in vitro*, inibindo a proliferação do parasito (Dantas-Leite et al. 2002). Todos esses resultados experimentais obtidos, sugerem que os triazóis sejam candidatos ao tratamento da doença de Chagas humana.

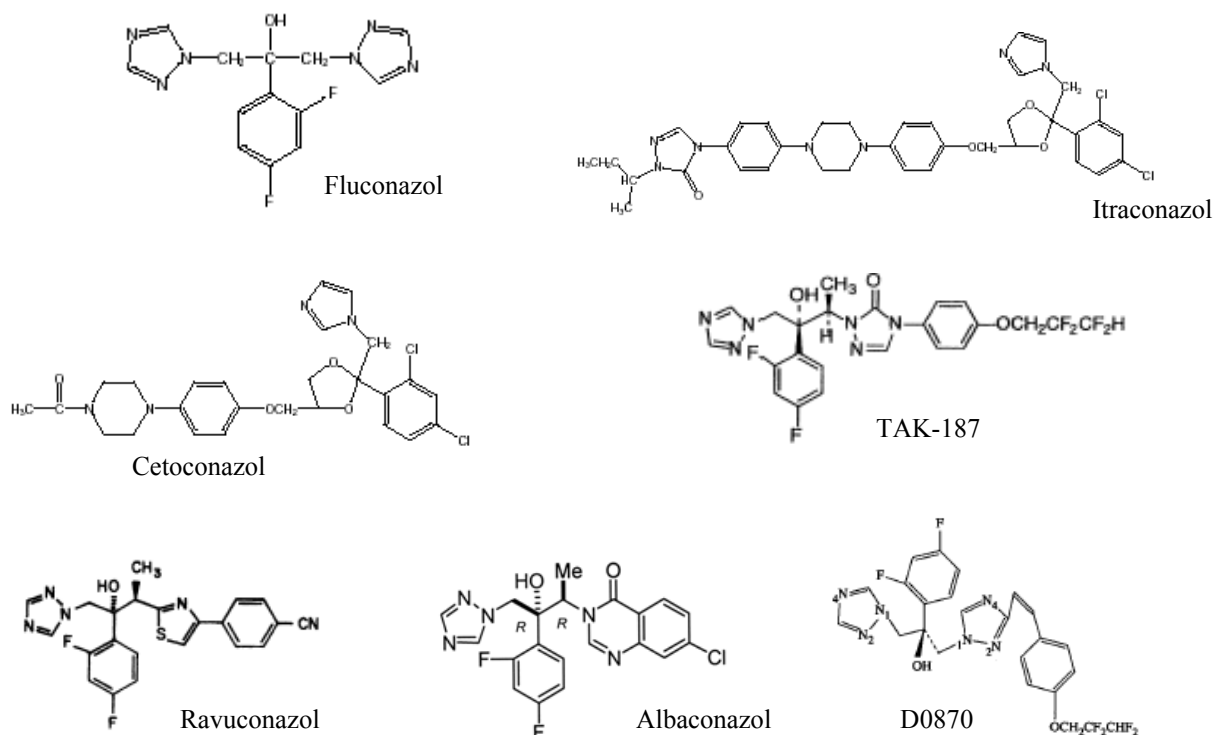


Figura 5 – Derivados azólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, utilizados no tratamento experimental da doença de Chagas.

1.6.1 Posaconazol

O Posaconazol - POS ou SCH 56592 (Noxafil®, Schering-Plough, Estados Unidos) (Figura 6) é uma droga anti-micótica de amplo espectro, desenvolvida para atuar sobre infecções fúngicas sistêmicas, invasivas ou para combater fungos resistentes a outros derivados azólicos (aspergilose, candidíase, coccidiomicose, zigomicose e fusariose) (Adis International, 2003). Resultados recentes disponibilizados pela Schering-Plough (2004), relatam que durante a triagem clínica, o POS foi ativo contra 20 diferentes espécies de fungos e demonstrou resultados significativos no tratamento de pacientes com doenças hematológicas graves e em pacientes refratários a outros antimicóticos. Os efeitos colaterais observados foram relativamente leves (náusea, vômito e diarreia). A atividade farmacocinética desta droga foi muito bem caracterizada em camundongos, ratos, coelhos, cães e macacos. Em camundongos a meia-vida terminal foi de 7 horas e em macacos foi de 23 horas, o que sugere uma boa permanência da droga nestes modelos (Nomeir e cols. 2000). Courtney e cols. (2003) testaram a farmacocinética e tolerância oral à droga em indivíduos saudáveis após a administração de doses simples ou múltiplas, observando que a droga foi bem tolerada e não provocou alterações clínicas significativas (determinadas por exames laboratoriais e eletrocardiograma). A meia-vida foi dose-dependente e variou entre 15.9 e 28.5 horas (com dose única), e 19.2 e 31 horas (com doses múltiplas) .

O POS foi testado contra o *T. cruzi* e apresentou efeito sobre as formas epimastigotas e amastigotas *in vitro* (sendo 0.3 nM a concentração mínima para a eliminação do parasito da célula hospedeira). Também verificou-se que este fármaco promoveu um acúmulo de esteróis C-14 metilados e dos precursores do esqualeno. No modelo murino da infecção, demonstrou cura entre 50-100% na fase aguda, contra cepas com diversos graus de resistência aos nitrofuranos, e até 50% de cura na fase crônica (Urbina et al. 1998). Molina e cols. (2000b) testaram a eficácia do POS em camundongos imunossuprimidos e imunocompetentes. Os autores verificaram que a imunossupressão não afeta a atividade do POS se o animal for infectado com uma cepa sensível ou resistente ao BZ, pois ele curou 100% e 50%, respectivamente (atividade semelhante a que ocorre em imunocompetentes). Entretanto, quando os animais imunossuprimidos eram infectados com uma cepa parcialmente resistente ao BZ, a taxa de cura obtida (89%) foi reduzida à metade (44%), sugerindo que o POS é parcialmente dependente do sistema imune.

Devido aos resultados demonstrados, com evidente ação tripanosomicida, e por ter sido bem tolerado por pacientes em tratamento de infecções micóticas (não causando reações adversas graves), o POS é a droga de eleição para ensaios clínicos a serem realizados visando o tratamento da doença de Chagas (Urbina & DoCampo, 2003).

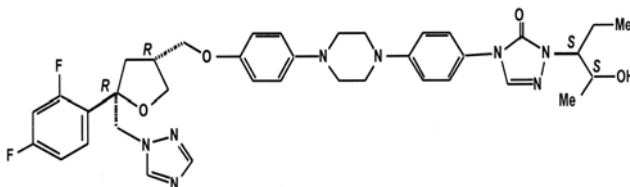


Figura 6 – Estrutura química do Posaconazol.

1.7 Evidências experimentais e clínicas de cooperação do sistema imune na eficácia do tratamento da doença de Chagas

De diferentes formas a quimioterapia e o sistema imune podem interagir durante o tratamento etiológico das infecções parasitárias. Essa interação pode ser através de uma ação sinérgica entre a droga e os componentes imunológicos do hospedeiro que leva à cura e induz proteção, assim como através da imunoterapia que potencia a eficácia do tratamento em alguns casos. Além disso, a quimioterapia pode induzir imunossupressão, alterando a resposta produzida pelo hospedeiro e agravando a doença (Targett, 1985).

Tais processos de interação entre o sistema imune e a eficácia do tratamento já foram demonstrados para algumas parasitoses como a malária, Taliaferro (1948) observou que frangos esplenectomizados infectados com *Plasmodium gallinaceum* respondiam a quinina de maneira menos efetiva do que os frangos imunocompetentes. Mayxay et al. (2001) estudando a malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, observaram que pacientes submetidos ao tratamento e curados, apresentavam níveis séricos de imunoglobulinas do tipo IgG e IgM superiores aos pacientes não curados, evidenciando o papel dos anticorpos na resposta terapêutica antimalárica.

O tratamento com pentamidina dimetilsulfonato, aumentou a resposta linfoproliferativa e os níveis séricos de anticorpos em cães portadores da leishmaniose visceral em relação aos cães que não receberam tratamento (Rhalem et al. 1999). Na esquistossomose, o Praziquantel foi menos efetivo em camundongos depletados de células T e

infectados com *Schistosoma mansoni* do que em camundongos normais (Doenhoff et al. 1987). Ali e cols. (2003), verificaram que o tratamento de pacientes com microfilariose causada por *Onchocerca volvulus* com Ivermectina, foi seguido por um aumento na resposta imune que reduziu significativamente o efeito dermatológico da parasitose em portadores da forma atenuada da doença. Esse efeito não foi observado no grupo controle portador da forma severa.

Assim como em outras parasitoses, a doença de Chagas têm a resposta imunológica como um importante fator na resistência e controle da infecção pelo *T. cruzi*. Alguns trabalhos tem evidenciado a importância do sistema imune na eficácia do tratamento terapêutico. Índícios dessa ação cooperativa foram obtidos através de trabalhos realizados com o NFX. Lelchuk et al. (1977a,b) observaram que o tratamento com NFX pode suprimir a resposta imune mediada por célula. Meckert et al. (1988) constataram que camundongos chagásicos crônicos submetidos ao tratamento com NFX apresentam uma redução dos anticorpos anti-*T. cruzi* envolvidos na destruição dos parasitos. Essa redução causa uma perda na resistência a reinfeção com alto inóculo de parasito, pois altera a resposta imune humoral. Diferentemente, os animais chagásicos não-tratados controlaram melhor o nível de parasitemia, assim como os camundongos primo-inoculados.

Rassi et al. (2002) testaram a possibilidade de utilizar conjuntamente o NFX e corticóide (Betametasona) para tratar a infecção crônica de 10 pacientes chagásicos, esperando que o fato do corticóide acentuar a infecção pudesse facilitar a ação anti-*T. cruzi* da droga. Comprovadamente o esquema terapêutico não funcionou e apenas um paciente obteve negatificação prolongada do xenodiagnóstico, no entanto, com imunofluorescência indireta e prova imunoenzimática positiva. Alguns pacientes desenvolveram cardiopatia ou tiveram agravamento de uma condição pré-existente.

O BZ tem sido alvo de diversas pesquisas experimentais e clínicas para avaliação da resposta imunológica durante a quimioterapia, visando identificar o grau de interação entre ambos e a interferência na cura.

Lages-Silva et al. (1990) observaram que macrófagos de camundongos tratados com Megazol, NFX e BZ apresentaram maior fagocitose das formas sanguíneas de *T. cruzi*, quando comparados aos controles não-tratados. O parasito desaparecia da circulação sanguínea cerca de seis horas após a administração de uma única dose alta do quimioterápico. Os autores sugerem que a interação entre a droga e o sistema imune é fundamental para cura, podendo haver alterações da membrana de superfície do parasito após o tratamento, expondo moléculas reconhecidas pelo sistema imunológico.

Resultados semelhantes foram descritos por Murta e cols. (1999). Eles verificaram um aumento significativo na fagocitose e destruição dos parasitos por macrófagos murinos incubados com tripomastigotas provenientes de camundongos 3 horas após o tratamento com BZ. Também foi constatado um aumento nos níveis de IL-12, TNF- α e NO induzidos por IFN- γ . Porém, esse efeito foi observado apenas em animais infectados com uma cepa de *T. cruzi* sensível ao BZ, sugerindo que a interação do sistema imune com a eficácia terapêutica na doença de Chagas, depende também de características biológicas do parasito. Michailowsky e cols. (1998) verificaram que os níveis de produção de citocinas é cepa-específico, ou seja, as cepas benzonidazol-resistentes (Colombiana e VL-10) são potentes indutoras de IL-12 *in vitro* e *in vivo*, mais do que as cepas sensíveis (CL e Gilmar) e parcialmente resistente (Y).

Resultados conflitantes aos apresentados, foram descritos por Revelli e cols. (1999). Eles pesquisaram a alteração causada pelo tratamento com BZ sobre o nível de algumas citocinas específicas, produzidas pela cultura de macrófagos de ratos infectados *in vitro* com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Os pesquisadores verificaram uma redução na produção de nitrito, IL-6 e IL-10 para níveis quase não detectáveis, além da inibição completa do gene que codifica a enzima iNOS. Houve também uma pequena redução no nível de TNF- α . Para os autores, esses resultados levam à hipótese de que o BZ pode alterar o balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, amenizando o possível dano tecidual que poderia ser ocasionado pelo acúmulo de NO, que em altos níveis pode estar envolvido em processos patológicos.

Piaggio e cols. (2001) analisaram o efeito imunológico do tratamento com BZ de ratos infectados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Estes ratos foram submetidos a diferentes esquemas terapêuticos: dose curativa de BZ (25 mg/Kg), IFN- γ recombinante, dose subótima (25 ou 50% da dose curativa) de BZ e BZ + IFN- γ recombinante. Os grupos que receberam BZ tiveram redução de metabólitos derivados de NO, ao contrário do que ocorreu em ratos que receberam apenas IFN- γ recombinante. Além disso, os ratos que receberam apenas IFN- γ recombinante ou dose subótima de BZ, apresentaram aumento nos níveis de IL-1 β e IL-2, que estiveram reduzidos no grupo que recebeu BZ em conjunto com a imunoterapia com IFN- γ . Esses resultados evidenciam que há diferença no efeito imunomodulador de acordo com o protocolo de tratamento empregado.

Olivieri et al. (2002) ao realizarem tratamento de camundongos suíços infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, verificaram que o BZ (100 mg/Kg/dia) induziu esplenomegalia no 9º dia de tratamento, seguida pelo aumento no número de células no baço e linfonodos. Esse efeito

persistiu até o 14º dia e não foi observado em camundongos não tratados. A análise do fenótipo de linfócitos realizada no 14º dia, demonstrou que o BZ induz uma regulação baseada na expansão de LT CD8⁺ efetores e de memória, gerando uma concentração de LT que conferem resistência a um segundo desafio e reduzem a frequência da apoptose nos órgãos linfóides periféricos.

A utilização de rIL-12, em conjunto com o tratamento pelo BZ de camundongos infectados com a cepa resistente Colombiana, aumentou significativamente a taxa de cura de 13% para 69-100% (Michailowsky et al. 1998). Bahia-Oliveira e cols. (1998 e 2000) realizaram pesquisa clínica e imunológica de pacientes que haviam sido tratados com nitroderivados (NFX ou BZ) durante a fase aguda. Os pacientes curados apresentavam resposta imune proliferativa contra *T. cruzi* com níveis de IFN- γ maiores que os pacientes não-curados, podendo indicar a importância dessa citocina na cura da infecção humana.

Em estudo realizado em nosso laboratório, Romanha e cols. (2002) testaram a atividade das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-12 e TNF- α , da citocina anti-inflamatória IL-4 e da iNOS, na cura parasitológica da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Para isso, utilizaram camundongos normais e knockouts infectados com a cepa Y e tratados com BZ. Os resultados mostraram cura de 100% nos camundongos selvagens e falha completa do tratamento em camundongos depletados de IFN- γ . Isso evidencia a influência do IFN- γ assim como da IL-12 (58% de cura), na eficácia da quimioterapia com BZ.

1.7 Critério de cura na quimioterapia experimental

Os métodos sorológicos como ELISA (Ensaio imunoenzimático) e RIFI (Reação de imunofluorescência indireta) são amplamente utilizados e correspondem aos métodos diagnósticos de eleição para triagem da doença de Chagas nos bancos de sangue. Eles são utilizados pela praticidade na realização, pois permitem uma análise de múltiplas amostras simultaneamente, com baixo custo. Mais recentemente, a técnica de PCR vem sendo testada em ensaios experimentais e clínicos, demonstrando bons resultados, principalmente para detecção de falha terapêutica em humanos (Galvão et al. 2003, revisto por Portela-Lindoso & Skinai-Yasuda, 2003). Gomes e cols. (1999) compararam amostras de indivíduos chagásicos através de testes parasitológicos, sorológicos e moleculares e verificaram que a PCR apresenta uma maior sensibilidade em relação aos outros métodos testados. Para o diagnóstico da doença de Chagas experimental, os métodos parasitológicos são empregados frequentemente, pela facilidade e baixo custo. Entre estes testes o xenodiagnóstico, assim

como a hemocultura, demonstram alta sensibilidade na fase aguda onde há uma parasitemia patente (assim como o exame a fresco). Ambas as técnicas também apresentam bons resultados para o diagnóstico da fase crônica (revisto por Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003). No entanto, a hemocultura é mais utilizada, devido à dificuldade de criação e manutenção dos triatomíneos para a realização do xenodiagnóstico.

Chiari & Brener (1966) obtiveram 31,4% de positividade no xenodiagnóstico e 25,7% na hemocultura de 35 pacientes chagásicos crônicos, quando a amostra foi colhida uma única vez. Posteriormente, também em fase crônica, Chiari et al. (1989) obtiveram 55,8% de positividade na hemocultura contra 27,5% no xenodiagnóstico, devido ao aumento no volume de sangue colhido de cada paciente. Testando a viabilidade da utilização da hemocultura em condições de campo, Fernandes et al. (1995) comprovaram a superioridade da hemocultura, com 53,3% contra 13,3% do xenodiagnóstico. Luz e cols. (1994) demonstraram alta sensibilidade (94%) da hemocultura na detecção de parasitos no sangue de pacientes crônicos, atribuindo esses resultados a modificações feitas na técnica que incluem a redução do período de processamento do sangue, homogeneização e exame prolongado (até 120 dias após a realização).

