

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA - LIMP**

**Avaliação do tratamento com Benznidazol sobre a infecção experimental
de cães por cepas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes a DTU I
(Colombiana) ou DTU II (Y)**

ANA LUIZA CASSIN DUZ

OURO PRETO - 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANA LUIZA CASSIN DUZ

**Avaliação do tratamento com Benznidazol sobre a infecção experimental
de cães por cepas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes a DTU I
(Colombiana) ou DTU II (Y)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Dr^a Cláudia Martins Carneiro

Co-orientadora: Dr^a Paula Melo de Abreu Vieira

OURO PRETO - 2015

C345a

Cassin Duz, Ana Luiza.

Avaliação do tratamento com Benznidazol sobre a infecção experimental de cães por cepas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes a DTU I (Colombiana) ou DTU II (Y) [manuscrito] / Ana Luiza Cassin Duz. - 2015.

108f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.

Coorientadora: Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Area de Concentração: Imunobiologia dos Protozoários.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Benznidazol. 3. Chagas, Doença de - Terapêutica. 4. Histologia. I. Carneiro, Cláudia Martins. II. Vieira, Paula Melo de Abreu. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

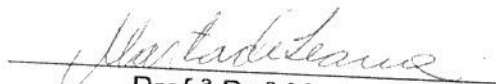
Catálogo: www.sisbin.ufop.br

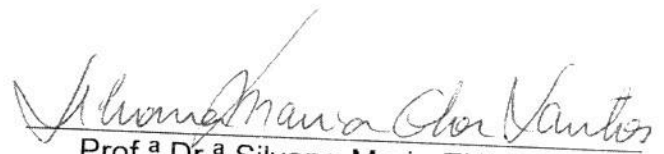
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

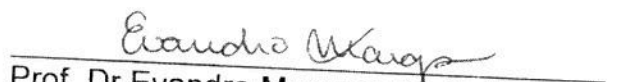
“Avaliação do tratamento com Benznidazol sobre a infecção experimental de cães por cepas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes a DTU I (Colombiana) ou DTU II (Y)”

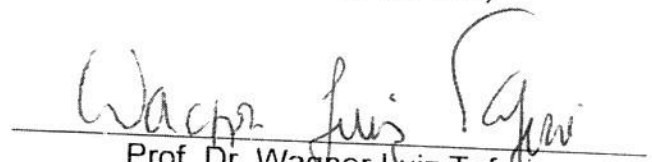
Aos vinte e nove dias do mês de maio de 2015, às 9h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna Ana Luiza Cassin Duz. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovada a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

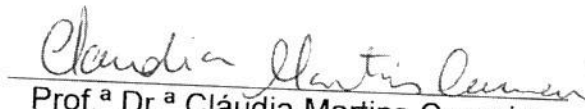
Membros da Banca Examinadora:


Prof.ª Dr.ª Marta de Lana
Examinadora (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Silvana Maria Elói Santos
Examinadora (UFMG)


Prof. Dr. Evandro Marques de M. Machado
Examinador (UFOP)


Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri
Examinador (UFMG)


Prof.ª Dr.ª Cláudia Martins Carneiro
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 29/05/2015

Prof.ª Dr.ª Renata Nascimento de Freitas
Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

 **NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Rua 400 - Bloco 1 - Universidade Federal de Ouro Preto - Campus 38010-640 -
Ouro Preto - Minas Gerais - CEP 35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3539-1080 - E-mail: nupeb@nupeb.ufop.br / www.nuupet.ufop.br

Colaboradores

Dr. Alexandre Barbosa Reis¹

Dr^a. Vanja Maria Veloso²

Dr. Bruno Mendes Roatt¹

Dr. Rodrigo Dian Oliveira Aguiar-Soares¹

Dr. Girley Francisco Machado de Assis³

Me. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso¹

Me. Flávia Carvalho Bittencourt¹

Me. Levi Eduardo Soares Reis¹

1 - Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

2 - Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

3 - Departamento Básico de Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

Suporte Financeiro

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Apoio e Instituições parceiras

Rede Mineira de Bioterismo (FAPEMIG)

Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP/MG

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram e apoiaram, seja com palavras ou suor, esta conquista também é de vocês.

Muito obrigada, são as únicas palavras que posso dizer, tal como minha mãe ensinou a agradecer tudo e todos, sempre!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

O mundo da pesquisa é incerto, nunca temos convicção de quais resultados serão alcançados e em qual momento. De qualquer forma me superei, agradeço por todas as experiências que vivenciei. Agradeço a todos que foram meus braços direitos e esquerdos na execução deste trabalho. Não seria possível chegar a essa conquista sem a ajuda de todos vocês que fizeram mais do que cruzarem meu caminho.

À professora Dr^a Cláudia Martins Carneiro pela compreensão, conhecimentos e orientação segura. Foi muito bom ser sua aluna novamente.

À professora Dr^a Paula Melo de Abreu Vieira por todo o suporte, disponibilidade de ajudar sempre, orientação nos experimentos, e principalmente pela amizade que sempre foi superior às dificuldades do trabalho.

Ao professor Washington Luiz Tafuri (*in memorian*) pelo exemplo a ser seguido.

Ao professor Dr. Alexandre Barbosa Reis pelo agradável convívio e inestimáveis considerações sobre o trabalho.

À professora Dr^a. Vanja Maria Veloso pela disponibilidade em ensinar e paciência.

Ao professor Dr. Girley Francisco Machado de Assis pela colaboração nas reações sorológicas e pelo bom convívio.

A todos dos Laboratórios de Imunopatologia e de Pesquisas Clínicas pela indispensável ajuda nos experimentos, especialmente aos doutores Bruno Mendes Roatt e Rodrigo Dian Oliveira Aguiar Soares, aos mestres Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso, Flávia Oliveira Bitencourt e Levi Eduardo Soares Reis. Foram bons momentos de bancada que deixaram saudades! Agradeço pela amizade e companheirismo da Kátia Fonseca, Nádia Moreira, Juliana Vitorino, Amanda Francisco e Fernando Mathias.

Aos alunos de iniciação científica do LIMP e LPC pela disponibilidade sempre, mesmo aos finais de semana, obrigada de coração Larissa Maris, Dayane Toledo e Flávia Marques.

À Renata Rocha Rezende Oliveira pela valiosa colaboração nos testes bioquímicos e pela disponibilidade em todos os momentos.

À Maria Chaves dos Santos por tudo que me ensinou e pela colaboração no processamento do material histológico.

A todos os funcionários do NUPEB, Centro de Ciência Animal e Canil pela assistência e disponibilidade sempre.

À minha mãe Angela, que sempre esteve ao meu lado apesar da distância física. Aos meus irmãos e sobrinhas por todas as alegrias que me proporcionam.

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* pode ser causada por diferentes cepas, caracterizadas por distintos padrões biológicos e genéticos (DTUs – *Discrete Typing Units*), que podem resultar nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Ademais, estas diferenças biológicas do parasito aparentemente têm relação com os distintos padrões de resistência frente ao tratamento com Benznidazol, único fármaco disponível para o tratamento etiológico desta enfermidade no Brasil. Em estudos clínicos randomizados, o tratamento com o Benznidazol apresentou maior índice de cura na fase aguda, favoreceu a redução da carga parasitária e sororeversão nos pacientes tratados e curados. Porém ainda há questionamentos sobre as alterações imunopatológicas decorrentes deste tratamento. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações imunopatológicas na infecção experimental canina com cepas do *T. cruzi* que apresentam diferentes graus de susceptibilidade ao tratamento com Benznidazol e que pertencem a distintas DTUs. Para isto, cães sem raça definida foram infectados experimentalmente com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y (TcII) ou Colombiana (TcI) do *T. cruzi*, via intraperitoneal. Parte destes grupos foram submetidos ao protocolo terapêutico semelhante ao preconizado para pacientes, ao ser detectada parasitemia patente, na dose de 3,5 mg/kg de Benznidazol, administrado em duas doses diárias, via oral, durante 45 dias. Os resultados mostraram que a infecção com a cepa Y aumentou os níveis séricos de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, favoreceu a leucopenia, trombopenia, inversão da proporção de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ e alteração do número de monócitos. Além disso, a infecção com a cepa Y estimulou a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e da citocina IL-4 por células T CD8⁺. Na fase crônica foram observadas inflamação e fibrose cardíaca significativas. Na infecção com a cepa Colombiana, durante a fase aguda, ocorreu aumento nos níveis séricos de alanina aminotransferase e ureia, do número de eritrócito, hematócrito e hemoglobina, bem como, aumento significativo da produção de IL-4 por linfócitos T CD8⁺ isolados do sangue periférico. Na fase crônica foi observado aumento significativo do número de células inflamatórias no átrio direito. Ao avaliar o tratamento com Benznidazol, no grupo infectado com a cepa Y e tratado, houve aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase e ureia, da quantidade de hemoglobina, também foi observada inversão da proporção de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ e estímulo a produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺, além disso, o tratamento favoreceu linfopenia, neutropenia e monocitopenia. Na infecção com a cepa Colombiana o tratamento com Benznidazol acarretou, na fase crônica, aumento do nível de alanina aminotransferase e da quantidade de hemoglobina, além de diminuir o número de monócitos no sangue periférico. Ademais, em ambos os grupos infectados e tratados não foi observada diferença significativa no número de células inflamatórias e na área de colágeno no átrio direito em comparação ao grupo não infectado e tratado, na fase crônica. Desta forma, o tratamento com Benznidazol, apesar de ter alterado algumas populações celulares no sangue periférico, teve participação importante ao favorecer a sororeversão, bem como, diminuir significativamente a inflamação e a fibrose cardíaca observadas frente a infecção. Este trabalho concluiu que a cepa Y, macrofagotrópica e sensível a LMCo, aparentemente

seria reconhecida primeiramente pelo sistema imune, enquanto a cepa Colombiana, miotrópica e resistente a LMCo, escaparia da resposta imune na fase aguda da doença de Chagas, o que teria impacto na progressão da forma cardíaca na fase crônica. Além disto, o tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção experimental teve papel expressivo ao minimizar as lesões cardíacas na fase crônica.

Trypanosoma cruzi infection may be caused by different strains of distinct discrete typing units (DTUs), characterized by different biological and genetic patterns, which result in variable clinical forms of chronic Chagas disease. These biological differences of the parasite are apparently related to the distinct patterns of resistance to the Benznidazole treatment, the only drug available for Chagas disease treatment in Brazil. In randomized clinical trials, Benznidazole treatment presents a higher cure rate in the acute phase, with reduction of the parasite load and negative seroreversion of treated and cured patients, but there are still questions about the immunopathological changes resulting from this treatment. This study evaluates the immune response and cardiac lesions in dogs experimentally infected with different strains of distinct *T. cruzi* DTUs that showing different degrees of susceptibility to treatment with Benznidazole, namely Y and Colombian from TcI and TcII DTU, respectively. For this, mongrel dogs were experimentally infected with 2000 Y or Colombian *T. cruzi* trypomastigotes and undergoing Benznidazole treatment at oral dose of 7 mg/kg, divided in two by day, for 45 days. The infection with the Y strain led to increased levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, leucopenia, thrombopenia, inversion of the ratio of CD4⁺/CD8⁺ T-lymphocytes and alterations in monocyte number. In addition, Y strain infection stimulated the production of IFN- γ by CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes and IL-4 by CD8⁺ T-cells. In the chronic phase, significant heart inflammation and fibrosis were observed. During infection with the Colombian strain, increased levels of alanine aminotransferase, erythrocytes, haematocrit and haemoglobin were observed. In addition, CD8⁺ T-lymphocytes isolated from the peripheral blood produced higher levels of IL-4. The latter results suggests that during the acute phase, infection with the Colombian strain may remain unnoticed by circulating mononuclear cells. In the chronic phase, a significant increase in the number of inflammatory cells was detected in the right atrium, demonstrating that strains of different DTUs interact differently with the host. When was evaluated the Benznidazole treatment of dogs infected with the Y strain it was observed increase levels of alanine aminotransferase, urea and hemoglobin, lymphopenia, neutropenia, monocytopenia and inversion of the ratio of CD4⁺/CD8⁺ T-lymphocytes. The infection with the Y strain and Benznidazole treatment stimulated the production of IFN- γ and IL-4 by CD4⁺ T-lymphocytes. In dogs infected with the Colombian strain and Benznidazole treatment, it was observed increase of alanine aminotransferase and hemoglobin, and decrease the monocyte number. So the treatment in Colombian infection controlled the increased amount of red blood cells. Moreover, in chronic phase, dogs with Y and with Colombian strains infection and Benznidazole treatment do not showed significant difference in the number of inflammatory cells and collagen area in the right atrium compared to the not infected and treated group. Therefore, the Benznidazole treatment despite having changed some cell populations in peripheral blood, had significant participation for decrease the IgG level and the inflammation and cardiac fibrosis. So, in this work, the Y strain was apparently first recognized by the immune system, while the Colombian strain escaped from the immune response in the acute phase of Chagas disease, which would impact the progression

of cardiomyopathy in the chronic phase. Moreover, the Benznidazole treatment in acute experimental infection controlled the cardiac damage in chronic phase.