1.9 Utilização de camundongos normais e “knockouts” como modelo de estudo *in vivo*

O tratamento da doença de Chagas em modelos murinos, tem sido amplamente utilizado com o intuito de verificar a eficiência das droga, antes de um possível ensaio clínico. Em geral, esse tratamento é realizado por via oral, com concentrações específicas de cada droga, em um esquema de 20 dias (iniciado no quarto dia pós-infecção). Além dos estudos de quimioterapia, esses animais são muito utilizados para o entendimento das características biológicas das diferentes cepas de *T. cruzi*.

Os camundongos knockouts, assim denominados por apresentarem defeitos genéticos definidos (mutação nula homozigótica), surgem como uma nova alternativa para a pesquisa. Esses camundongos, apresentam eliminação proposital de um ou mais genes, gerado por meio de recombinação homóloga (Abbas et al. 2002). Sequências de DNA homólogas ao gene que se deseja eliminar, são transfectadas em células de embrião. Posteriormente, as células são reimplantadas em fêmeas receptoras e a linhagem deficiente é obtida (revisto por Babinet & Cohen-Tannoudji, 2001). Esta tecnologia tem aumentado o entendimento das funções imunes, pela redução na expressão de componentes imunológicos que acarretam uma resposta deficiente (Yeung et al. 1994). Além disso, a interação molecular envolvendo componentes

imunológicos e a quimioterapia pode ser detalhada em camundongos knockouts para citocinas, receptores de superfície celular, moléculas de sinalização e fatores de transcrição.

Na doença de Chagas foram realizados vários estudos com camundongos knockouts, que elucidaram mecanismos da resposta imune e da patogênese. Como por exemplo, Campos e cols. (2004) avaliaram a influência do Toll-like receptor 2 (TLR2) e do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) na infecção pelo *T. cruzi*. Os autores verificaram que camundongos knockouts para TLR2 apresentam uma resposta inflamatória robusta e não têm aumento na suscetibilidade. Por outro lado, os camundongos knockouts para MyD88 são mais suscetíveis à infecção, apresentando alta parasitemia e mortalidade. Arantes e cols. (2004) observaram que camundongos knockouts para IFN- γ ou iNOS infectados pelo *T. cruzi*, apresentam redução na deservação intestinal quando comparados aos camundongos selvagens. Os autores sugeriram que a deservação é causada pela produção de NO estimulada pelo IFN- γ . Waghbi et al. (2002) verificaram que em camundongos knockouts para alfa-2-macroglobulina infectados pelo *T. cruzi*, há um aumento na fibrose do coração, indicando que esse componente contribui para resistência dos camundongos à miocardite. Em estudos da quimioterapia, Romanha e cols. (2002) utilizaram camundongos knockouts para algumas citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-4, TNF- α) e a enzima iNOS. Os camundongos foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com BZ. Os autores identificaram o IFN- γ como um componente fundamental para a atividade do BZ.

2. JUSTIFICATIVA

Como evidenciado em algumas parasitoses, há uma interação positiva entre o sistema imunológico do hospedeiro e os fármacos, aumentando a eficácia terapêutica. Atualmente existem poucas informações sobre o envolvimento do sistema imune na eficácia terapêutica da doença de Chagas. Os poucos trabalhos existentes referem-se mais ao BZ, que é o fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas no Brasil. O BZ cura 76% dos pacientes na fase aguda, mas somente 8% dos pacientes na fase crônica (Cançado, 1999). Além disso, ele é menos eficiente no tratamento de animais imunossuprimidos (Toledo et al. 1991) e ineficaz em animais deficientes em IFN- γ (Romanha et al. 2002). Somado a isso, o BZ foi mais eficaz no tratamento de pacientes chagásicos que apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ (Bahia-Oliveira et al. 2000) e em animais tratados simultaneamente com BZ e rIL-12 (Michailowsky et al. 1998).

A identificação de novas drogas com atividade anti-*T. cruzi* “in vivo” é muito esperada. É necessário que se consiga uma droga eficaz para o tratamento de indivíduos chagásicos crônicos com o sistema imunológico intacto. Inclusive também é necessário a identificação de drogas cuja eficácia independa da resposta imune do hospedeiro, para que se possa tratar com sucesso pacientes chagásicos imunodeficientes (portadores do HIV e submetidos a quimioterapia imunossupressiva pós-transplante), que apresentam reagudização da infecção crônica.

A possibilidade de que os IBEs possam ser uma dessas drogas, foi mostrado no tratamento de camundongos infectados com o *T. cruzi* nas fases aguda e crônica da infecção com cepas sensíveis e resistentes ao BZ (Molina et al. 2000a,b; Urbina et al. 2000, Urbina et al. 2003a,b) e no tratamento de camundongos chagásicos imunossuprimidos com ciclofosfamida (Molina et al. 2000a). Em especial, o POS foi capaz de prolongar a sobrevivência, controlar melhor parasitemia e acessar a cura mais eficientemente que o BZ.

Neste trabalho propomos investigar a influência de citocinas e células do sistema imune na atividade do inibidor da biossíntese de ergosterol (Posaconazol), na infecção experimental pelo *T. cruzi*. Esta investigação justifica-se na medida que visa aprofundar nosso conhecimento na atividade deste fármaco, considerando as características biológicas da cepa de *T. cruzi* utilizada e o papel de alguns efetores do sistema imune do hospedeiro na eficácia terapêutica do POS.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a influência de citocinas e células do sistema imune na atividade do inibidor da biossíntese de ergosterol (Posaconazol) na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a influência de citocinas e linfócitos no desenvolvimento da fase aguda da doença de Chagas experimental;
- Monitorar a parasitemia, sobrevivência e a cura de camundongos knockouts e selvagens infectados com *T. cruzi* e tratados com POS e BZ;
- Comparar a eficácia do tratamento de camundongos infectados com *T. cruzi* e destituídos (knockouts) de LT CD4+, LT CD8+, LB, IFN- γ e IL-12.

4. MATERIAIS & MÉTODOS

4.1 Local

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular e no Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.2 Animais

Neste estudo, foram utilizados camundongos C57Bl/6 que são o background genético de todos os camundongos knockouts. Entre os knockouts (KO), utilizamos camundongos depletados de citocinas (IFN- γ KO e IL-12 KO) e de células (LT CD8⁺ KO, LT CD4⁺ KO e LB KO). Sobre os camundongos, suas deficiências e procedência se encontram na Tabela 1. Os camundongos normais e KO tinham entre 6-12 semanas de idade, foram mantidos em condições climatizadas e protegidos por barreiras ambientais em estantes especiais, no biotério de experimentação do CPqRR, recebendo água e alimento *ad libitum*. O número de camundongos utilizados por grupo, está relacionado na Tabela 2.

Tabela 1 – Camundongos utilizados, com suas deficiências e procedência.

DEFICIÊNCIA		
CAMUNDONGO	(Gene deletado)	PROCEDÊNCIA
IFN- γ KO	IFN- γ	USP (Ribeirão Preto/SP)
IL-12KO	Subunidade p40 da IL-12	USP (Ribeirão Preto/SP)
LT CD4 ⁺ KO	MHC do tipo II	USP (Ribeirão Preto/SP)
LT CD8 ⁺ KO	Proteína β -2 microglobulina	UFMG (Belo Horizonte/MG)
LB	Cadeia pesada μ	CPqRR (Belo Horizonte/MG)
C57Bl/6	Nenhuma	CPqRR (Belo Horizonte/MG)

4.3 Infecção

Para infecção dos camundongos, foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*, isolada de um caso humano agudo do município de Marília, São Paulo através de xenodiagnóstico (Silva & Nussenzweig, 1953). Esta cepa é mantida em nosso laboratório através de passagens sanguíneas sucessivas em camundongos albinos. Ela é considerada parcialmente resistente ao BZ (Filardi & Brener, 1987; Murta et al. 1998), e é reticulotrópica, ou seja, apresenta tropismo por células do sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula), infectando preferencialmente macrófagos (Andrade & Lopes, 1963). A cepa apresenta o predomínio de tripomastigotas delgados no sangue, com cinetoplasto pontual localizado na região posterior, flagelo curto, núcleo alongado e situado na posição mediana (Brener & Chiari, 1963).

Para iniciar os experimentos, o sangue foi colhido do plexo venoso orbital com pipeta de Pasteur de camundongos albinos que estavam no pico de parasitemia. O sangue foi diluído em citrato de sódio 3,8% (1:3 v/v) e injetado intraperitonealmente em camundongos C57Bl/6 e KO, com uma seringa de 1 ml. Todos os camundongos foram infectados com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos/animal. A confirmação da infecção foi feita pelo exame de sangue a fresco no 4º dia após a infecção (4 dpi).

4.4 Parasitemia

A parasitemia foi monitorada do 4º ao 60º dia após a infecção. Foram colhidos 5µl de sangue da cauda dos animais, e colocados entre lâmina (26 x 76 mm) e lamínula (22 x 22 mm). Foi realizada leitura de 50 campos em microscópio óptico (Zeiss®), com objetiva de 40X, ocular de 10X e fator de correção 106. A parasitemia foi determinada segundo Brener (1962) e corresponde ao número de parasitos visualizados em 50 campos, multiplicado pelo fator de correção do microscópio (número de tripomastigotas x $10^3/5\mu\text{l}$ de sangue).

4.5 Sobrevivência

A sobrevivência dos camundongos foi acompanhada até o 60º dia após a infecção, através da inspeção diária das gaiolas. As mortes eram anotadas e posteriormente, era calculado o percentual de sobreviventes.

4.6 Drogas

O tratamento foi realizado com BZ ((N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, Rochagan® Roche, Brasil) e o POS, ({(-)-4-[4-[4-[4-[[[2R-*cis*]-5-(2,4 difluorofenil) - tetrahydro-5-(14 - 1,2,4 - triazol-1-yl-metil) furan -3-yl]] metoxi] fenil]-2-4-dihidro-2-[(S)-1-etil-2(S)-hidroxipropil]-3,4-1,2, 4 – triazol – 3 – one), cedido pela Schering-Plough Research Institute, Kenilwort, New Jersey, USA.

O BZ foi dissolvido em água, contendo 1% de goma arábica. Para administração do POS, utilizamos água Milli Q, contendo 2% de metilcelulose (Aldrich Chemical Company) e 0,5% de Tween 80 (Sigma). A água é aquecida à 40°C e a metilcelulose é adicionada, agitando a solução por 20 minutos. Após esse período, a solução permanece na geladeira (4°C) por 30 minutos, ou até que fique transparente. Transcorrido esse período, acrescenta-se o Tween 80, completa-se o volume (q.s.p. 100 ml), agitando até que fique homogêneo. A solução fica estocada a 4°C.

4.7 Tratamento

Os camundongos normais e KO foram divididos em três grupos:

Grupo 1 – Tratado com POS

Grupo 2 – Tratado com BZ

Grupo 3 – Não-tratado

O tratamento foi iniciado no 4º dia após a infecção, após a confirmação da presença do *T. cruzi* no exame de sangue a fresco, ao microscópio óptico. Foram utilizados 100mg/kg/dia de BZ, em dose única e, 20mg/kg/dia de POS, dividido em duas doses diárias (10mg/Kg/dia cada), a cada 12 horas. Os camundongos eram pesados semanalmente para que recebessem a

dose individualizada, de acordo com seu peso corporal. O POS e o BZ foram administrados por via oral, através de gavagem utilizando agulha especial para tratamento (Thomas), durante 20 dias consecutivos.

4.8 Hemocultura

Entre 30 e 40 dias após o término do tratamento, os camundongos negativos pelo exame de sangue a fresco, tiveram amostras de sangue colhidas assepticamente (em um volume de 0.4 ml) do seio venoso orbital com pipeta de Pasteur. O sangue, foi distribuído em dois tubos contendo 5 ml de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964). O meio LIT é obtido a partir da mistura de três soluções:

- **Solução 1** - Infuso de fígado - “Liver infusion broth” (LIB – DIFCO): preparado a 10% em água bidestilada e autoclavado a 120°C por 20 minutos;
- **Solução 2** - 4X sais: preparado com água bidestilada (2l), contendo 40g de NaCl, 4g KCl, 80g de Na₂HPO₄ anidro e 50g de triptose. Após acrescenta-se 5 ml de trietanolamina (SIGMA) e 250 mg de hemina (SIGMA) (que foram misturadas previamente). O pH é acertado para 7.4 (com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio) e o volume é completado com água bidestilada (q.s.p. 2,5l).
- **Solução 3** – Glicose: preparada a 40% em água bidestilada e autoclavada a 120°C por 20 minutos.

Para o preparo do LIT, acrescenta-se 25 ml da solução 1, 125 ml da solução 2 e 5 ml da solução 3. Além disso, o meio é suplementado com 10% de soro bovino fetal estéril, inativado pelo calor (56°C por 30 minutos) e antibiótico (Gentamicina – 10mg/l). Completa-se a solução final com água bidestilada (q.s.p. 500ml).

Os tubos foram incubados a 28°C, em incubadora BOD, e levemente agitados periodicamente para aeração, favorecendo assim o crescimento do parasito (Luz et al. 1994). A leitura da hemocultura foi realizada ao microscópio óptico, após 30 e 60 dias de incubação. A ausência de parasitemia e a negatificação da hemocultura foram os critérios de cura parasitológica adotados.

4.9 Análise estatística

Foram calculadas a média e o desvio-padrão da parasitemia dos camundongos não tratados e tratados com POS e BZ, utilizando o Microsoft Excel (Windows XP®). Para comparar, cada ponto de tempo da curva de parasitemia dos grupos tratados com POS e BZ, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, considerando a natureza assimétrica de distribuição dos valores. A estimativa das taxas de sobrevivência dos diferentes grupos foram calculados através dos métodos não paramétricos de Kaplan-Meier e comparados pelos testes Logrank e Wilcoxon. Para analisar as taxas de cura dos camundongos foi utilizado o teste de Qui-quadrado e o método de Bonferroni para comparações múltiplas. As análises foram realizadas no programa estatístico MiniTab. Os testes de Mann-Whitney, Kaplan-Meier, LogRank, Wilcoxon e Qui-quadrado foram realizados com 95% de confiança e considerados significativos quando $p < 0,05$. As comparações múltiplas pelo método de Bonferroni foram consideradas significativas quando $p < 0,0167$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos camundongos C57Bl/6

De acordo com nosso objetivo de avaliar a possível sinergia existente entre a eficácia da quimioterapia experimental e a imunidade do hospedeiro, utilizamos camundongos normais e knockouts, infectados com *T. cruzi* e tratados com POS e BZ por 20 dias consecutivos. Os camundongos C57Bl/6 apresentam o sistema imunológico intacto e representam o background genético dos camundongos knockouts integrantes deste estudo. Além disso, são considerados um bom modelo experimental para estudos da resposta imune, pois apresentam uma maior resistência à infecção com a cepa Y, quando comparados aos camundongos BALB/c, devido ao seu direcionamento natural para a resposta protetora do Th1 durante a infecção pelo *T. cruzi*. Sendo assim, infectamos e tratamos os camundongos C57Bl/6 para que servissem como parâmetro de comparação para os camundongos imunodeficientes, e também como controle do experimento em relação ao comportamento da cepa no hospedeiro e atividade das drogas testadas.

Os camundongos C57Bl/6, não tratados, apresentaram pico de parasitemia no nono dia após a infecção, com uma intensidade semelhante aos descritos para a cepa Y na literatura (Romanha e cols. 2002), neste mesmo hospedeiro (Figura 7). Os camundongos infectados e tratados com BZ ou POS, permaneceram negativos do início do tratamento (4° dpi) até o término do período de observação aos 60 dpi (Tabela 2).

Os camundongos não tratados tiveram uma mortalidade cumulativa de 90% aos 60 dpi (Figura 8). Apenas dois animais de um total de 22 camundongos sobreviveram, resistindo ao pico parasitêmico e posteriormente apresentando parasitemia subpatente ou ausente após 30 dpi. Entre os camundongos tratados com ambas as drogas, não foi observada mortalidade e a sobrevivência foi de 100% até o final das observações.