Ag	Antígeno
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Teste de análise de variância
APC	<i>Allophycocyanin</i> (aloficocianina)
AST	Aspartato aminotransferase
BENEFIT	<i>Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis</i>
BFA	Brefeldina-A
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (Estufa de demanda bioquímica de oxigênio)
BSA	Albumina sérica bovina
Bz	Benznidazol
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CK-NAC	Creatina quinase
CO ₂	Monóxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
d.p.i.	Dia pós-infecção
DTU	<i>Discrete Typing Units</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPI	Formas epimastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i>
Fe ³⁺	Íon férrico
FITC	<i>Fluorescein</i> (fluoresceína)
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Tamanho)
g	Grama
Gama-GT	Gama-Glutamil transferase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H&E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

HCl	Ácido clorídrico
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
l	Litro
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LMCo	Lise mediada pelo complemento
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
ml	Mililitro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
Nf	Nifurtimox
NK	Células natural killer
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Hidróxido
OPD	Orto-fenileno-diamino
pb	Pares de base
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (tampão fosfato salina)
PBS-P	Tampão de lavagem
PBS-W	Tampão de lavagem
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	<i>Phycoerytrin</i> (Ficoeritrina)
rpm	Rotações por minuto
SD	<i>Standard deviation</i> (desvio padrão)
seg	Segundos

SFB	Soro fetal bovino
SRD	Sem raça definida
SSC	<i>Side Scatter</i> (Complexidade/Granulosidade)
Th1	Células T CD4 ⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Células T CD4 ⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Receptor do tipo Toll)
TNF	<i>Tumor necrosis factors</i> (Fator de necrose tumoral)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
µg	Micrograma
µl	Microlitro

1.0. Introdução.....	xviii
2.0. Revisão Bibliográfica.....	iv
2.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	5
2.2. Variabilidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	6
2.3. Cardiomiopatia chagásica crônica	8
2.4. Tratamento etiológico da Doença de Chagas.....	10
2.5. O tratamento etiológico com Benznidazol.....	12
2.6. Modelos experimentais	15
3.0. Objetivos.....	17
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4.0. Material e Métodos.....	19
4.1. Declaração de Ética	20
4.2. Experimentação animal e protocolo de infecção	20
4.3. Esquema do tratamento com Benznidazol	20
4.4. Coleta de sangue	21
4.5. Análises bioquímicas.....	23
4.6. Análises hematológicas.....	23
4.7. Imunofenotipagem do sangue periférico.....	23
4.8. Avaliação da produção de citocinas citoplasmáticas após estimulação celular in vitro induzida por antígenos solúveis da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i>	25
4.8.1. Preparo do extrato antigênico	25
4.8.1.1. Cultura das formas epimastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
4.8.1.2. Extrato antigênico.....	25
4.8.2. Cultura de células mononucleares do sangue periférico	25
4.9. Avaliação histológica.....	28
4.9.1. Colorações	28
4.9.2. Análise morfométrica.....	28
4.9.2.1. Análise da infiltrado inflamatório cardíaco	29
4.9.2.2. Análise da área de colágeno cardíaca.....	29

4.10. Análise do Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (ELISA)	29
4.11. Análise Estatística	30
5.0. Resultados.....	31
PARTE I INFECÇÃO PELA CEPA Y (TcII) OU COLOMBIANA (Tcl) DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
5.1. Avaliação da parasitemia no sangue periférico dos cães infectados pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	33
5.2. Avaliações bioquímicas nos cães infectados pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	34
5.3. Avaliação hematológica nos cães infectados pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	36
5.4. Fenótipo das células mononucleares do sangue periférico dos cães infectados pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	38
5.5. Avaliação das citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos T na infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	40
5.6. Quantificação do processo inflamatório e da neoformação de colágeno no coração de cães infectados com a cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	42
5.7. Dosagem dos níveis séricos de IgG nos cães infectados com a cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	44
PARTE II INFECÇÃO PELA CEPA Y (TcII) OU COLOMBIANA (Tcl) DO <i>Trypanosoma cruzi</i> E TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL NA FASE AGUDA	45
5.8. Avaliação da parasitemia no sangue periférico frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	46
5.9. Avaliação bioquímica frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	47
5.10. Avaliação hematológica frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	49
5.11. Fenótipo das células mononucleares do sangue periférico frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	53
5.12. Avaliação das citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos T frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i> ..	55
5.14. Dosagem dos níveis séricos de IgG frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do <i>T. cruzi</i>	60
6.0. Discussão	62
7.0. Conclusão.....	74
8.0. Referências bibliográficas	76

Figura 1. Estrutura química do Benznidazol (Fórmula molecular: $C_{12}H_{12}N_4O_3$ e Peso molecular: 260.25g/mol).....	11
Figura 2. Delineamento experimental – PARTE I - cães sem raça definida (SRD) foram agrupados em NI (Grupo não infectado – n=3), Y (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y/kg, via intraperitoneal – n=3) e Col (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana/kg, via intraperitoneal – n=4). PARTE II - Grupos paralelos foram tratados com 7 mg de Benznidazol/kg (dividido em duas doses diárias durante 45 dias, por via oral) ao ser detectada parasitemia, compondo o grupo NIBz (Grupo tratado com Bz – n=3), YBz (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y/kg, via intraperitoneal, e tratado com Bz – n=4) e ColBz (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas da cepa Colombiana/kg, via intraperitoneal, e tratado com Bz – n=4).	22
Figura 3. Análise da imunofenotipagem do sangue periférico para separação das populações de linfócitos.....	24
Figura 4. Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$	27
Figura 5. Dosagem da alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B), gama-glutamil transferase (C), fosfatase alcalina (D), ureia (E) e creatina quinase (CK-NAC) (F) no soro dos animais não infectados (NI; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (Y; barra cinza) ou da cepa Colombiana (Col; barra preta) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
Figura 6. Análise da imunofenotipagem dos linfócitos T $CD4^+$ (A), T $CD8^+$ (B), B (C), e monócitos $CD14^+$ (D) no sangue periférico de animais não infectados (NI; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (Y; barra cinza) ou da cepa Colombiana (Col; barra preta) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
Figura 7. Produção de citocinas (IFN- γ e IL-4) por linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ do sangue periférico de animais não infectados (NI; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (Y; barra cinza) ou da cepa Colombiana (Col; barra preta) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
Figura 8. Número de células inflamatórias (coloração H&E) e área de colágeno (coloração Tricrômico de Masson) no átrio direito dos animais não infectados (NI; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (Y; barra cinza) ou da cepa Colombiana (Col; barra preta) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	43

- Figura 9.** Dosagem da alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B), gama-glutamil transferase (C), fosfatase alcalina (D), ureia (E) e creatina quinase (CK-NAC) (F) no soro dos animais não infectados e tratado com Benznidazol (NIBz; barra branca hachurada) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (YBz; barra cinza hachurada) ou da cepa Colombiana (ColBz; barra preta hachurada) do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol..... 48
- Figura 10.** Análise da imunofenotipagem dos linfócitos T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (B), B (C), e monócitos CD14⁺ (D) no sangue periférico de animais não infectados e tratados com Benznidazol (NIBz; barra branca hachurada) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (YBz; barra cinza hachurada) ou da cepa Colombiana (ColBz; barra preta hachurada) do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol. 54
- Figura 11.** Produção de citocinas (IFN- γ e IL-4) por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico de animais não infectados e tratados com Benznidazol (NIBz; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (YBz; barra cinza hachurada) ou com a cepa Colombiana (ColBz; barra preta hachurada) do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol..... 56
- Figura 12.** Número de células inflamatórias (coloração H&E) e área de colágeno (coloração Tricrômico de Masson) no átrio direito dos animais não infectados e tratados com Benznidazol (NIBz; barra branca hachurada) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (YBz; barra cinza hachurada) ou da cepa Colombiana (ColBz; barra preta hachurada) do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol.. 59

Tabela 1. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo utilizados para análise das populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.....	24
Tabela 2. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo utilizados para análise das citocinas intracitoplasmáticas em subpopulações leucocitárias	27
Tabela 3. Valores da parasitemia no sangue periférico de cães infectados com as cepas Y ou Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
Tabela 4. Valores da série vermelha do hemograma no sangue periférico de cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Tabela 5. Valores do leucograma do sangue periférico de cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
Tabela 6. Cinética da dosagem sérica de IgG-anti <i>T. cruzi</i> em cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
Tabela 7. Valores da parasitemia no sangue periférico de cães infectados com as cepas Y ou Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Benznidazol.....	46
Tabela 8. Valores da série vermelha do hemograma no sangue periférico de cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Benznidazol.	50
Tabela 9. Número de leucócitos e diferentes subtipos de células no sangue periférico de cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Benznidazol.	52
Tabela 10. Cinética da dosagem sérica de IgG-anti <i>T. cruzi</i> em cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com Benznidazol.	61

Estima-se que 7 a 8 milhões de indivíduos estejam infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC) (W.H.O., 2014), em especial na América Latina, onde essa doença é endêmica (Schofield e Dias, 1999).

Desde a descoberta da DC, em 1909 por Carlos Chagas, a heterogeneidade do parasito foi considerada um fator relacionado às diferentes formas clínicas da doença. A classificação dos subtipos do *T. cruzi* foi determinada conforme as características biológicas, parasitismo tecidual, morfologia, virulência e patogenicidade do parasito na infecção murina (Brener, 1973; Andrade, 1974). Sendo o *T. cruzi* foi agrupado em três fenótipos, denominados como Biodemas I, II e III (Andrade e Magalhães, 1997).

De modo geral, o Biodema I, correspondente ao Zimodema Z2b, foi caracterizado por apresentar cepas predominantemente de forma fina e macrofagotrópica na fase inicial da infecção, com alta virulência com 100% de mortalidade em 12 dias, e pico de parasitemia e mortalidade entre o 7º e o 11º dia pós-infecção (d.p.i.). O Biodema II, correspondente ao Zimodema Z2, apresenta cepas de forma predominantemente larga, miotrópica, com tropismo pelo músculo cardíaco e taxa de multiplicação lenta, cujo pico de parasitemia ocorre de maneira irregular entre o 12º e o 20º d.p.i. Cepas pertencentes a este tipo de Biodema podem apresentar diferentes níveis de virulência. Já o Biodema III, correspondente ao Zimodema Z1, exibe cepas de forma predominantemente larga e miotrópica, com envolvimento de músculo esquelético, pico de parasitemia tardio entre o 25º e o 30º d.p.i. e baixa mortalidade aos 30 dias (Andrade e Magalhães, 1997).

Posteriormente, o parasito foi agrupado em dois grupos principais denominados como *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, que anteriormente se encaixavam na classificação como Biodema III (Zimodema Z1) e Biodema II (Zimodema Z2), respectivamente. As cepas híbridas e com caracterização incerta foram denominadas apenas como *T. cruzi* até a realização de novos estudos (Anonymous, 1999).

Recentemente, as populações de *T. cruzi* foram reagrupadas, conforme a expressão fenotípica e as características moleculares, em unidade de tipagem (do inglês “*Discrete Typing Units*” - DTU), denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI, as quais foram caracterizadas por marcadores genéticos (Zingales *et al.*, 2009).

Estudos geográficos e epidemiológicos apontam distribuições distintas dessas DTUs, sendo os TcI e TcII mais abrangentes, visto que o TcI é prevalente na América Central e na região norte do Brasil, e o TcII é encontrado predominantemente na América do Sul (Zingales *et al.*, 2009). Essas distintas DTUs, aparentemente, apresentam diferentes padrões de tropismo e parasitismo tecidual (Vago *et al.*, 2000).

O padrão do parasitismo tecidual e o grau de resistência ao tratamento por sua vez tem relação com as propriedades biológicas do parasito, uma vez que de modo geral a infecção com o *T. cruzi* I e o *T. cruzi* II estão relacionadas com casos de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). Ainda, a DTU I foi considerada resistente frente ao único fármaco disponível comercialmente no Brasil

para o tratamento da DC, o Benznidazol (Bz). Por outro lado, o *T. cruzi* II foi considerado macrofagotrópico e parcialmente susceptível ao tratamento com Bz (Filardi e Brener, 1987; Toledo *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2004).

Em estudos clínicos randomizados, o tratamento com Bz na fase aguda favorece a redução da carga parasitária e sororeversão dos pacientes tratados (de Andrade *et al.*, 1996; Coura *et al.*, 1997; Sosa-Estani *et al.*, 1998). Sugere-se que o tratamento etiológico com Bz deva ser iniciado nos estágios iniciais da DC, pois quando iniciado na fase aguda pode alcançar níveis de 70% de cura (Rodrigues Coura e de Castro, 2002). Outros trabalhos tem revelado que a intervenção com o tratamento de pacientes na forma indeterminada melhora o prognóstico da doença (Lana *et al.*, 1992; Macchadao-de-Assis *et al.*, 2013).