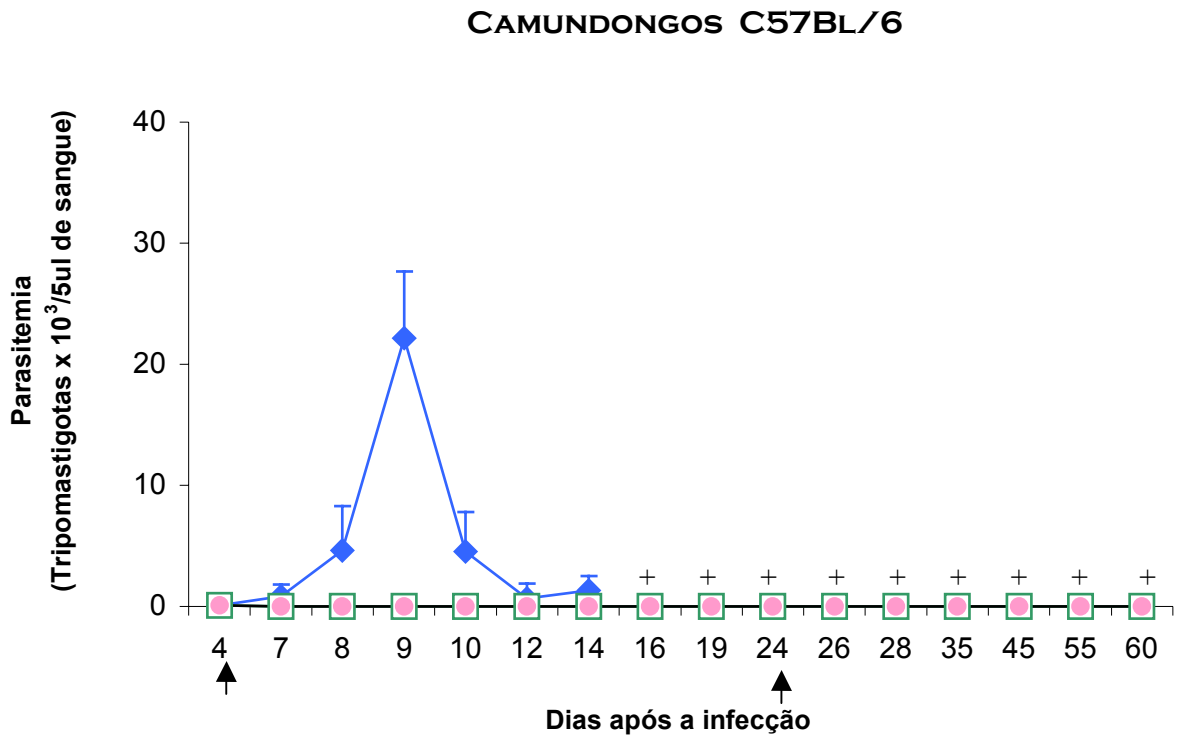


Figura 7 – Parasitemia dos camundongos C57Bl/6, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, tratados com ● Posaconazol (n=15), □ Benzonidazol (n=29) ou ◆ não tratados (n=22). As setas indicam o período de tratamento. + Detecção de poucos parasitos nas amostras de sangue do grupo não tratado. Os resultados apresentados correspondem a média de três experimentos. Para maiores detalhes ver Materiais e Métodos.

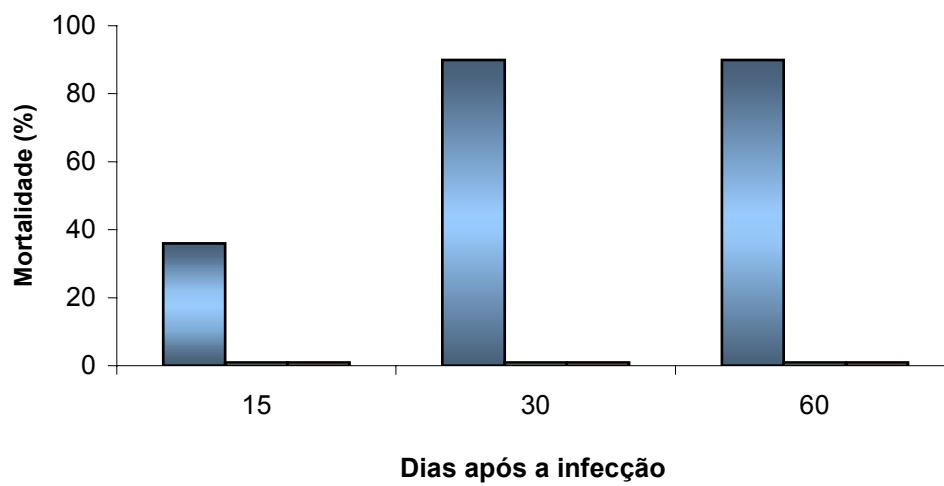


Figura 8 – Mortalidade dos camundongos C57Bl/6, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, tratados com ■ Posaconazol (n=15), ■ Benzonidazol (n=29) ou ■ não tratados (n=22). Os resultados apresentados correspondem a média de três experimentos independentes.

5.2 Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos camundongos IFN- γ KO

Como demonstrado anteriormente, o IFN- γ tem sido relacionado diretamente com a eficácia do tratamento clínico e experimental da doença de Chagas com o BZ. Em razão disto, resolvemos analisar a importância desta citocina no tratamento experimental com POS e compará-lo ao BZ, utilizando para isso camundongos deficientes no gene que codifica o IFN- γ . Essa mutação homozigótica, está localizada no cromossomo 10 e causa redução na função de macrófagos durante uma infecção, através da redução de produtos antimicrobianos e redução na expressão do MHC II. Além disso, observa-se redução na atividade das células NK (Dalton e cols. 1993).

Os camundongos IFN- γ KO, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, não tratados, apresentaram uma parasitemia muito elevada, comparada aos camundongos selvagens que têm o sistema imune intacto (C57Bl/6) (Figura 9).

Os camundongos tratados com POS e BZ, permaneceram negativos durante o período de tratamento; entretanto, no 26° dpi (2 dias após o término do tratamento), os camundongos tratados com BZ apresentaram reativação da infecção que durou até o 40° dpi, com pico parasitêmico no dia 35 dpi. Essa reativação atingiu 100% dos camundongos tratados com BZ (Tabela 2).

Entre os camundongos tratados com POS, a reativação da infecção foi observada no dia 31 dpi (7 dias após o término do tratamento), entretanto, 30% dos camundongos permaneceram negativos até o término das observações. Entre os camundongos que reagudizaram a infecção, não foi observado pico parasitêmico. Quando comparamos a curva de parasitemia dos dois grupos de camundongos tratados, observamos uma diferença significativa ($p < 0,05$), principalmente no 35° dpi ($p < 0,0007$) sugerindo que os camundongos tratados com POS controlaram mais a infecção.

Os camundongos não tratados, sucumbiram rapidamente à infecção, e apresentaram mortalidade cumulativa de 100% aos 15 dpi. Entre os camundongos tratados com BZ, a mortalidade cumulativa de 100% foi observada aos 48 dpi. Os camundongos tratados com POS, tiveram sua sobrevivência aumentada, e a mortalidade observada aos 60 dpi, foi de 55% (Figura 10a).

Quando comparamos a curva de sobrevivência dos camundongos tratados (Figura 10b), vemos que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0003$). O tratamento com POS prolongou a sobrevivência dos animais por mais 10 dias comparado ao BZ.

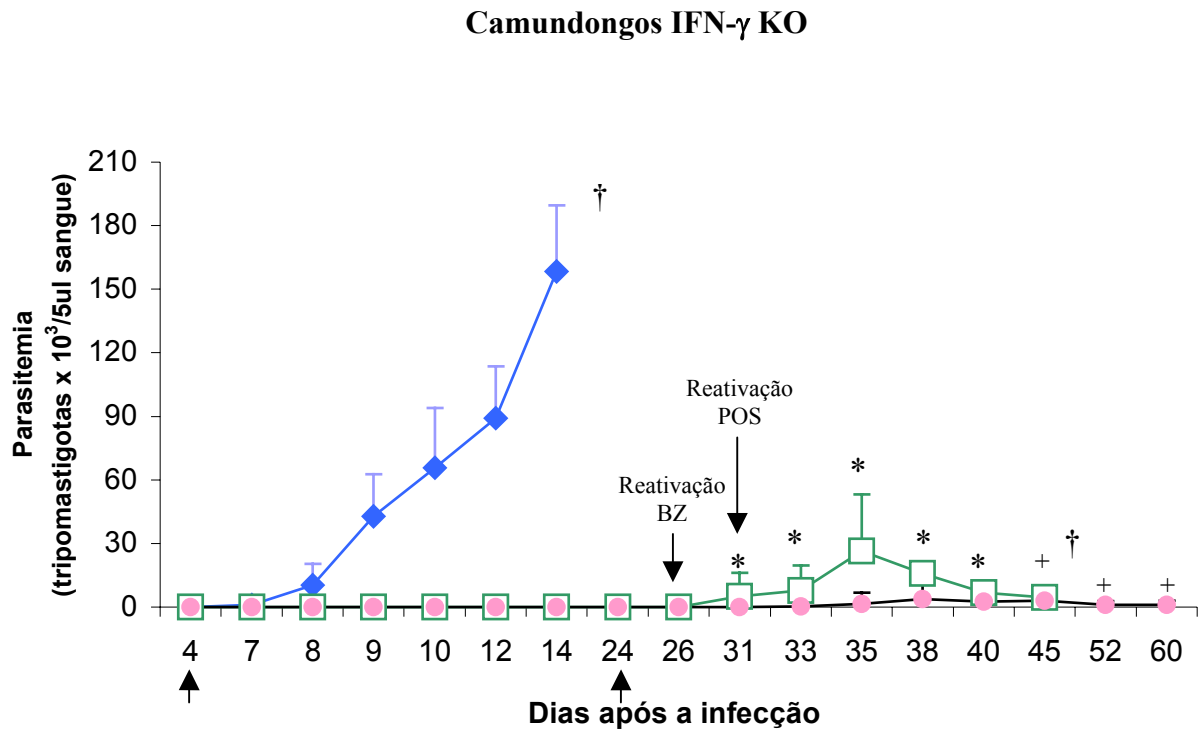


Figura 9 – Parasitemia dos camundongos IFN- γ KO, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, tratados com ● Posaconazol (n=20), □ Benznidazol (n=15) e ◆ não tratado (n=15). As setas indicam o período de tratamento. * P < 0.05, KO tratado com BZ vs. KO tratado com POS. + Raros parasitos circulantes nas amostras de sangue dos camundongos. † indica a morte de todos os camundongos do grupo. Os resultados apresentados correspondem a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver Materiais e Métodos.

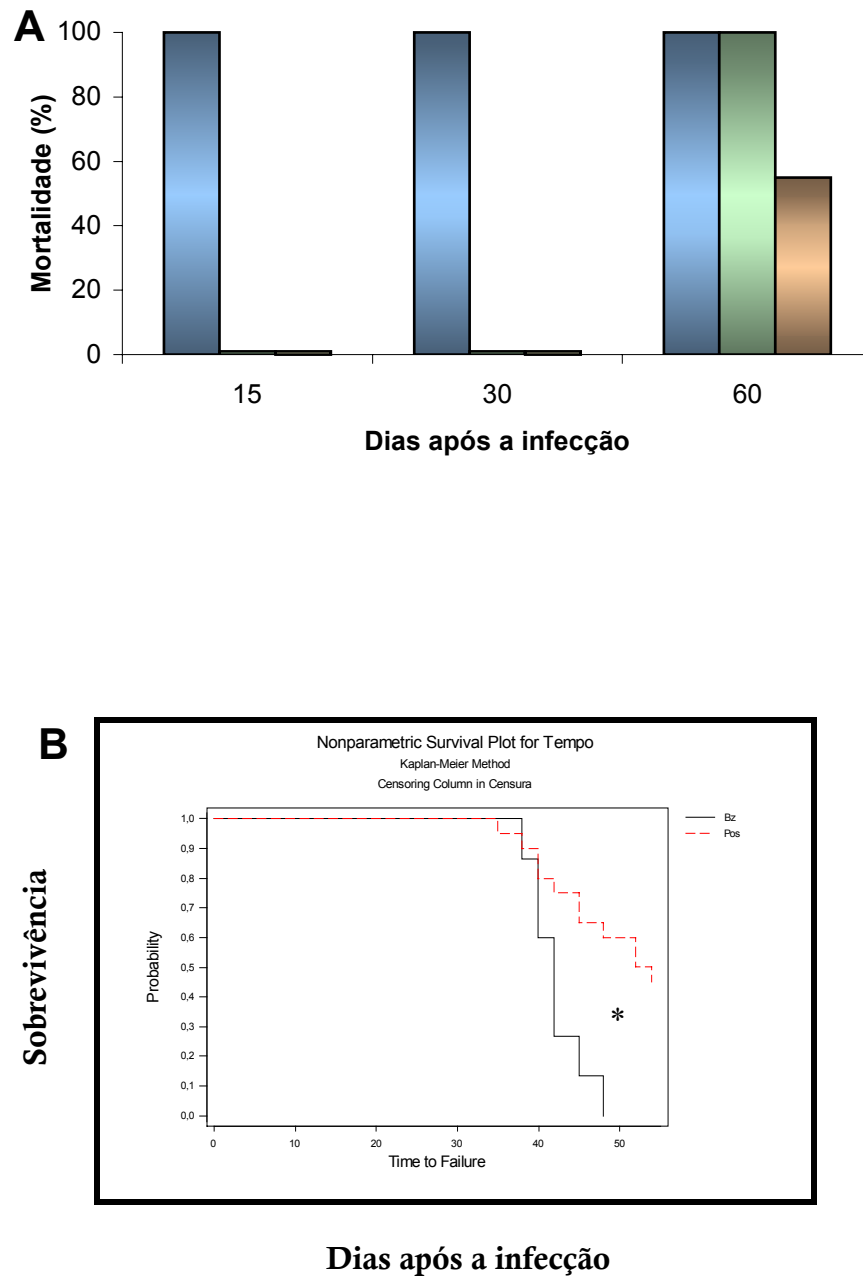





Figura 10 – Mortalidade (A) e sobrevivência (B) dos camundongos IFN- γ KO, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com  Posaconazol (n=20),  Benzonidazol (n=15) ou  não tratados (n=15). * $P < 0,05$ - KO tratado com BZ vs. KO tratado com POS. Os resultados correspondem a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver Materiais e Métodos.

5.3 Avaliação da parasitemia e sobrevivência dos camundongos IL-12 KO

Por ser a IL-12 uma importante citocina indutora de IFN- γ , e por ter sido descrito anteriormente que ela é capaz de aumentar a eficácia do BZ, infectamos com a cepa Y de *T. cruzi* camundongos deficientes nos genes que codificam a subunidade p40 da IL-12. Essa mutação é homozigótica, situa-se no cromossomo 11 e leva a uma severa restrição na habilidade para montar a resposta Th1, resultando em baixos níveis de IFN- γ . A produção de IFN- γ não é completamente abolida, devido a ação compensatória de certas citocinas, como a IL-18 (Abbas et al. 2002). No geral, os camundongos IL-12 KO têm aumento na produção de IL-4, frente a um agente infeccioso e reduzem a capacidade de resposta à hipersensibilidade do tipo tardia (Magram e cols. 1996).

Os camundongos IL-12 KO foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com POS ou BZ por 20 dias. Os camundongos não tratados, apresentaram um pico parasitêmico mais elevado que os camundongos normais (C57Bl/6) (Figura 7), porém controlaram melhor a infecção que os camundongos IFN- γ KO não tratados (Figura 9). Os camundongos tratados com BZ e POS permaneceram negativos durante o período de tratamento. Ambos os grupos, apresentaram reativação da infecção aos 38 dpi (14 dias após o término do tratamento), sem a ocorrência de pico parasitêmico (Tabela 2). Poucos parasitos foram detectados ao microscópio óptico, até o final das observações. Entre os camundongos tratados com BZ observou-se um percentual de 56% de reagudização da infecção e entre os tratados com POS o percentual foi de 76% (Figura 11).

A mortalidade observada entre os camundongos não tratados foi de 100% aos 15 dpi. Entre os camundongos tratados com BZ, a mortalidade foi de 17% aos 60 dpi e nos camundongos tratados com POS foi de 23% (Figura 12a). Quando comparamos a curva de sobrevivência dos camundongos tratados com POS e BZ, não encontramos diferenças estatisticamente significativas, o que indica que ambas as drogas atuam de forma semelhante na manutenção da sobrevivência dos camundongos IL-12KO (Figura 12b).