O Bz ativa a resposta imune inata com aumento dos níveis de monócitos, todavia com diminuição dos monócitos TNF- γ^+ e IL-12 $^+$ (Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Na resposta imune adaptativa, o tratamento com Bz favorece mecanismos imunomoduladores mediados por IL-10 produzido por linfócitos T CD4 e B, além de aumentar o número de células NK ativas no sangue periférico, que tem participação na produção e citocinas pró-inflamatórias e moduladoras (Sathler-Avelar *et al.*, 2006). Isto demonstra a importância da inter-relação entre a resposta imune inata e adaptativa no controle da resposta imune exacerbada, que poderá acarretar na lesão tecidual (Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Por outro lado, os casos de falha terapêutica, aparentemente, dependem de mecanismos que interferem na expressão de genes relacionados à resistência de algumas cepas do parasito (Campos *et al.*, 2014).

Apesar de estar elucidado que o Bz alcança níveis de cura importantes nos pacientes tratados na fase aguda da DC, ainda se faz necessário compreender a participação das diferentes DTUs de *T. cruzi* na patogênese da doença, bem como elucidar as alterações imunológicas e histopatológicas cardíacas frente ao tratamento na infecção com cepas do *T. cruzi* que apresentam diferentes graus de susceptibilidade ao tratamento com Benznidazol. Portanto, neste trabalho avaliamos a infecção com duas cepas de DTUs distintas, a cepa Y, caracterizada como TcII e considerada parcialmente resistente ao tratamento com Bz no modelo murino e susceptível no modelo canino, e a cepa Colombiana, classificada como TcI e resistente à terapia com Bz nos modelos murino e canino (Filardi e Brener, 1987; Veloso *et al.*, 2001; Guedes *et al.*, 2002).

2.0. Revisão Bibliográfica

2.1. O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A DC é causada pelo protozoário hemoflagelado *T. cruzi* e transmitida por insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Chagas, 1909). O triatomíneo pode adquirir o *T. cruzi* a partir de outros triatomíneos infectados ou ao se alimentar do sangue de mamíferos infectados, ingere a forma tripomastigota sanguínea, que se transforma em esferomastigota no estômago, que se transforma em epimastigota no intestino médio. Na ampola retal do vetor, as formas epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas nas fezes, podendo penetrar na mucosa ou pele lesionada do mamífero, infectando todas as células do sistema mononuclear fagocitário (Dias, 1934; Dias e Coura, 1997).

A transmissão vetorial, descrita acima de forma resumida, foi controlada no Brasil, Uruguai e Chile após medidas profiláticas com o uso de inseticida intradomiciliar contra o *Triatoma infestans*, triatomíneo alóctone e exclusivamente domiciliado (W.H.O., 2002; Moncayo, 2003; revisto por Dias, 2009; Moncayo e Silveira, 2009). Os focos remanescentes do *T. infestans* apresentam pouca probabilidade de expansão por estarem sob constante controle (Silveira e Dias, 2011). Entretanto, estamos assistindo uma globalização crescente da doença, levada a outros continentes pelos imigrantes infectados, onde a DC tem sido transmitida por outros mecanismos independentes do vetor (Schmunis e Yadon, 2010).

Estas medidas profiláticas diminuíram substancialmente a incidência da doença nesses países, visto que há mais de duas décadas as estimativas indicavam prevalência da infecção chagásica em 16 a 18 milhões de indivíduos (W.H.O., 1991), porém atualmente, cerca de 7 milhões de indivíduos encontram-se infectados por esse parasito (W.H.O., 2014), em especial nas Américas Central e do Sul, além de países não endêmicos, como América do Norte e Europa, em função dos movimentos migratórios (Schmunis, 2007).

A DC é caracterizada por duas fases clinicamente distintas (Dias *et al.*, 1956). Inicialmente a fase aguda, com duração de aproximadamente dois meses, pode ser assintomática ou sintomática (Chagas, 1916). Aproximadamente 90% dos casos não é diagnosticado devido à semelhança dos sinais e sintomas com outras enfermidades agudas. Nesta fase podem ser observados anticorpos IgM e IgG anti-*T. cruzi*, parasitemia patente e parasitismo tecidual com alterações histológicas evidentes. O óbito durante a fase aguda, quando ocorre, está relacionado a quadros de miocardite e/ou meningoencefalite graves, visto que de modo geral, o desenvolvimento da resposta imune controla a parasitemia e o parasitismo, apesar de não eliminar o parasito (Umezawa *et al.*, 1996; Parada *et al.*, 1997; Elias *et al.*, 2003).

Após a fase aguda, indivíduos infectados permanecem sem sinais e sintomas clínicos, na denominada forma indeterminada da doença, que pode durar décadas (Dias, 1989; Tanowitz *et al.*, 1992; Prata, 2001). Nesse período, o paciente apresenta exames eletrocardiográficos e radiológicos

do tórax e abdômen normais, com parasitemia e parasitismo reduzidos. Entretanto, a suspeita da infecção pode ser confirmada por testes parasitológicos, como hemocultura e xenodiagnóstico, teste sorológico, tal como ELISA (do inglês “*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”) e teste molecular, como a PCR (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”) (Chiari *et al.*, 1989; Avila *et al.*, 1991; Barreto e Andrade, 1994; Gomes *et al.*, 1998).

Por outro lado, aproximadamente 30% dos pacientes progridem para a forma crônica sintomática, que se apresenta em diferentes quadros clínicos, tais como: a) forma cardíaca, com envolvimento cardíaco; b) forma digestiva com o desenvolvimento de megaesôfago ou megacólon; ou c) forma mista com envolvimento cardiodigestivo (revisto por Rassi *et al.*, 2010).

Estas diferentes formas clínicas, aparentemente se relacionam à regulação diferencial da síntese de citocinas, visto que pacientes na forma indeterminada ou chagásicos crônicos não cardíacos apresentam maior nível sérico de citocinas moduladoras como IL-10, IL-13 e IL-5 (Sousa *et al.*, 2014), enquanto pacientes com CCC apresentam aumento do nível sérico de citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-2, IL-6, IL-9, IL-12 (Poveda *et al.*, 2014), IFN- γ e TNF- α (Sousa *et al.*, 2014), relacionadas à lesão tecidual.