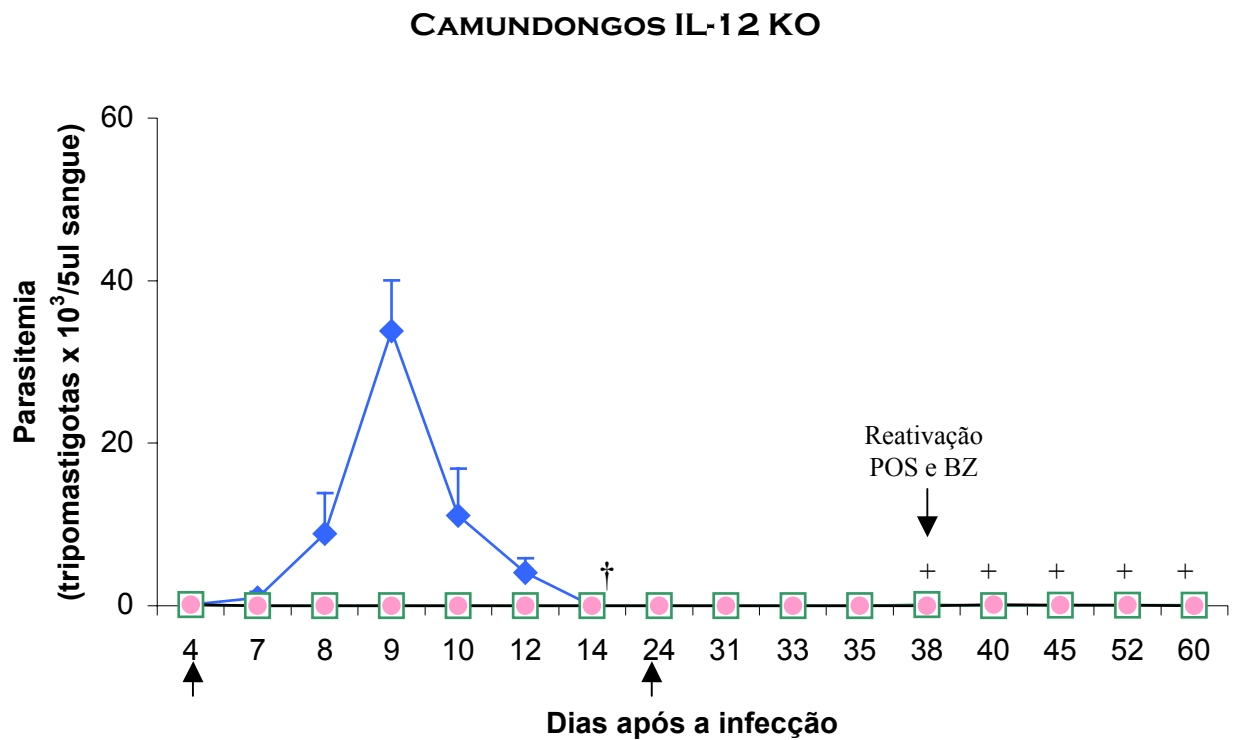


Figura 11 – Parasitemia dos camundongos IL-12 KO infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com ● Posaconazol (n=17), □ Benzonidazol (n=18) ou ◆ não tratados (n=17). As setas indicam o período de tratamento. + Raros parasitos nas amostras de sangue dos camundongos tratados com POS ou BZ. † indica a morte de todos os camundongos do grupo. Os resultados correspondem a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes, ver Materiais e Métodos.

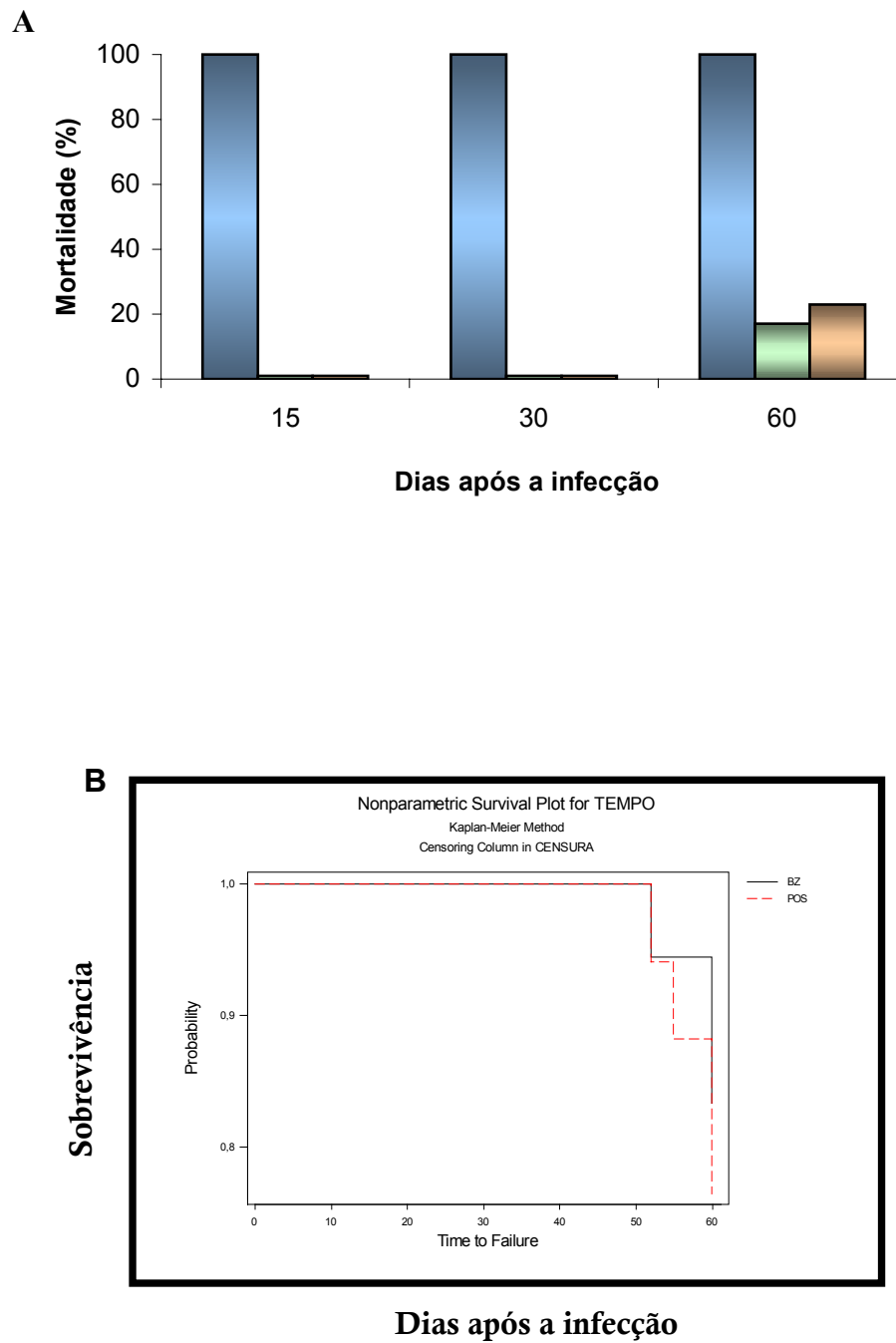





Figura 12 – Mortalidade (A) e sobrevivência (B) dos camundongos IL-12 KO infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com  Posaconazol (n=17),  Benznidazol (n=18) ou  não tratados (n=11).

5.4 Avaliação da parasitemia e da sobrevivência dos camundongos LT CD4⁺ KO

Atualmente diversos trabalhos tem salientado a importância dos linfócitos T CD4⁺ para a resistência contra a infecção pelo *T. cruzi*. Devido a uma mutação homozigótica no cromossomo 17, os camundongos apresentam uma deficiência na expressão dos genes do MHC II, e por consequência têm um decréscimo no número de células T CD4⁺ no timo, baço e linfonodos (Madsen e cols. 1999). Por essa razão, utilizamos esses camundongos para avaliar o papel dessas células. Esse grupo foi denominado LT CD4⁺ KO.

Como pode ser observado na Figura 13, os camundongos KO infectados com a cepa Y e não tratados, apresentaram uma curva de parasitemia mais elevada que a do grupo controle C57Bl/6 não tratado, com pico no 9 dpi também (Figura 7), menor que a do grupo IFN- γ KO (Figura 9) e semelhante ao grupo IL-12 KO (Figura 11). Os camundongos tratados com POS e BZ permaneceram negativos durante o período de tratamento. Todavia, foi observada a reativação da parasitemia em ambos os grupos tratados, ou seja, aos 31 dpi para os tratados com BZ e 35 dpi para os tratados com POS. A reagudização da infecção foi observada em 100% dos camundongos tratados tanto com POS quanto BZ, entretanto ela foi baixa ou moderada com ausência de pico parasitêmico (Tabela 2).

A mortalidade dos camundongos LT CD4⁺ KO não tratados chegou a 100% aos 15 dpi, conforme observado para outros grupos de camundongos knockouts. Entre os tratados, a mortalidade cumulativa foi de 94% aos 60 dpi, para ambos os tratamentos (Figura 14a). Quando comparamos a curva de sobrevivência (Figura 14b), vemos que houve diferença entre os tratamentos na manutenção da sobrevivência ao longo do experimento. O BZ foi capaz de prolongar a sobrevivência dos camundongos em média 5 dias a mais que o POS ($p < 0,05$).

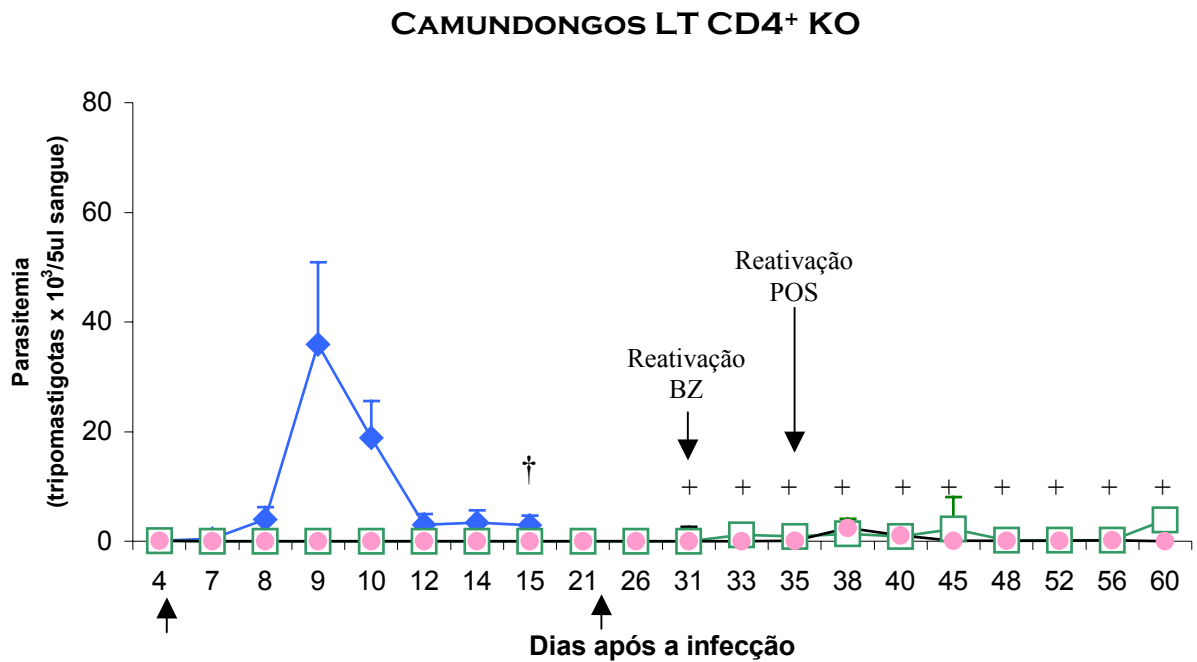


Figura 13 – Parasitemia dos camundongos LT CD4⁺ KO infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com ● Posaconazol (n=16), □ Benzonidazol (n=16) ou ◆ não tratados (n=15). As setas indicam o período de tratamento. + Raros parasitos nas amostras de sangue de todos os camundongos. † indica a morte de todos os camundongos do grupo. Resultados correspondem a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes ver Materiais e Métodos.

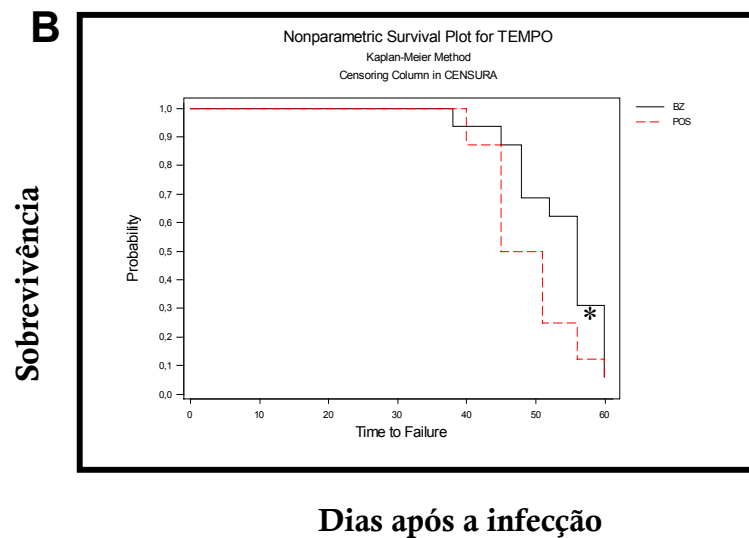
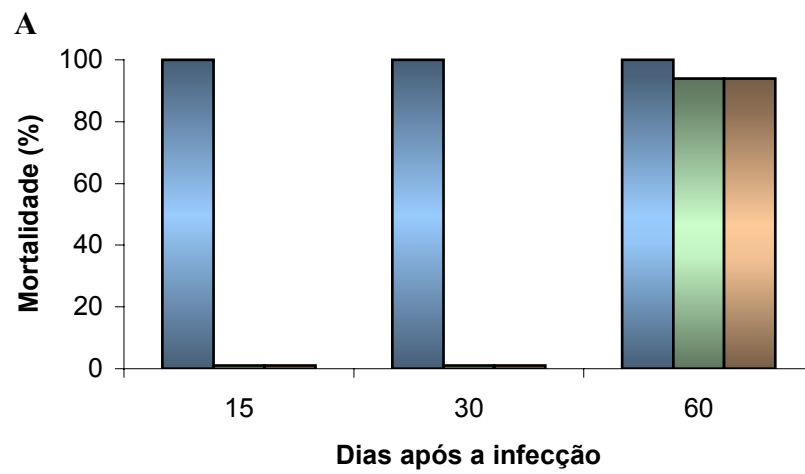





Figura 14 – Mortalidade (A) e sobrevivência (B) dos camundongos LT CD4⁺ KO infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com  Posaconazol (n=16),  Benzonidazol (n=16) ou  não tratados (n=15).

5.5 Avaliação da parasitemia e da sobrevivência dos camundongos LT CD8⁺ KO

Os linfócitos T CD8⁺ tem sido relacionados com a resistência à infecção pelo *T. cruzi*, assim como os LT CD4⁺. Por essa razão incluímos em nosso estudo, camundongos deficientes na proteína β-2-microglobulina, que falham ao expressar os produtos do gene do MHC de classe I o que leva a uma deficiência de LT CD8⁺ e da resposta citotóxica. Essa mutação homozigótica localiza-se no cromossomo 2 (Fung-Leung e cols. 1991). Esse grupo nós denominamos LT CD8⁺KO.

Os camundongos LT CD8⁺KO infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e que não receberam tratamento quimioterápico, apresentaram um pico parasitêmico no nono dia (Figura 15), semelhante ao grupo C57Bl/6 não tratado (Figura 7). Os camundongos tratados com POS e BZ permaneceram negativos durante o período de tratamento. Neste grupo também foi observada uma reativação discreta da infecção (Tabela 2). Apenas 22% dos camundongos tratados com BZ e 13% dos tratados com POS apresentaram reagudização da infecção. Para os camundongos tratados com BZ a presença de parasitos circulantes foi identificada aos 39 dpi (15 dias após o término do tratamento), enquanto que para os tratados com POS foi aos 49 dpi (25 dias após o término do tratamento) (Figura 15).

Os camundongos LT CD8⁺ KO não tratados apresentaram 100% de mortalidade aos 17 dpi. Entre os camundongos tratados com BZ a mortalidade aos 60 dpi foi de 14% e para os tratados com POS de 6%, o que pode ser considerada baixa quando comparado com os outros grupos de camundongos knockouts (Figura 16a). Os camundongos tratados com POS ou BZ apresentaram uma taxa de sobrevivência semelhante (Figura 16b), não havendo diferença significativa (observar a escala do gráfico).

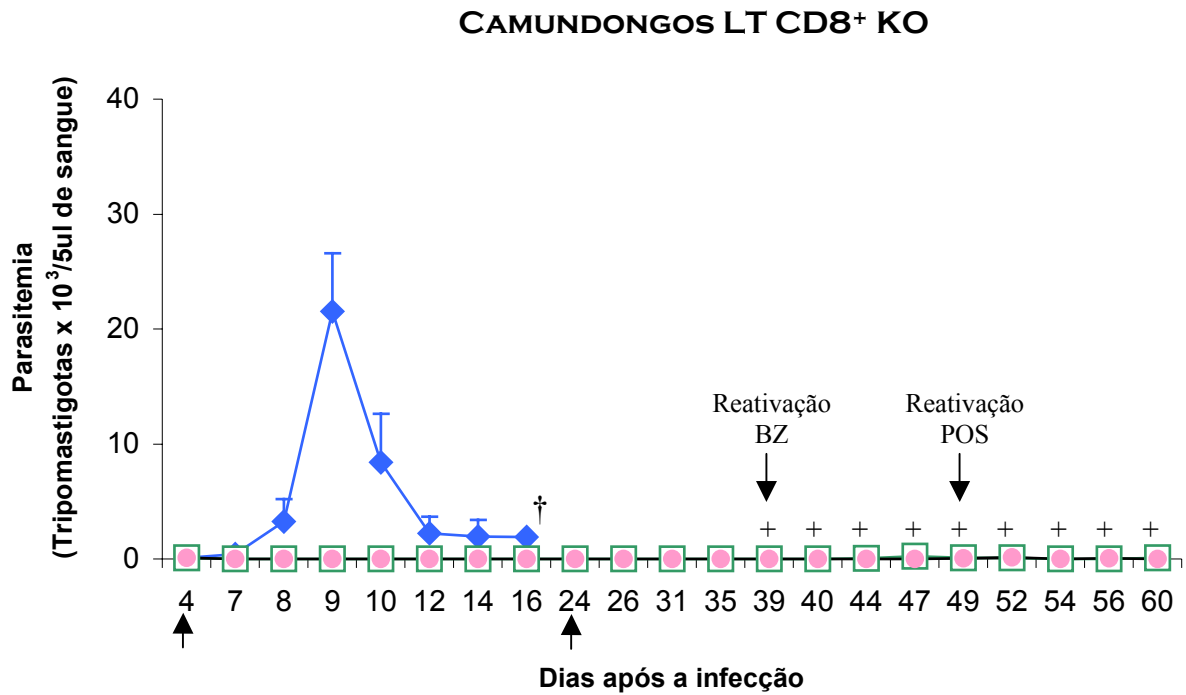


Figura 15 – Parasitemia dos camundongos LT CD8⁺ KO infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com ● Posaconazol (n=16) ou □ Benznidazol (n=29) ou ◆ não tratados (n=16). As setas indicam o período de tratamento. + Raros parasitos nas amostras de sangue de todos os camundongos. † indica a morte de todos os camundongos do grupo. Os resultados correspondem a média de dois experimentos independentes. Para maiores detalhes ver Materiais e Métodos.

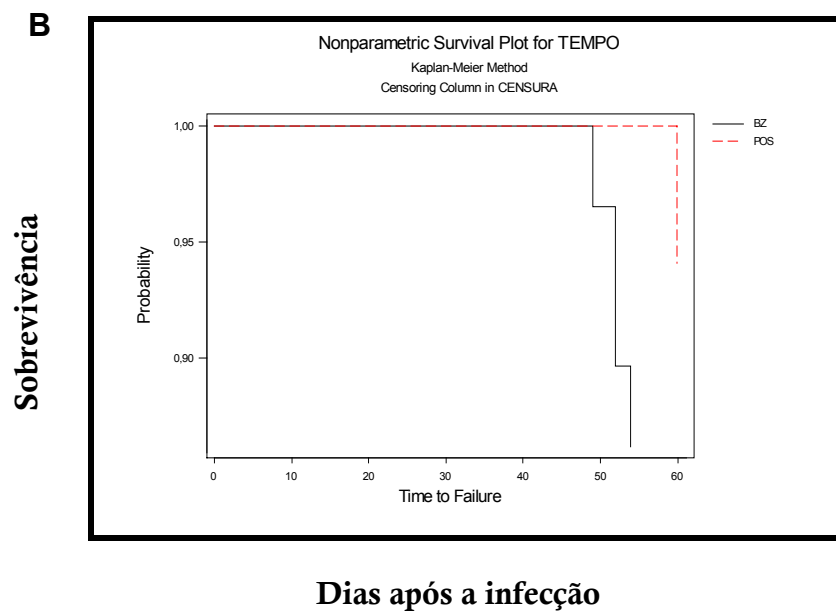
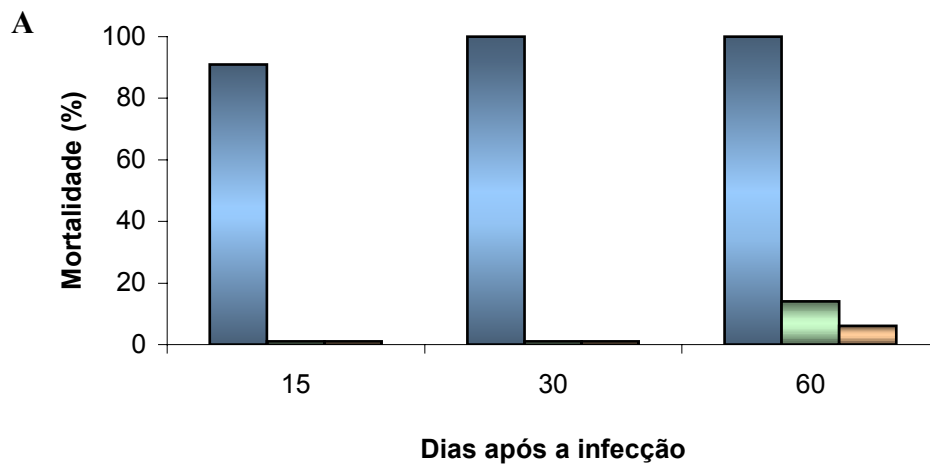





Figura 16 – Mortalidade (A) e sobrevivência (B) dos camundongos LT CD8⁺ KO, infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com  Posaconazol (n=16),  Benzonidazol (n=29) ou  não tratados (n=16).

5.6 Avaliação da parasitemia e da sobrevivência dos camundongos LB KO

Os linfócitos B tem sido implicados na resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Em razão disto, foram incluídos neste estudo camundongos deficientes em células B maduras, gerado por uma mutação homozigótica no gene que codifica a cadeia pesada μ de imunoglobulina e impede a expressão de IgM, que é o ligante de membrana nas células B virgens. Essa deficiência foi gerada através de uma mutação no cromossomo 12 (Jackson Laboratory, 2004).

Os camundongos LB KO foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Com relação a parasitemia, podemos constatar que os camundongos LB KO não tratados apresentaram pico no nono dia pós-infecção (Figura 17), com nível de parasitos inferior ao observado nos camundongos selvagens (Figura 7). Observamos também um segundo pico discreto no 14 dia após a infecção. 56% dos camundongos tratados com BZ apresentaram reativação da infecção aos 46 dpi (Tabela 2). Os camundongos tratados com POS foram negativos até o final das observações (60 dpi), sem reagudização da infecção (Figura 17).

Quanto a mortalidade deste grupo experimental, observamos 100% de mortalidade dos camundongos não tratados aos 17 dpi. Entre os tratados com BZ a mortalidade foi de 33% aos 60 dpi. Entre os camundongos tratados com POS não foi observada mortalidade (Figura 18a).

Quando avaliamos a curva de sobrevivência dos camundongos tratados (Figura 18b), verificamos que não existe diferença significativa entre os dois tratamentos, apesar do POS manter um percentual maior de camundongos vivos (observar a escala do gráfico).

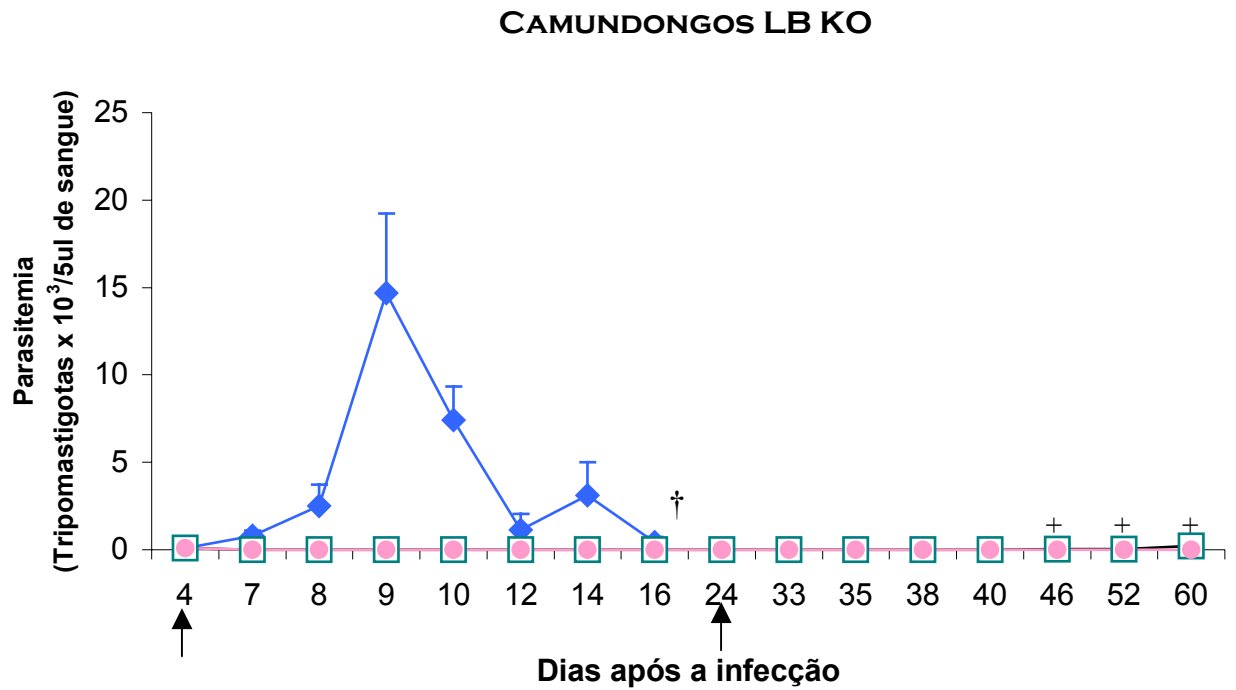


Figura 17 – Parasitemia dos camundongos LB KO infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com ● Posaconazol (n=7) ou □ Benzonidazol (n=9) ou ◆ não tratados (n=12). As setas indicam o período de tratamento. + Raros parasitos nas amostras de sangue dos camundongos. † indica a morte de todos os camundongos do grupo. Para maiores detalhes ver Materiais e Métodos.

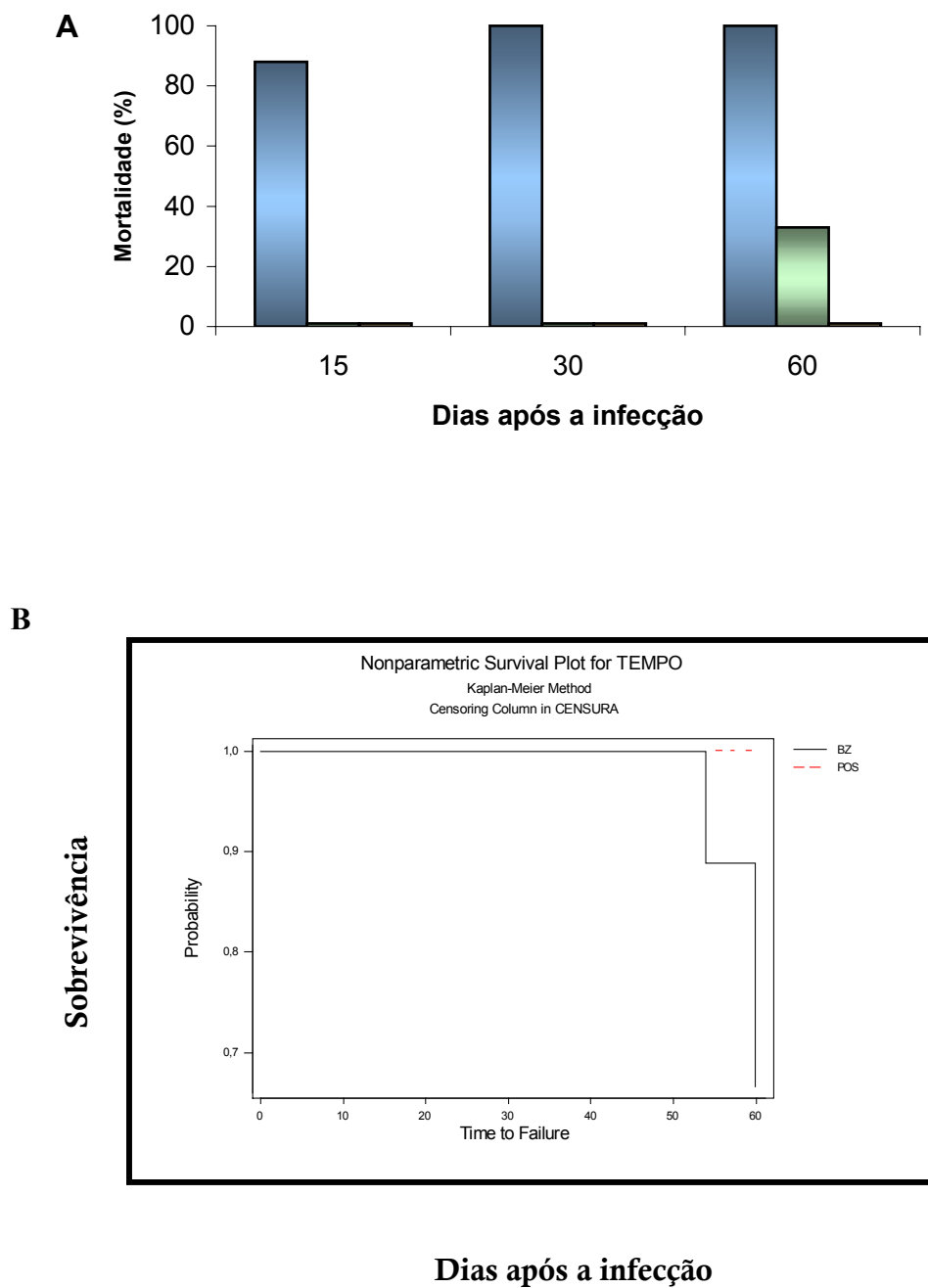


Figura 18 – Mortalidade (A) e sobrevivência (B) dos camundongos LB KO infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com Posaconazol (n=7), Benzonidazol (n=9) ou não tratados (n=12).

Tabela 2 – Parasitemia e mortalidade dos camundongos C57Bl/6 e knockouts infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com Posaconazol ou Benzonidazol por 20 dias.

GRUPO	Pico x 10 ³ (dia observado)	Reativação (% de reativados)	Mortalidade (%)		
			15 dias	30 dias	60 dias
C57Bl/6					
Não tratado	22 (9dpi)	-	30	91	91
Benzonidazol	-	-	0	0	0
Posaconazol	-	-	0	0	0
IFN-γ KO					
Não tratado	160 (9 dpi)	-	100	100	100
Benzonidazol	30* (35 dpi)	26 dpi (100)	0	0	100**
Posaconazol	4* (38 dpi)	31 dpi (70)	0	0	55**
IL-12 KO					
Não tratado	35 (9 dpi)	-	100	100	100
Benzonidazol	1 (38 dpi)	38 dpi (56)	0	0	17
Posaconazol	1 (40 dpi)	38 dpi (76)	0	0	24
LTCD4+ KO					
Não tratado	40 (9 dpi)	-	100	100	100
Benzonidazol	3 (33 dpi)	31 dpi (100)	0	0	94
Posaconazol	3 (38 dpi)	35 dpi (100)	0	0	94
LTCD8+ KO					
Não tratado	21 (9 dpi)	-	90	100	100
Benzonidazol	<1 (47 dpi)	39 dpi (22)	0	0	14
Posaconazol	<1 (52 dpi)	49 dpi (13)	0	0	6
LB KO					
Não tratado	15 (9 dpi)	-	90	100	100
Benzonidazol	< 1 (52 dpi)	46 dpi (56)	0	0	33
Posaconazol	-	-	0	0	0

Para os camundongos tratados refere-se ao valor observado após a reativação da infecção; * e ** diferença significativa entre os tratamentos no mesmo grupo de camundongos.

5.7 Cura parasitológica dos camundongos normais e KO tratados com POS e BZ

A cura parasitológica dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* e tratados com POS ou BZ foi determinada pela negativação do exame parasitológico ao microscópio e pela negativação da hemocultura realizada após 34 dias do término do tratamento. A taxa de cura das diferentes linhagens de camundongos está representada na Tabela 3.

Entre os camundongos **C57Bl/6** observou-se cura de 87% dos camundongos tratados com o POS e 86% dos camundongos tratados com BZ. Entre os camundongos não tratados, não detectamos cura parasitológica. Houve diferença significativa, ou seja, o POS e o BZ foram eficazes no tratamento da infecção, quando comparados ao grupo não tratado ($p < 0,000$).

Os camundongos **IFN- γ KO** não tratados ou tratados com o BZ apresentaram 0% de cura, demonstrando a importância desta citocina para este fármaco. Os camundongos tratados com o POS apresentaram uma cura de 15%. Não houve diferença significativa na taxa de cura dos camundongos tratados com POS, BZ ou Não tratados.

Nos camundongos **IL-12 KO** a taxa de cura observada entre os camundongos tratados com ambas as drogas foi muito semelhante. Os camundongos tratados com o BZ apresentaram 39% de cura e os tratados com o POS 35%. Entre os camundongos não tratados não houve cura. O tratamento com POS ($p < 0,007$) ou BZ ($p < 0,004$) curou significativamente mais camundongos, quando comparados ao grupo não tratado.