2.2. Variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *T. cruzi* pode ser encontrado tanto no ambiente domiciliar e peridomiciliar quanto no silvestre (Zingales *et al.*, 1998). Este parasito se reproduz predominantemente por divisão binária, o que levou à criação da teoria da propagação clonal (Tibayrenc, 1990). Todavia outros autores questionaram a hipótese clonal ao confirmar a existência de cepas híbridas (Westenberger *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006; Baptista *et al.*, 2014).

Os isolados do *T. cruzi* foram agrupados conforme semelhança genética em unidade descrita de tipagem (DTU), que se relaciona a unidades evolucionárias (Tibayrenc *et al.*, 1998). Esses conjuntos foram denominados como: *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV) e *T. cruzi* VI (TcVI) (Zingales *et al.*, 2009).

Cada DTU é composta por cepas geneticamente similares que são identificadas por apresentarem marcadores moleculares ou imunológicos comuns. Esta variabilidade genética também se relaciona com diferenças biológicas, visto que estes grupos apresentam variabilidade antigênica, além de distintas preferências por hospedeiros e tropismo tecidual (Andrade 1974; Andrade *et al.*, 1996; Duz *et al.*, 2014).

A distribuição do *T. cruzi* não é facilmente apontada, uma vez que ocorre sobreposição de algumas DTUs. A TcI é a mais abundante e dispersa, sendo associada aos ciclos silvestre e doméstico. Esta DTU tem como vetor várias espécies de triatomíneos e, geograficamente, é

encontrada da América Central ao norte da América do Sul, com maior presença na Colômbia, Venezuela, Equador e Peru, e esporadicamente no cone sul. Exemplos de cepas classificadas nesta DTU são CA-1, Colombiana, Davis 9.90, Dm28c, Dm7, G, Jose e Sylviof X10 cl1, e clones Cuica cl1 e Cutia cl1. Esta DTU tem como característica alta patogenicidade no modelo murino, baixa sensibilidade a fármacos antitripanossomatídeos e alta transmissibilidade. Sob o ponto de vista clínico, a TcI está associada a CCC e meningoencefalite grave em pacientes imunocomprometidos (Tibayrenc, 2003; Zingales *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012; Zingales *et al.*, 2014). A TcII é encontrada predominantemente na região centro-sul da América do Sul, como na região central do Brasil, na Argentina e no Chile. Alguns exemplos de cepas que foram classificadas nesta DTU são 12 SF, 21 SF, Peruvian e Y, ou clones Esmeraldo cl3, IVV cl4 e MAS cl1. Esta DTU tem como característica baixa patogenicidade no modelo murino, alta sensibilidade a fármacos antitripanossomatídeos e baixa transmissibilidade. A TcII é principalmente relacionada ao ciclo doméstico, ocasionando formas crônicas severas com manifestações cardíacas e, às vezes, concomitantemente a megacólon e megaesôfago (Tibayrenc, 2003; Zingales *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012; Zingales *et al.*, 2014).

A TcIII é primariamente associada ao ciclo silvestre, com raros casos de infecção humana documentados, exceto relatos de casos agudos na região amazônica brasileira. A TcIV apresenta predominante associação ao ciclo silvestre, sendo o agente secundário da DC na Venezuela. As TcV e TcVI raramente são relacionadas ao ciclo silvestre, sendo o principal agente etiológico da DC no cone sul, na Bolívia, Argentina, Paraguai e na região do Chaco argentino, com casos relacionados a forma cardíaca e megasíndromes (Miles *et al.*, 1981; Zingales *et al.*, 1998; Lages-Silva *et al.*, 2006; Zingales *et al.*, 2012; Zingales *et al.*, 2014).

No Brasil, as DTUs TcI e TcII correspondem a cepas que estão associadas aos ciclos de transmissão silvestre e doméstico, respectivamente (Anonymous 1999), sendo que as cepas TcII são encontradas na maioria dos pacientes infectados. A TcI é prevalente na região norte do Brasil, além disso, as populações TcI/TcII são encontradas em vetores e reservatórios (Macedo *et al.*, 2004). A prevalência das formas clínicas e morbidade da DC, de acordo com a variação geográfica, aponta que no Brasil a forma indeterminada seja a mais comum, ocorrendo em 60 a 70% dos casos, seguida pelas formas cardíaca (20 a 30%) e digestiva (8 a 10%), sendo a forma mista, com acometimento cardíaco e digestivo, a menos frequente. Porém, na região central do Brasil e no Chile observa-se predomínio da forma digestiva, enquanto que na Venezuela e América Central esta forma é praticamente inexistente (Dias, 1992).

Na Colômbia, as principais DTUs do *T. cruzi*, que acometem os pacientes chagásicos, são TcI e TcII, sendo o parasito identificado em vetores, reservatórios silvestres e seres humanos (Montilla *et al.*, 2002). Em estudo parasitológico a TcI permaneceu por tempo mais prolongado na corrente sanguínea do paciente, o que era de se esperar uma vez que a TcI é composta por formas largas. Por outro lado, a TcII, composta por formas mais delgadas ou intermediárias, foi detectada

diretamente em tecido cardíaco, o que pode sugerir que esta última DTU migre para o tecido mais rapidamente. Porém, em longo prazo, esta variabilidade genética e tropismo do parasito não se correlacionam com as alterações histológicas, uma vez que ambas DTUs culminaram em graves lesões cardíacas (Zafra *et al.*, 2011).

Todavia, outros pesquisadores descreveram correlação entre a presença da TcII no tecido cardíaco com as alterações características da CCC, como fibrose intersticial, infiltrado inflamatório mononuclear e ninhos de formas amastigotas. Ao contrário, a TcI foi observada na camada muscular do esôfago, com infiltrado inflamatório e áreas de fibrose discretos (Mantilla *et al.*, 2010). Desta forma, este padrão de parasitismo tecidual por distintas DTUs pode estar relacionada à patogênese das distintas formas crônicas da DC (Vago *et al.*, 2000). Todavia estudos de D'Ávila e colaboradores (2009) não conseguiram estabelecer correlação entre o perfil genético do *T. cruzi*, a distribuição geográfica e as formas clínicas da DC. A razão desta heterogeneidade das formas clínicas ainda não foi esclarecida, acredita-se que possa estar relacionada tanto a variabilidade clonal do parasito quanto a fatores ambientais, nutricionais e imunológicos do hospedeiro. Uma vez que nos casos de infecção mista ou policlonal o método de avaliação baseia-se no isolamento dos parasitos.