Entre os camundongos **LT CD4⁺ KO** a taxa de cura foi de 0% para os camundongos não tratados, tratados com o BZ ou tratados com o POS comprovando a essencialidade dos LT CD4⁺ KO para o controle da infecção e para a eficácia terapêutica do BZ e do POS. Não houve diferença significativa entre os tratamentos na cura dos camundongos LT CD4⁺ KO.

Quanto a cura dos camundongos **LT CD8⁺ KO**, houve uma grande diferença entre os tratamentos. Os camundongos tratados com o POS apresentaram 31% de cura, enquanto que os tratados com o BZ apresentaram 66% de cura. Os camundongos não tratados, não foram curados. O tratamento com BZ ($p < 0,000$) e POS ($p < 0,015$) curou um número significativo de camundongos quando comparados ao grupo não tratado. No entanto, não foi determinada diferença estatística significativa entre os tratamentos com POS e BZ.

Nos camundongos **LB KO** a cura observada nos camundongos tratados com o BZ foi de 22%, enquanto que nos camundongos tratados com o POS foi de 71%. Entre os camundongos não tratados, não foi observada cura. O tratamento com POS foi mais eficaz na cura dos camundongos LB KO, quando comparado ao grupo não tratado ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferença entre o tratamento com POS e BZ.

Tabela 3 – Cura parasitológica de camundongos normais e knockouts, infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratados com Posaconazol e Benzonidazol.

Tratamento Camundongos	Não tratados	Benzonidazol	Posaconazol
	% Cura (negativos#/n)	% Cura (negativos#/n)	% Cura (negativos#/n)
C57B1/6	0 (0/22)	86* (25/29)	87* (13/15)
IFN- γ KO	0 (0/15)	0 (0/15)	15 (3/20)
IL-12 KO	0 (0/17)	39* (7/18)	35* (6/17)
LT CD4+ KO	0 (0/15)	0 (0/16)	0 (0/16)
LT CD8+ KO	0 (0/16)	66* (19/29)	31* (5/16)
LB KO	0 (0/12)	22 (2/9)	71* (5/7)

Exame de sangue a fresco e hemocultura negativos

* Diferença estatística significativa entre o tratamento e o grupo não tratado ($p < 0,0167$).

6. DISCUSSÃO

Devido a baixa eficácia e os efeitos colaterais apresentados pelo NFX e BZ usados no tratamento clínico da doença de Chagas, uma das linhas de pesquisa desenvolvidas em nosso laboratório é a quimioterapia experimental, que busca identificar drogas melhores para o tratamento clínico desta enfermidade. No geral, a baixa eficiência do BZ e NFX tem sido relacionada, em diversos estudos, com as características genéticas do parasito, como suscetibilidade e resistência natural aos nitroderivados. Porém, pouco tem se estudado a respeito da contribuição do hospedeiro, buscando conhecimento de como o seu sistema imune influencia na cura parasitológica ou na falha terapêutica.

Com o aumento da incidência de doenças que debilitam o sistema imunológico (HIV, por exemplo) ou que necessitam da utilização de medicamentos imunossupressores (como transplante de órgãos e doenças auto-imunes), observa-se a reativação da infecção chagásica crônica. Muitas vezes essas reativações tornam-se graves, com o desenvolvimento de formas raras da doença, como a meningoencefalite, que pode culminar com a morte do paciente. Outro fator preocupante, é o fato do BZ ser menos eficiente no tratamento de hospedeiros imunossuprimidos (Toledo et al. 1991; Rassi et al. 1999).

O BZ tem sua eficácia aumentada quando é utilizado uma imunoterapia adjuvante com rIL-12 para o tratamento da doença de Chagas (Michaylowsky et al. 1998). Ele é também mais eficiente em pacientes que conseguem desenvolver uma resposta Th1, com produção de altos níveis de IFN- γ (Bahia-Oliveira et al. 2000). Nossa proposta, que é uma extensão daquela de Romanha e cols. (2002), é a de que a eficácia da quimioterapia pelo BZ seja um resultado combinado da ação da droga e da efetiva resposta imune do hospedeiro contra o parasito.

Com isso, torna-se também necessário o desenvolvimento de drogas que atuem independentemente do sistema imunológico do hospedeiro para o tratamento de indivíduos imunossuprimidos e imunodeficientes. A interação entre o sistema imune do hospedeiro e a quimioterapia tem sido descrito para algumas parasitoses, inclusive para a doença de Chagas (Targett, 1985; Berger & Fairlamb, 1992). Como o POS foi mais eficaz que o BZ em camundongos infectados com o *T. cruzi* nas fases aguda e crônica da doença, ele torna-se um candidato a ser testado clinicamente (Urbina & Docampo, 2003). A possibilidade do POS, ser uma alternativa para cura de indivíduos imunossuprimidos foi demonstrado experimentalmente por Molina e cols. (2000b). Os autores observaram que camundongos imunossuprimidos infectados com diferentes cepas (CL e Colombiana) de *T. cruzi* e tratados com POS, apresentaram uma eficácia terapêutica quase tão boa quanto aquela dos camundongos imunocompetentes.

Por esse motivo, este trabalho teve como objetivo avaliar a importância dos componentes do sistema imune, durante o tratamento experimental com o POS e compará-lo ao BZ. Com isso, buscamos uma maior compreensão da interação destas drogas com o organismo do hospedeiro, do ponto de vista imunológico.

Os camundongos que apresentam genes knockouts, surgem como um importante modelo experimental para o estudo do efeito do sistema imunológico, durante experimentos de quimioterapia. Eles apresentam deficiências imunológicas geradas por uma deleção genética, que é mais eficiente do que o emprego de anticorpos neutralizantes de citocinas e células, uma vez que nesta última técnica a situação pode ser revertida. Para este estudo, selecionamos camundongos deficientes nos componentes imunológicos que tem sido relatados como os mais importantes para a resistência à infecção experimental e clínica, nas fases aguda e crônica da doença. São eles as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-12 e as células LT CD4⁺, LT CD8⁺ e LB. Em contraponto, utilizamos para comparação os camundongos C57Bl/6, que correspondem ao background genético dos camundongos knockouts. Eles têm o sistema imunológico íntegro e são considerados modelo de resistência à infecção pela cepa Y.

Como critério de cura parasitológica, utilizamos a parasitemia e a hemocultura, que são ideais para o diagnóstico da doença experimental em camundongos (Brenner, 1962). Em nosso estudo a parasitemia foi patente nos camundongos normais e knockouts não tratados. Nos camundongos knockouts tratados a parasitemia foi negativa durante o tratamento, tornando-se positiva em alguns casos após o término do tratamento. A hemocultura determinou a falha terapêutica em 26,2% dos camundongos positivos. Esses camundongos não apresentavam parasitemia detectável ao microscópio.

A cepa Y de *T. cruzi* é uma cepa altamente virulenta para camundongos (Silva & Nusseiwieg, 1953). Ela é parcialmente resistente ao BZ, reticulotrópica, mas em camundongos com alguma deficiência imunológica pode infectar diversos órgãos (Costa et al. 2002). Camargos et al. (2000) demonstraram que ratos infectados com um alto inóculo da cepa Y apresentaram 100% de mortalidade e severa ou completa deservação do coração. Já entre os ratos infectados com baixo inóculo, houve uma miocardite aguda no princípio da infecção, que foi controlada posteriormente.

Em nosso sistema experimental, a cepa Y apresentou os mesmos resultados de Romanha e cols. (2002) em camundongos C57Bl/6 não tratados. Apresentou um pico de parasitemia no 9 dpi e parasitemia com cerca de 22×10^3 tripomastigotas/5 μ l de sangue para um inóculo de 5×10^3 tripomastigotas/camundongo (Romanha et al. 2002), declinando a

parasitemia a níveis muito baixos ou próximos de zero a partir do 12 dpi. A mortalidade foi de 90%, indicando que apesar do fenótipo de resistência dos camundongos C57Bl/6, poucos animais conseguem chegar a fase crônica, com esse inóculo, quando não tratados. Entre os camundongos C57Bl/6 infectados tratados, não observamos parasitemia (após o início do tratamento), nem reativação da infecção ou mortalidade, salientando que os fármacos POS e BZ, têm uma boa atividade terapêutica no controle da parasitemia e manutenção da sobrevivência. Além disso, possibilitaram a cura de 87% dos camundongos C57Bl/6 tratados com o POS e 86% dos camundongos tratados com o BZ. Essa taxa de cura, condiz com a característica da cepa Y, que é parcialmente resistente ao BZ. Também devemos acrescentar o fato de termos utilizado camundongos machos, que são um pouco mais suscetíveis a infecção com essa cepa, do que as fêmeas (Brenner, 1968).

Nos camundongos knockouts, entre os componentes imunológicos testados, verificamos que os **LT CD4⁺**, foram de fundamental importância para o tratamento dos camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados tanto com o POS quanto com o BZ. Os camundongos apresentaram 100% de reativação da parasitemia, poucos dias após o término do tratamento, com uma mortalidade de 94% dos camundongos. Esses achados são condizentes com os estudos em animais com o sistema imune íntegro infectados com *T. cruzi*. Os resultados indicam que os **LT CD4⁺** estão diretamente envolvidos no controle da infecção, através destruição das células infectadas, devido a ativação dos **LT CD8⁺**, estímulo da produção de anticorpos e liberação de citocinas que ativam a fagocitose (revisado por Brenner & Gazzinelli, 1997, Reis & Lopes, 2000). Assim como descrito por Rottenberg e cols. (1993, 1995), observamos em nosso experimento que a falta das células T **CD4⁺** torna o hospedeiro mais suscetível à infecção (com as cepas Tulahuén, RA e CA-I) com parasitemia mais elevada que o grupo controle C57Bl/6.

Apesar de não ter sido observado pico parasitêmico elevado entre os camundongos **LT CD4⁺KO** tratados com POS e BZ, após a reagudização da infecção, houve uma mortalidade de 94% em ambos os grupos. A alta mortalidade dos camundongos deficientes em linfócitos T (**CD4⁺** ou **CD8⁺**) deve-se à deficiência na resposta inflamatória do hospedeiro, que implicaria no aumento do parasitismo tecidual. A infecção aguda impossibilitaria o hospedeiro de montar uma resposta compensatória eficiente (Tarleton, 1995). De acordo com a ausência da reação inflamatória, descrita para camundongos deficientes em **LT CD4⁺** e **LT CD8⁺**, Brenner & Gazzinelli (1997) sugeriram que os **LT CD4⁺** são requeridos para iniciar a reação inflamatória, que terá como principal efetor os **LT CD8⁺**.

Costa et al. (2002) demonstraram que camundongos atímicos, infectados com a cepa Y, não apresentaram infiltrado inflamatório, o que ocorreu em abundância nos camundongos normais (C57Bl/6 e BALB/c). Os autores observaram um intenso parasitismo em quase todos os órgãos estudados à exceção do cérebro. Os órgãos mais parasitados foram o pâncreas e o coração. Quando analisamos a curva de sobrevivência dos camundongos LT CD4⁺ KO tratados, vemos que a sobrevivência dos tratados com BZ foi prolongada em 5 dias comparada aos tratados com POS.

Tanto o BZ quanto o POS falharam em curar os camundongos LT CD4⁺ KO infectados com *T. cruzi*. Os LT CD4⁺ são importantes para o mecanismo de defesa adquirido contra a infecção pelo *T. cruzi*. A dependência dos LT CD4⁺ apresentada pelo BZ e POS é muito preocupante nos casos de pacientes chagásicos que apresentam co-infecção pelo HIV. Nossos dados mostram que estas células são essenciais para atividade do POS e BZ e sugerem que se essas drogas forem utilizadas para o tratamento da reativação da doença de Chagas em pacientes imunodeficientes e/ou imunossuprimidos, as chances de cura serão mínimas.

Os camundongos **LT CD8⁺ KO**, foram mais resistentes a infecção do que os camundongos LT CD4⁺ KO. Os camundongos LT CD8⁺ KO não tratados controlaram melhor a parasitemia, apresentando um pico parasitemico próximo dos camundongos C57Bl/6. Porém a mortalidade foi elevada (100%) aos 17 dpi, o que é muito semelhante aos camundongos LT CD4⁺ KO. Tarleton e cols. (1992) demonstraram que camundongos deficientes na proteína β -2 microglobulina (LT CD8⁺ KO) apresentam alta parasitemia e morrem precocemente, devido a resposta inflamatória ausente, quando comparados aos camundongos normais. Os autores sugerem que há um aumento na população de LT CD4⁺, indicado pelo aumento nas linfocinas IL-2 e IFN- γ , mas que não seria suficiente para suprir a deficiência dos LT CD8⁺. Adicionado à deficiência na resposta dos LT CD8⁺, os camundongos que falham ao expressar o MHC I, apresentam uma alteração na atividade citotóxica apresentada pelas células NK, que são ativadas através de alterações neste complexo.

Os camundongos LT CD8⁺ KO tratados com POS e BZ, apresentaram baixa taxa de reativação e mortalidade, quando comparamos com os camundongos LT CD4⁺ KO. O melhor controle da parasitemia apresentado pelos camundongos deficientes em linfócitos LT CD4⁺ e CD8⁺, quando comparado aos camundongos deficientes em IFN- γ , pode estar relacionado ao mecanismo de imunidade inata que não é afetado pela ausência desses linfócitos. Contrariamente, a imunidade adquirida é severamente alterada. Tarleton e cols. (1996),

descreveram que à medida que os camundongos deficientes no MHC I, se tornam crônicos, eles são capazes de formar uma resposta inflamatória extensa e severa, o que não é observado nos camundongos deficientes no MHC II.

Os camundongos LT CD8⁺ KO tratados com BZ apresentaram uma taxa de cura (66%) consideravelmente mais elevada do que os tratados com POS (31%). Podemos inferir, que os LT CD8⁺ são mais requeridos para o tratamento com POS do que com o BZ. Isso sugere, mais uma vez, que as drogas atuam através de mecanismos distintos e que nesse caso, o BZ foi mais efetivo do que o POS.

Os LT CD8⁺ são importantes na infecção por produzirem IFN- γ , desempenhar a função citolítica contra formas intracelulares do parasito e participar da reação inflamatória em tecidos infectados. Olivieri et al. (2002) relataram um efeito catalisador do tratamento com BZ sobre a expansão dos LT CD8⁺, gerando um fenótipo efetor/memória o que proporcionaria além da atividade tripanosomicida, uma resistência completa ao desafio de reinfeção. Em nosso experimento observamos que os camundongos LT CD8⁺ KO tratados com BZ respondem melhor do que os tratados com POS. Eles também foram mais resistentes à infecção do que os outros camundongos knockouts tratados com BZ. Isto sugere uma maior independência dos LT CD8⁺ na eficácia do BZ.

Rottenberg e cols. (1995) observaram que camundongos deficientes em LT CD8⁺, infectados com baixo inóculo da cepa Tulahuen de *T. cruzi*, tornam-se resistentes à infecção. Isso sugere que o controle do nível do parasitismo é feito através de mecanismos independentes destes linfócitos e relacionados ao conjunto cepa-hospedeiro. Tarleton (1990) observou que camundongos cronicamente infectados, que sobreviveram à infecção aguda com a cepa Brazil, não foram afetados pela depleção de LT CD8⁺. Eles não apresentaram recrudescência da parasitemia ou aumento da suscetibilidade na reinfeção. Tais achados sugerem que os LT CD8⁺ contribuem na fase aguda da infecção mas não na fase crônica e que os camundongos LT CD8⁺ KO podem resistir melhor à infecção, porque apresentam uma atividade de LT CD4⁺ normal.

Os **linfócitos B**, são considerados importantes ferramentas de defesa do hospedeiro para o controle da infecção, pela característica ativação policlonal e hipergamaglobulinemia, que ocorrem na fase aguda, auxiliando na remoção dos parasitos presentes na circulação sanguínea. Os camundongos LB KO, exibem uma mutação que interfere na resposta humoral, ou seja, interfere na produção de imunoglobulinas. Entretanto, apresentam resposta celular normal.

Esse grupo apresentou padrões distintos de resposta ao tratamento com POS e BZ. Entre os camundongos não tratados, observamos uma curva de parasitemia inferior a apresentada pelos camundongos C57Bl/6. A mortalidade foi de 100% aos 17 dpi.

Os camundongos LB KO tratados com BZ apresentaram uma reativação da parasitemia 22 dias após o término do tratamento. Até o término de nossas observações, aos 60 dpi, 55% dos camundongos haviam reativado à infecção, com mortalidade de 33%. Em contraponto, os camundongos tratados com POS não apresentaram reagudização da infecção ou mortalidade, indicando uma menor influência dos LB na eficácia do POS.

O POS foi mais eficiente na cura dos camundongos LB KO infectados (71%) do que o BZ (22%). Essa maior dependência dos camundongos LB KO tratados com BZ do que com o POS, pode estar relacionada ao mecanismo de ação do BZ, que poderia agir estimulando a exposição de sítios específicos do parasito. Esses sítios induziriam uma resposta imune mediada pelas células B. Essa hipótese foi sugerida por Lages-Silva e cols. (1990), que observaram um aumento da fagocitose por macrófagos murinos após o tratamento com BZ.