2.3. Cardiomiopatia chagásica crônica

O sistema imune do hospedeiro ao reconhecer o *T. cruzi* pode tanto controlar a parasitemia e o parasitismo no início da infecção quanto promover reação inflamatória excessiva, a qual induz a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que conseqüentemente podem causar os sintomas característicos como hepatomegalia e miocardite aguda. Este processo de reconhecimento e ativação do sistema imune pelo parasito, aparentemente, está relacionado à presença de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI mucinas) na superfície do parasito ou a moléculas derivadas do *T. cruzi*, como DNA e glicoproteínas, as quais estimulam as células dendríticas e macrófagos, via receptores "Toll-like" (TLR) tipo 2, a formar dímero com TLR tipo 6 ou 1 de modo transduzir sinal, fosforilar proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e ativar genes relacionados a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (revisto por Campos e Gazzinelli, 2004).

Pacientes portadores da DC apresentam resposta imune polarizada do tipo Th1, especialmente pacientes com CCC, que têm resposta pró-inflamatória no tecido cardíaco. Abel *et al.* (2001) ao compararem pacientes com as formas clínicas distintas, observaram que as células mononucleares de sangue periférico (do inglês "*Peripheral Blood Mononuclear Cell*" - PBMC) do paciente cardiopata produzem quantidade superior de IFN- γ em relação aos indivíduos com a forma indeterminada da doença. Esta resposta pode ser um dos pontos relevantes para direcionar a forma cardíaca da DC. No entanto, este não é o único fator responsável pela CCC uma vez que o aumento da produção de IFN- γ não tem correlação com o detrimento da função ventricular. Todavia, em outro

trabalho, ao comparar as formas clínicas cardíaca, digestiva e indeterminada com a dosagem plasmática das citocinas não foi observada diferença nos níveis de IFN- γ e TNF- α em relação a indivíduos não infectados (Pissetti *et al.*, 2009). Experimentalmente, dentre estas citocinas, o IFN- γ tem participação no influxo de células inflamatórias e produção de outras citocinas (Aliberti *et al.*, 2001), por outro lado, o TNF- α favorece o controle na progressão da CCC, além disso, o bloqueio desta citocina leva ao aumento da disfunção ventricular (Bilate *et al.*, 2007).

Este processo de lesão cardíaca tem início com o desenvolvimento das formas amastigotas intracelulares, que promovem o rompimento da célula hospedeira e favorecem a migração das células do sistema imune, em especial linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos em direção ao tecido (Reis *et al.*, 1993; Elias *et al.*, 2003), bem como, agregação plaquetária nos capilares (Andrade *et al.*, 1994), o que acarreta na lesão dos cardiomiócitos (Elias *et al.*, 2003) e das células do sistema condutor (Dias, 2006).

Especificamente os linfócitos T CD8⁺ tem papel controverso. Estudos sugerem que estas células citotóxicas são responsáveis pela eliminação da célula parasitada, via produção de IFN- γ , granzimas e perforinas (Müller *et al.*, 2003). Todavia camundongos que não produzem linfócitos T CD8⁺, mas expressam perforina apresentaram menor lesão e disfunção cardíaca (Silverio *et al.*, 2010). Por outro lado, camundongos deficientes em produzir linfócitos T CD4⁺ apresentaram aumento do parasitismo tecidual, uma vez que esta célula induz a ativação dos macrófagos e proliferação dos linfócitos T CD8⁺ e B (Rottenberg *et al.*, 1995; Gonçalves da Costa *et al.*, 2002). Similarmente, na ausência de linfócitos B observou-se menor área de infiltrado inflamatório e percentual de linfócitos T CD8⁺ (Cardillo *et al.*, 2007).

Na fase crônica da DC, a CCC foi considerada a principal causa de morbidade e mortalidade. Este quadro decorre das alterações microvasculares, inflamação tecidual crônica e degeneração cardíaca induzida pelo parasito ao longo da infecção (Factor e Sonnenblick, 1985; Morris *et al.*, 1990; Petkova *et al.*, 2001), com diferentes níveis de lesão ao sistema de condução e alteração da contratilidade cardíaca, o que pode culminar na parada cardíaca, com consequente morte súbita (Prata, 2001).

A disautonomia cardíaca é evidenciada pela desnervação parassimpática e ativação simpática (Machado *et al.*, 2000; revisto por Maya *et al.*, 2010). Como consequência clínica observa-se ausência de mecanismos mediados pelo nervo vago, que acarreta bradicardia ou taquicardia em resposta à alteração transitória da pressão arterial ou venosa (Miziara *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2009).

Na lesão cardíaca, os espaços deixados pelas fibras musculares necrosadas são reparados pela formação de colágeno e hipertrofia dos miócitos restantes. Quando ocorre a perda do equilíbrio entre a formação do tecido fibroso e a ação das collagenases, a fibrose intersticial dificulta as contrações cardíacas (Engman e Leon, 2002), verificando-se clinicamente a presença de arritmia,

insuficiência cardíaca congestiva e eventos tromboembólicos (Dias, 1987; Tostes *et al.*, 2005; Dias, 2006; Punukollu *et al.*, 2007).

2.4. Tratamento etiológico da Doença de Chagas

Após a descoberta da DC (Chagas, 1909), iniciaram-se as pesquisas buscando possíveis substâncias candidatas para o tratamento dessa enfermidade. Entretanto, a princípio, todas foram ineficientes (revisto por Rodrigues Coura e de Castro, 2002). A partir de 1961, duas grandes contribuições estimularam o início do protocolo de tratamento. A primeira foi a demonstração de que os nitrofuranos, em esquemas terapêuticos de longa duração, foram ativos na infecção experimental com *T. cruzi* no modelo murino (Brener, 1961) e a segunda relacionou-se à padronização da metodologia terapêutica pelo "Grupo de Estudos para o Tratamento da Doença de Chagas", no qual foram elaborados critérios para a seleção de drogas, esquema terapêutico e avaliação dos resultados (Anais da Reunião de Debates sobre a Doença de Chagas, 1963).

Na década de 60 vários ensaios clínicos controlados foram realizados, que apontaram dois fármacos particularmente eficazes: o Nifurtimox (Nf) e o Benznidazol (Bz), disponibilizados em 1967 e 1972, respectivamente (Haberkorn e Gonnert, 1972; Raaflaub e Ziegler, 1979). Estes fármacos alcançaram bons níveis de cura no tratamento da fase aguda, entretanto o tratamento na fase crônica não apresentou a mesma eficácia (revisto por Jannin e Villa, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), o fármaco ideal para o tratamento da DC deve apresentar as seguintes características: cura parasitológica na fase aguda e crônica; eficácia em uma ou poucas doses; preço acessível aos pacientes; não apresentar efeitos colaterais ou teratogênicos; não necessitar de internação para o tratamento; e não induzir resistência. Todavia o fármaco ideal, que cumpra todos esses pré-requisitos, ainda não existe.