Tem sido descrito que os anticorpos específicos de camundongos na fase aguda da doença demonstram uma reatividade reduzida com antígenos de *T. cruzi* "in vitro". Isso pode indicar que estaria sendo desencadeada uma resposta imune não específica, com altos títulos de imunoglobulinas (IgM, IgG1 e IgG3) (revisto por Brener & Gazzinelli, 1997). Zuniga e cols. (2000) observaram que células B de camundongos na fase aguda da infecção, em cultura, exibem um aumento na apoptose sem a necessidade de um estímulo exógeno.

Todos esses achados, sugerem que na fase aguda da doença a resposta gerada a partir dos LB é de caráter inespecífico. Ela é imunossuprimida pelo mecanismo de apoptose e pode levar o hospedeiro a anergia, através desta via. Com isso, na fase aguda da doença, os LB poderiam ter apenas um papel secundário. Miller et al. (1997) verificaram que os LB não são necessários para proteção induzida pela imunização com proteínas paraflagelares de *T. cruzi*. Todos esses fatores poderiam explicar a boa atividade do POS na ausência destas células.

Por outro lado, tem sido ressaltada a importância dos LB na resistência à infecção na fase crônica. Os LB são as células responsáveis pela produção dos anticorpos líticos protetores, que fixam complemento e pela produção dos anticorpos da sorologia convencional, que estão envolvidos na opsonização ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Tais atividades são reguladas pelos LT CD4⁺, porém já foi demonstrado a ativação dos LB independentemente dos LT, através de estímulos mitogênicos, como ao GPI, um glicoconjugado de superfície presente no *T. cruzi* (Brener & Gazzinelli, 1997).

Rodriguez et al. (1981) ao utilizarem anticorpos neutralizantes de imunoglobulinas, em ratos infectados com a cepa Tehuatenpec de *T. cruzi*, observaram o aumento na suscetibilidade na fase aguda da infecção, com aumento da mortalidade, sugerindo a colaboração desse grupo de células na defesa do hospedeiro através da associação com o complemento e outros componentes do sistema imune.

Morgan et al. (1996) relacionaram os LB (mais especificamente as imunoglobulinas) ao possível mecanismo auto-imune da doença. Os autores observaram altos níveis de IgG1 e IgG3 no soro de pacientes com a forma sintomática da doença de Chagas, comparados com os indivíduos não infectados. Observou-se também, um padrão característico de imunoglobulinas de acordo com a forma clínica: aumento de IgM (que está associado a doenças autoimunes) na forma cardíaca; IgA na forma digestiva e IgG2 na forma mista.

Entre as citocinas, o **IFN- γ** mostrou-se de grande importância para resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* (Reed, 1988; Cardillo et al. 1996). Isto se deve à capacidade de estimular a síntese de óxido nítrico pelos macrófagos para combater a replicação intracelular do parasito. Torrico et al. (1991) relataram que a utilização de anticorpos neutralizantes de IFN- γ , causam aumento da parasitemia, da mortalidade e do parasitismo tecidual. Michailowsky et al. (2001) demonstraram que camundongos IFN- γ KO, infectados com a cepa Colombiana, têm o sistema nervoso central e o coração como os principais locais acometidos pela doença, explicitando a importância desta citocina para o controle da infecção letal.

Nossos resultados mostram que os camundongos IFN- γ KO não tratados foram altamente suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*. Eles apresentam parasitemia ascendente e mais intensa que os demais camundongos knockouts. Todos os camundongos sucumbiram à infecção já aos 15 dpi, sugerindo a essencialidade do IFN- γ nos primeiros dias da infecção. Isto havia sido evidenciado, através da depleção de células NK, que tornam os camundongos altamente suscetíveis, devido a produção reduzida de IFN- γ (revisado por Abrahamsohn, 1998). Essa requisição de IFN- γ no princípio da infecção, pode estar relacionada primeiramente ao mecanismo de defesa inato, e posteriormente com a diferenciação da resposta adquirida para Th1.

A eficácia do POS foi menos influenciada pelo IFN- γ do que a do BZ. O BZ foi totalmente dependente do IFN- γ enquanto que o POS foi parcialmente dependente. Apesar de termos observado a reagudização da infecção em ambos os grupos, no BZ houve reativação maciça (em todos os camundongos), ao passo que no grupo POS, 30% dos camundongos

permaneceram negativos. Os camundongos IFN- γ KO tratados com BZ apresentaram pico parasitêmico elevado durante a reagudização (dia 35 dpi) diferente dos tratados com POS ($p < 0,0007$), que apresentaram uma discreta parasitemia, sem pico. Nossos resultados confirmam os de Romanha e cols. (2002) que demonstraram a essencialidade do IFN- γ para a atividade do BZ. Nossos dados, e os de Romanha e cols. (2002), também estão de acordo com os de Bahia-Oliveira e cols. (1998 e 2000) que associaram os altos níveis séricos de IFN- γ com a cura dos pacientes chagásicos tratados com nitroderivados.

Com relação a mortalidade, outro resultado interessante foi observado nos camundongos IFN- γ KO tratados com o POS. Os animais tratados com POS tiveram uma mortalidade de 55% aos 60 dpi e os tratados com BZ morreram todos aos 48 dpi. Esse aumento na sobrevivência promovido pelo POS foi significativamente superior ao BZ. O POS curou 15% dos camundongos, enquanto que o BZ não curou nenhum.

Nossos achados, ressaltam a melhor atividade do POS no tratamento dos camundongos IFN- γ KO infectados. Os animais tratados com POS foram capazes de controlar melhor a parasitemia, tiveram a sobrevivência aumentada e 15% deles foram curados. Esses resultados reforçam a suposição de diferentes mecanismos de atuação e interação do POS e do BZ com o sistema imune, resultando na eficácia terapêutica.

A citocina **IL-12**, assim como o IFN- γ , tem relação comprovada com a resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*. Ela é uma potente indutora de IFN- γ , ativadora de macrófagos e atua na diferenciação da resposta para Th1. Aliberti e cols. (1996) mostraram que a utilização de anticorpo monoclonal neutralizante de IL-12, acarretou na perda ou inibição (dose-dependente) do IFN- γ produzido por macrófagos murinos cultivados, estimulados por tripomastigotas vivos de *T. cruzi*. Os autores também observaram um aumento na suscetibilidade *in vivo*, com parasitemia e mortalidade aumentadas. Graefe e cols. (2003) constataram o aumento da parasitemia e do parasitismo tecidual em camundongos IL-12p40 KO infectados com a cepa Tulahuen.

Silva et al. (1998) sugerem que camundongos IL-12 KO têm o mecanismo inato de proteção prejudicado. Em nosso experimento, também observamos maior suscetibilidade entre os camundongos IL-12 KO não tratados em relação aos camundongos C57Bl/6, com maior parasitemia e mortalidade. Contudo, esses animais foram mais resistentes à infecção que os camundongos IFN- γ KO. Entre os camundongos tratados com POS e BZ houve uma reativação (com poucos parasitos aparentes), mortalidade e cura parasitológica em níveis muito similares, indicando que ambas as drogas dependem parcialmente da IL-12. Esta

cooperação entre o BZ e a IL-12 já havia sido descrita anteriormente (Michailowsky et al. 1998; Romanha et al. 2002).

Silva et al. (2003) demonstraram a suscetibilidade de camundongos IL-12p40 KO infectados com a cepa Y. Os autores observaram uma redução considerável dos níveis de IFN- γ no sobrenadante da cultura de células esplênicas desses animais, quando comparados aos controles selvagens (cerca de 90% menor). Houve também redução nos níveis de óxido nítrico, que no entanto, ficou um pouco mais elevado que os níveis de IFN- γ . Os autores sugerem que esse suprimento de óxido nítrico, apesar do baixo nível de IFN- γ , deve-se a estímulos oriundos do TNF- α . Observou-se um parasitismo tecidual intenso (principalmente nas fibras cardíacas), sem a presença de infiltrado inflamatório. Além disso, os autores demonstraram que a ausência de IL-12 não desviou a resposta para Th2, pois os níveis de IL-4 permaneceram baixos. Como não houve diferença entre os níveis de anticorpos entre KO e selvagens, e a proliferação de linfócitos foi também semelhante entre os dois modelos, pode-se inferir que os linfócitos T CD4⁺ foram ativados. Nesse mesmo trabalho, foi relatado a maior suscetibilidade dos camundongos machos em relação às fêmeas. Esses dados poderiam explicar a diferença de cura que obtivemos para camundongos IL-12 KO tratados com BZ (38%), comparando com os de Romanha et al. (2002) (58%), que utilizaram somente fêmeas.

Torna-se evidente que células e citocinas têm um papel importante na resposta imunológica e na eficácia do POS e BZ. Entretanto, ainda não temos certeza de que forma e em que medida eles são cruciais para a atividade tripanosomicida do POS e BZ. Os LT CD4⁺ e o IFN- γ foram os elementos do sistema imune que mais influenciaram na eficácia de ambas as drogas. Acreditamos que no caso dos LT CD4⁺ essa influência deva-se ao mecanismo ativador/efetor desempenhado por esta célula na resposta Th1, a principal forma de combate aos parasitos intracelulares. Já a citocina IFN- γ , essencial para a atividade do BZ, está envolvida na eliminação do *T. cruzi*, através da estimulação da secreção de óxido nítrico, que é tóxico ao parasito, e na diferenciação da resposta do Th1 através da inibição da expansão e síntese de citocinas do Th2 (Brener & Gazzinelli, 1997). Apesar da síntese de IFN- γ ser induzida pela citocina pró-inflamatória IL-12, ela só foi envolvida parcialmente na atividade do POS e do BZ. Os LT CD8⁺ foram mais importantes para os camundongos tratados com POS e os LB para os camundongos tratados com BZ. O POS e o BZ tiveram eficácias um tanto diferentes nos camundongos knockouts, sugerindo que tenham mecanismos de ação e interação com o sistema imune distintos. Porém, o efeito cooperativo do sistema imune e as drogas permanece desconhecido e necessita de futuras investigações para sua elucidação, principalmente por estar relacionado a um parasito tão complexo como o *T. cruzi*.

Sugerimos aqui, que o tratamento de indivíduos chagásicos imunossuprimidos ou imunodeficientes com POS e BZ pode não ser efetivo. Por outro lado, não excluiremos a hipótese de que essa interação possa ser um fenômeno cepa-específica. Molina e cols. (2000b) observaram que camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados com a cepa Y, apresentam uma redução na eficácia do POS. No entanto, nos camundongos infectados com as cepas CL e Colombiana, o POS apresentou uma atividade semelhante aos camundongos normais, levando à cura um grande número de animais. Essa é uma questão muito relevante que pretendemos estudar futuramente.

Os resultados apresentados pelo POS comparados com o BZ em camundongos normais e knockouts, estimulam a continuação de estudos com o POS no sentido de reforçá-lo como candidato no tratamento clínico da doença de Chagas. Além disso, o POS quando utilizado em seres humanos por um tempo bem prolongado, foi bem tolerado e apresentou efeitos colaterais relativamente leves (Schering-Plough, 2004), ao contrário do que se descreve para o BZ que causa efeitos colaterais consideráveis.

7. CONCLUSÕES

Os nossos resultados nos permitem concluir que:

1. Citocinas e linfócitos influenciam o desenvolvimento da fase aguda da doença de Chagas experimental;
2. Camundongos deficientes em IFN- γ apresentam uma parasitemia ascendente que atinge um nível médio 7 vezes maior do que o pico da curva de camundongos normais;
3. Camundongos deficientes em qualquer um dos efetores estudados infectados com o *T. cruzi* morrem precocemente quando comparados aos camundongos normais;
4. Há interação entre as drogas POS e BZ e os componentes do sistema imunológico, o que interfere na eficácia terapêutica, nas diferentes linhagens de camundongos estudados;
5. Os LT CD4⁺ são essenciais para a atividade do POS e do BZ. A ausência desses linfócitos torna os animais altamente suscetíveis, com reagudização intensa da infecção e alta mortalidade após o término do tratamento;
6. Os LT CD8⁺ são especialmente requeridos para a atividade do POS, mas não do BZ que apresentou bons resultados na ausência destas células;
7. Os LB são menos necessários para a atividade do POS do que para a atividade do BZ, o que pode estar relacionado ao mecanismo de ação das drogas;
8. O BZ foi inteiramente dependente do IFN- γ , que foi essencial para sua atividade. O POS foi parcialmente dependente do IFN- γ , reduzindo significativamente a parasitemia, a mortalidade e proporcionando a cura de alguns camundongos;
9. A IL-12 foi requerida parcialmente e de maneira semelhante por ambas as drogas;
10. Considerando a sobrevida e a cura dos camundongos knockouts infectados com o *T. cruzi*, a ordem de influência dos elementos do sistema imune na atividade do POS foi: LT CD4⁺, IFN- γ , LT CD8⁺, IL-12 e LB;
11. Considerando a sobrevida e a cura dos camundongos knockouts infectados pelo *T. cruzi*, a ordem de influência dos elementos do sistema imune na atividade do BZ foi: IFN- γ e LT CD4⁺, LB, IL-12 e LT CD8⁺;
12. Citocinas e linfócitos influenciam diferentemente a atividade do POS e BZ na infecção experimental pelo *T. cruzi*.
13. São necessárias futuras investigações para verificar se os resultados aqui apresentados se aplicam a cepas de *T. cruzi* diferentes e para elucidar os mecanismos de interação entre as drogas e o sistema imunológico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas KA, Litchman AH, Pober JS 2002. *Imunologia celular e molecular*. Livraria e Editora 4ªed. Revinter, Rio de Janeiro, p. 239-258.
- Abrahamsohn IA & Coffman R 1995. Cytokine and Nitric Oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 155: 3955-3963.
- Abrahamsohn IA 1998. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res*. 31: 117-121.
- Abrahamsohn IA, Silva APG, Coffman R 2000. Effects of Interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 68: 1975-1979.
- Adis International 2003. Posaconazole: SCH 56592. *Drugs R D*. 4: 258-263.
- Ali MM, Baraka OZ, Abdelrahman SI, Sulaiman SM, Williams JF, Homeida MM, Mackenzie CD 2003. Immune responses directed against microfilariae correlate with severity of clinical onchodermatitis and treatment history. *J Infect Dis*. 187: 714-717.
- Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RT, Silva JS 2001. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 158: 1433-1440.
- Aliberti JCS, Cardoso MAG, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*. 64: 1961-1967.
- Amato Neto V, Shikanai Yasuda MA, Amato VS 1997. Doença de Chagas aguda. In: Dias JCP & Coura JR. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Ed. FIOCRUZ. p 127-133.
- Andrade ZA & Lopes EA 1963. A histochemical study of experimental Chagas' disease. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 5: 220-224.

- Antunes ACM, Cecchini FML, Bolli FB, Oliveira PP, Rebouças RG, Monte TL, Fricke D 2002. Cerebral trypanosomiasis and AIDS. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 60: 730-737.
- Arantes RM, Marche HH, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA, Silva JS 2004. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am J Pathol.* 164: 1361-1368.
- Babinet C & Cohen-Tannoudji M 2001. Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mamalian biology. *An Acad Bras Cienc.* 73: 365-380.
- Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Cançado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZMP, Moreira MC, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R 2000. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J Infect Dis* 182:634-638.
- Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Rocha MOC, Moreira MCV, Lemos EM, Luz ZMP, Pereira MES, Coffman RL, Dias JCP, Cançado JR, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R 1998. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res.* 31: 127-131.
- Berger BJ & Fairlamb AH 1992. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. *Parasitology.* 105 (Suppl): S71-78.
- Bouhdidi A, Truyens C, Rivera MT, Bazin H, Carlier Y.1994. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotípico hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2 concentrations and highly avid IgG1 antibodies. *Parasite Immunol* v.16, p.69-76.
- Braga MS, Lauria-Pires L, Argañaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira AR 2000. Persistent infections in chronic Chagas' Disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivates. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 42:157-161.

- Brener Z 1961. Atividade terapêutica do 5-nitro-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 3: 43-49.
- Brener Z 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 4: 389-396.
- Brener Z 1984. Recent advances in the chemotherapy of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 79: 149-155.
- Brener Z & Chiari E 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 5: 220-224.
- Brener Z 2000. Terapêutica experimental na doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade Z, Barral - Netto M. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2000, 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 379-388.
- Brener Z, Cançado JR, Galvão LM, Da Luz ZM, Filardi LS, Pereira ME et al. 1993. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 88: 149-153.
- Brener Z. & Chiari E 1967. Suscetibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 9:197-207.
- Brener Z. & Gazzinelli RT 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 114:103-110.
- Brodskyn CI & Barral-Netto M 2000. Resposta imune humana na doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 171-176.
- Buckner FS, Griffin JH, Wilson AJ, Voorhis WCV 2001. Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. *Antim Agents Chemother*. 45: 1210-1215.

- Buckner FS, Joubert BM, Boyle SM, Eastman RT, Verlinde CLMJ, Matsuda SPT 2003. Cloning and analysis of *Trypanosoma cruzi* lanosterol 14 α -demetilase. *Mol Bioch Parasitol.* 132: 75-81.
- Camargo EP 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosome in liquid media. *Rev Inst Med trop São Paulo.* 6: 93-100.
- Camargos ERS, Franco DF, Garcia CMMG, Dutra AP, Teixeira AL, Chiari E, Machado CRS 2000. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. *Am J Trop Med Hyg.* 62: 604-612.
- Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Gazzinelli 2004. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol.* 172: 1711-1718.
- Cançado JR 1999. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94, Suppl. I: 331-335.
- Cançado JR 2002. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas Disease with Benznidazole. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 44: 29-37.
- Cardillo F, Voltarelli J, Reed SG, Silva JS 1996. regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10. Role of NK cells. *Infect Immun.* 64: 128-134.
- Chagas C 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotripanum cruzi*; n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1: 1-59.
- Chiari E & Brener Z 1966. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Inst Med trop São Paulo.* 8: 134 – 138.

- Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 22: 19-23.
- Cordeiro FD, Martins-Filho AO, Rocha MOC, Adad SJ, Corrêa-Oliveira R, Romanha AJ 2001. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas disease. *Clin Diag Lab Immun.* 8: 112 – 118.
- Costa SCG, Calabrese KS, Valle TZ, Lagrange PH 2002. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in tact and athymic mice of suscetible and resistant genotypes. *Histol Histopathol.* 17: 837-844.
- Coura JR & De Castro SL 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97: 3-24.
- Courtney R, Pai S, Laughlin M, Lim J, Batra V 2003. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral Posaconazole administred in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 2788-2795.
- Cruz-Robes D, Reyes PA, Montéon-Padilla VM, Ortiz-Muñiz AR, Vargas-Alarcón G 2004. MHC classI and class II genes in mexican patients with Chagas disease. *Human Immunol.* 65: 60-65.
- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science.* 259: 1739-1745.
- Dantas-Leite L, Urbina J, De Souza W, Vommaro R 2002. Effect of ergosterol biosynthesis inhibitors on *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med trop São Paulo.* 44:110.
- De Castro SL 1993. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 53: 83-98.
- Dias JCP 2000. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 379-388.

- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 603-612.
- Doenhoff MJ, Sabah AAA, Fletcher C, Webbe G, Bain J 1987. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans R Trop Med Hyg.* 81: 947-951.
- DosReis GA 1997. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol today.* 13: 335-342.
- Fernandes AJ, Diotaiuti L, Azevedo BVM, Busek SU, Chiari E 1995. Viabilidade da utilização da hemocultura no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em amostras coletadas em condições de campo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 28: 123.
- Ferreira MS, Lopes ER, Chapadeiro E, Dias JCP, Ostermayer AL 2002. Doença de Chagas. *In: Veronesi R & Focaccia R. Tratado de Infectologia.* Ed. Atheneu. 2ª ed. p 1195-1233.
- Filardi LS & Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R Soc Trop Med Hyg.* 81:755-759.
- Fung-Leung WP, Schilham MW, Rahemtulla A, Kunding TM, Vollenweider M, potter J, van Ewijk W, Mak TW 1991. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell.* 65: 443-449.
- Galhardo MCG, Martins IA, Moreno AH, Xavier SS, Coelho JMC, Vasconcelos ACV, Ribeiro RS 1999. Reativação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em paciente com síndrome da imunodeficiência adquirida. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32: 291-294.
- Galvão LMC, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva AS, Andrade ALSS 2003. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microb.* 41: 5066-5070.

- Gazzinelli RT, Oswald P, Hienv L, Sher A 1992. The microbial activity of IFN-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- β . *Eur J Immunol.* 22: 2501-2506.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71: 1185-1193.
- Gomes ML, Galvão LMC, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E 1999. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 60: 205-210.
- Graefe SEB, Jacobs T, Gaworski I, Klauenberg U, Steeg C, Fleischer B 2003. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. *Microb Infect.* 5: 833-839.
- Guedes PM, Urbina JA, de Lana M, Afonso LC, Velosos VM, Tafuri WL, Machado-Coelho GL, Chiari E, Bahia MT 2004. Activity of the new triazole derivate albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog host. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 4286-4292.
- Hoft DF & Eickhoff CS 2002. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun.* 70: 6715-6725.
- Jackson Laboratory. "Mouse models for immunology and inflammation research". Web site: www.jax.org/jaxmice. Pesquisa realizada em 01/12/2004.
- Krettli AU & Brener Z 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J Immunol.* 128: 2009-2012.
- Krettli AU, Cançado JR, Brener Z 1982. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 76: 334-340.

- Lages-Silva E, Filardi LS, Brener Z 1990. Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* forms by mouse peritoneal macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 85:401-405.
- Lauria-Pires L, Castro CN, Emanuel A, Prata A 1988. Ineficácia do allopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 21: 79.
- Lazardi K, Urbina JA, de Souza 1990. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 34: 2097-2105.
- Lelchuk R, Cardoni RL, Fuks AS 1977a. Cell-mediated immunity in Chagas' disease: Alterations induced by treatment with a trypanocidal drug (nifurtimox). *Clin Exp Immunol* 30: 434-438.
- Lelchuk R, Cardoni RL, Levis S 1977b. Nifurtimox-induced alterations in the cell-mediated immune response to PPD tin guinea-pigs. *Clin Exp Immunol* 30: 469-473
- Leon JS & Engman DM 2003. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of chagas heart disease. *Front Biosci*. 8: E315-322.
- Luquetti AO 1997. Etiological treatment for Chagas disease. *Parasitol today*. 13:127-128.
- Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli A 1994. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 27: 143-148.
- Macêdo VO 1997. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: Dias JCP & Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Ed. FIOCRUZ. p 135-151.
- Madsen L, Labrecque N, Engberg J, Dierich A, Svejgaard A, Benoist C, Mathis D, Fugger L 1999. Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc natl Acad Sci USA*. 96: 10338-10343.

- Magram J, Connaughton SE, Warriar WW, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Tewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK 1996. IL-12 deficient mice are defective in IFN- γ production and type 1 cytokine response. *Immunity*. 4: 471-481.
- Marinho CRF, Lima MRD, Grisoto MG, Alvarez JM 1999. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun*. 67: 308-318.
- Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, Heath HT, Bailey BN, Kendrich H et al. 2001. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *J Med Chem*. 44: 909-916.
- Mayxay M, Chotivanich K, Pukrittayakamee S, Newton P, Looareesuwan S, White NJ 2001. Contribution of humoral immunity to the therapeutic response in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 65: 918-923.
- McCabe R 1988. Failure of Ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. *J Infect Dis*. 158: 1408-1409.
- Meckert PC, Chambo JG, Laguens RP 1988. Differences in resistance to reinfection with low and high inocula of *Trypanosoma cruzi* in chagasic mice treated with nifurtimox and relation to response immune. *Antim Agents Chemother*. 32: 241-245.
- Michailowsky V, Luhrs K, Rocha MO, Fouts D, Gazzinelli RT, Manninig JE 2003. Humoral and cellular immune response to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect Immun*. 71:3165-3171.
- Michailowsky V, Murta SMF, Carvalho-Oliveira L, Pereira MES, Ferreira LRP, Brener Z, Romanha AJ, Gazzinelli RT 1998. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of Benznidazol during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:2549-2556.

- Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT 2001. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 159: 1723-1733.
- Miller MJ, Wrihstman RA, Stryker GA, Manning JE 1997. Protection of mice against *Trypanosoma cruzi* by immunization with paraflagellar rod proteins requires T cell, but not B cell, function. *J Immunol.* 158: 5330-5337.
- Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Império Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I Quantification of both T-and B-cell response. *Scand J Immunol.* 24: 661 – 668.
- Molina J, Brener Z, Romanha AJ, Urbina JA 2000a. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Antim Chemother.* 46: 137-140.
- Molina J; Martins-Filho O; Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA 2000b. Activities of the triazole derivate SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 150-155.
- Moreira AAB, Souza HBWT, Amato Neto V, Matsubara L, Pinto PLS, Tolezano JE et al. 1992. Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *T. cruzi*. *Rev Inst Med trop São Paulo.* 34: 177-180.
- Moretti E, Basso B, Carvetta L, Brigada A, Barbieri G 2002. Patterns of cytokines and soluble cellular receptors in the sera of children with acute Chagas' disease. *Clin Diag Lab.* 9: 1324-1327.
- Morgan J, Dias JCP, Gontijo ED, Bahia-Oliveira L, Correa-Oliveira R, Colley DG, Powell MR 1996. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 55: 355-359.

- Muller U, Kohler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo JP, Brombacher F, Holscher C 2001. IL-12-independent INF-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol.* 167:3346-3353.
- Murta SMF & Romanha AJ 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94:177-180.
- Murta SMF, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biol Parasitol* 93: 203 – 214.
- Murta SMF, Ropert C, Alves RO, Gazzinelli RT, Romanha AJ 1999. In-vivo treatment with benznidazol enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Paras Immunol.* 21: 535-544.
- Nabors GS & Tarleton RL 1991. Differential control of IFN- γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 146: 3591-3598.
- Nomeir AA, Kumari P, Hilbert MJ, Gupta S, Loebenberg D, Cacciapuotti A et al. 2000. Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antim Agents Chemother.* 44: 727-731.
- Oliveira MA, Santiago HC, Lisboa CR, Ceravollo IP, Trinchieri G, Gazzinelli RT, Vieira LQ 2000. *Leishmania* sp.: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. *Exp Parasitol.* 95: 96-105.
- Olivieri BP 2004. Aspectos da resposta imune de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* submetidos a estratégias terapêuticas tripanocidas e imunomodulatórias. Tese de doutorado. Rio de Janeiro: IOC/FIOCRUZ, 193p.
- Olivieri BP, Cotta-de-Almeida V, Araújo-Jorge T 2002. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antim Agents Chemother.* 46: 3790-3796.

- Piaggio E, Roggero E, Pitashny M, Wietzerbin J, Bottasso AO, Revelli SS 2001. Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res* 87: 539-547.
- Portela-Lindoso AAB & Shikanai-Yasuda MA 2003. Doença de Chagas crônica: do xanodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Publica*. 37: 107-115.
- Rassi A, Amato Neto V, Siqueira AF, Doles J, Leite MSB, Silva OQ, Cardoso VM 1997. Influência do corticóide, na doença de Chagas crônica, administrado em virtude de afecções secundárias. *Rev Soc Bras Med Trop*. 30: 93-99.
- Rassi A, Amato Neto V, Siqueira AF, Filho FF, Amato VS, Rassi GG, Junior AR 2002. Tratamento da fase crônica da doença de Chagas com nifurtimox associado a corticóide. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 547-550.
- Rassi A, Amato Neto V, Siqueira AF, Filho FF, Amato VS, Rassi Júnior A 1999. Efeito protetor do benznidazol contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com corticóides em virtude de afecções secundárias. *Rev Soc Bras Med Trop*. 32: 475 – 482.
- Rassi Júnior A, Rassi SG, Rassi A 2001. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*. 76: 86-96.
- Reed SG 1988. In vivo administration of recombinant INF-gamma induces macrophages activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 140: 4342-4347.
- Reis GA & Lopes MF 2000. A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 153-169.
- Revelli S, Page LE, Piaggio E, Wietzerbin J, Botasso O 1999. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* 118:271-277.

- Rey L 2002. *Parasitologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 161-178.
- Rezende JM 1997. O aparelho digestivo na doença de Chagas – Aspectos clínicos. *In*: Dias JCP & Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Ed. FIOCRUZ. p 153-176.
- Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, Jaffe CL 1999. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniosis before, and after, drug treatment. *Vet Immun Immunop*. 71: 69-76.
- Riarte A, Luna C, Sabatiello R, Sinagra A, Schiavelli R, Rissio A, Maiolo E, Garcia MM, Jacob N, Lauricella M, Segura EL, Vazquez M 1999. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. *Clin Infect Dis*. 29:561-567.
- Rocha A, Meneses ACO, Silva AM, Ferreira MS, Nishioka AS, Burgarelli MNK; Almeida E, Turcato Jr G, Metze K, Lopes ER 1994. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Amer Soc Trop Med Hyg*. 50: 261-268.
- Rodriguez AM, Santoro F, Afchain D, Bazin H, Capron A 1981. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient mice. *Infect Immun*. 31: 524-529.
- Roggero E, Perez A, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, Serra E, Revelli S, Bottaso O 2002. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol*. 28: 421-428.
- Romanha AJ, Alves RO, Murta SMF, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT 2002. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: role of endogenous interferon- γ in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis*. 186:823-828.
- Rottenberg ME, Bakhiet M, Olsson T, Kristensson K, Mak T, Wigzell H, Orn A 1993. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*. 61: 5129-5133.

- Rottenberg ME, Riarte A, Sporrang L, Altechah J, Petray P, Ruiz AM, Wigzell, Orn A 1995. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Letters*. 45: 53-60.
- Santos-Neto LL, Polcheira MF, Castro C, Lima RAC, Simaan CK, Corrêa-Lima FA 2003. Alta parasitemia em paciente com lupus eritematoso sistêmico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36: 613-615.
- Schering-Plough Research Corporation 2004. "Schering-Plough News Release". Web site: www.schering-plough.com. Pesquisa realizada em 24/11/2004.
- Silva APG, Jacysyn JF, Abrahamsohn IA 2003. Resistant mice lacking interleukin – 12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. *Immun*. 108: 230-237.
- Silva JS, Aliberti JCS, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Pádua MA 1998. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res*. 31: 111-115.
- Silva LHP & Nussenzweih V 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica*. 20: 191-208.
- Soares MBP, Pontes-de-Carvalho L, Ribeiro-dos-Santos R 2001. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific response meet. *An Acad Bras Cienc*. 73:547-559.
- Taliaferro WH 1948. The role of the spleen and lymphoid macrophage system in the quinine treatment of *Gallinaceum malaria* : I Acquired immunity and phagocytosis. *J Infect Dis*. 83: 164-180.
- Targett GA 1985. Chemotherapy and the immune response in parasitic infections. *Parasitology*. 90: 661-673.
- Tarleton RL 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 144: 717-724.

- Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M 1992. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. 356: 338-340.
- Tarleton RL 1995. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol today*. 11: 7-9.
- Tarleton RL & Zhang L 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol today*. 15: 94-99.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH 1996. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and II- restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol*. 8: 13-22.
- Toledo MJO, Machado GBN, Pereira MES, Brener Z 1991. Results of treatment in mice immunosuppressed inoculated with different *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 86:237.
- Torrice F, Heremans H, Rivera MT, van Marck E, Billiau A, Carlier Y 1991. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol*. 146:3626-3632.
- Uchôa E, Firmo JOA, Dias E, Pereira MS, Gontijo E 2002. Signos, significados e ações associados à doença de Chagas. *Cad Saúde Pública*. 18: 71-79.
- Urbina JA 1997. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*. 114: S91-S99.
- Urbina JA 1999. Parasitological cure of Chagas Disease: It is possible? Is it relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:349-355.
- Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, Hiyoshi H 2004. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 2379-2387.

- Urbina JA, Docampo R 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitol.* 19: 495-500
- Urbina JA, Lazard K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de Souza W 1993. Mevilonin (Lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against of *Trypanosoma cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 580-591.
- Urbina JA, Lira R, Visbal G, Bartroli J 2000. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:2498-2502.
- Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antim Agents Chemother.* 42: 1771-1777.
- Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazard K, Piras MM, Piras R, Perez N, Wincker P, Ryley JF 1996b. Cure of short-and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science.* 273:969-971.
- Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ 2003a. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the agent causative of Chagas disease. *Intern J Antimicrob Agents.* 21: 27-38.
- Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ 2003b. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents.* 21: 39-48.
- Urbina JA, Vivas J, Lazard K, Molina J, Payares G, Piras MM, Piras R 1996^a. Antiproliferative effects of delta 24 (25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. 42: 294-307.

Waghabi MC, Coutinho CM, Soeiro MN, Pereira MC, Feige JJ, Keramidas M, Cosson A, Minoprio P, Van Leuven F, Araújo-Jorge T 2002. Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha (2)-macroglobulin. *Infect Immun.* 70: 5115-5123.

Watkins BM 2003. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development. *Trends in Parasitol.* 19: 477-478

World Health Organization (WHO) 2002. Chagas disease. Tropical disease research *In: Eighteenth programme report of UDNPD/World bank/ WHO Special Programme for Research and training in tropical disease research: progress 1995-1996.* Geneva: WHO, 112-123.

Yeung RSM, Penninger J, Mak TW 1994. T-cell development and function in gene-knockout mice. *Curr Opin Immunol.* 6: 298-307.

Zuniga E, Motran C, Montes CL, Diaz FL, Bocco JL, Gruppi A 2000. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. *Clin Exp Immunol.* 119: 507-515.