O Nf (4[(5-nitrofurfurylidene)amino]-3-methylthiomorpholine-1,1-dioxide) foi disponibilizado comercialmente como Lampit^M, Bayer 2503 (Leverkusen, Alemanha) e aparentemente tem modo de ação via a geração de radical nitro ânion, que na presença de oxigênio leva à formação de radicais livres (revisto por Docampo e Moreno, 1986). Entretanto, a partir da década de 80, a comercialização do Nf foi descontinuada no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai, devido à resistência de algumas cepas ao fármaco, bem como, ao desinteresse de continuar a produção de um medicamento pouco lucrativo (Rodrigues Coura e de Castro, 2002).

O Bz fabricado anteriormente por Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., denominado como Rochagan[®] e Rodanil[®], atualmente é fabricado no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (Pernambuco, Brasil).

No presente momento o Bz, derivado nitroimidazólico (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) (Figura 1), é o único fármaco disponível no Brasil como agente quimioterápico utilizado no tratamento da DC humana (MS/SVS, 2005). Entretanto o tratamento com Bz pode apresentar efeitos colaterais que podem causar a descontinuidade do tratamento, sendo observados em 10-20% dos casos (Urbina, 2014), tais como, sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas, edema, febre, anorexia, perda de peso corporal, linfadenopatia, dor muscular, depressão da medula óssea, trombocitopenia e agranulocitose, polineuropatia, parestesia e polineurites periféricas (revisto por Rodriques Coura e de Castro, 2002; Lamas *et al.*, 2006; de Pontes *et al.*, 2010).

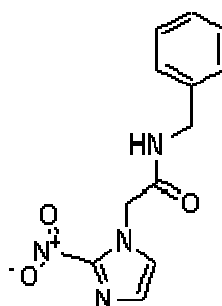


Figura 1. Estrutura química do Benznidazol (Fórmula molecular: $C_{12}H_{12}N_4O_3$ e Peso molecular: 260.25g/mol).

O Bz é totalmente absorvido no trato digestório, atravessa a barreira hematoencefálica e distribui para os tecidos (Pupulin *et al.*, 2005). Uma hora após a administração o Bz pode ser detectado, alcança concentração plasmática máxima em 2 a 4 horas, e após 6 horas a concentração no tecido cardíaco começa a decrescer. Este fármaco apresenta meia vida de eliminação plasmática de 12 horas, com metabolização hepática e eliminação dos metabólitos na urina e fezes (revisto por Sobrinho *et al.*, 2007; Mecca *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação deste fármaco ainda não está totalmente elucidado, no entanto, sugere-se ação por estresse redutivo, envolvendo a modificação covalente das macromoléculas por intermediários nitroreduzidos, outras interações de nitroredução com os componentes do parasito, ou mesmo por potencial redox negativo independente dos danos oxidativos (Docampo e Moreno, 1984; Docampo, 1990; de Castro *et al.*, 2003; revisto por Sobrinho *et al.*, 2007).

O Bz é uma pró-droga que é ativada pela nitroredutase tipo I, NADPH dependente, presente na mitocôndria do parasito. Logo, a expressão reduzida dessa enzima acarreta em resistência do parasito ao fármaco (Wilkinson *et al.*, 2008). De modo geral, sugere-se que o Bz atue via formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos, produzidos pela redução do grupo nitro pela nitroredutase. Este processo começa com a reação catalisada pelo NADPH-citocromo P-450 redutase, que atua sobre o grupo nitro da molécula $R-NO_2$, levando à formação de um radical ânion nitro intermediário ($R-NO_2^-$). Para os nitrofuranos, o radical tem elevado potencial redox e sofre uma reação do tipo ciclo redox com o oxigênio molecular, o qual reduz e regenera parcialmente o fármaco

(Diaz de Toranzo *et al.*, 1988). Paralelamente, o oxigênio é reduzido a ânion superóxido (O_2^-) pela transferência de um elétron para o oxigênio no nível do complexo da NADPH desidrogenase. A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorre por dismutação do ânion superóxido. Desta forma, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, na presença do íon férrico Fe^{3+} , formam o radical livre hidroxila (reação Haber–Weiss). Os radicais livres produzidos, principalmente o hidróxido (OH^\bullet), ligam-se a lipídios, proteínas, DNA (Diaz de Toranzo *et al.*, 1988; Maya *et al.*, 2007) e proteínas não histonas do DNA (Gorla *et al.*, 1986), o que pode ser responsável pela injúria ao parasito (de Castro *et al.*, 2003).

2.5. O tratamento etiológico com Benznidazol

O tratamento com Bz é considerado seguro (Hasslocher-Moreno *et al.*, 2012) e apresenta capacidade tripanossomicida sobre todas as formas do parasito (Rodrigues Coura e de Castro, 2002), sendo recomendado aos pacientes chagásicos na fase aguda, assim que o diagnóstico for realizado (revisto por Jannin e Villa, 2007), em quaisquer formas de transmissão, incluindo a infecção congênita, acidental e a decorrente de imunossupressão. Todavia, os estudos são controversos quanto aos desfechos terapêuticos, devido as diferentes casuísticas, métodos de avaliação, tempo de acompanhamento e interpretação dos dados, sendo poucos os estudos prospectivos controlados por grupos não tratados e alocados de modo randômico.

Entre os estudos não randomicamente controlados que avaliaram o efeito do tratamento por testes sorológicos e parasitológicos, alguns descreveram alterações eletrocardiográficas e progressão clínica da DC, sendo controversos quanto à eficácia do tratamento com Bz (Macedo e Silveira, 1987; Ianni *et al.*, 1993; Viotti *et al.*, 1994; Fragata Filho *et al.*, 1995) na evolução da cardiopatia. Porém, estes resultados foram discordantes e controversos, principalmente devido a diferenças marcantes nas populações amostradas, nos métodos de avaliação da eficácia do tratamento, esquema terapêutico, tempo de seguimento, critérios de “cura” e interpretação dos resultados.

Os estudos controlados e randomizados focaram primeiramente em crianças e pacientes com a forma indeterminada, sendo os desfechos usualmente baseados na negativação da parasitemia e das reações sorológicas (Cancado, 2002). Trabalhos distintos observaram níveis de cura distintos, no primeiro os índices foram superiores a 60% nos pacientes tratados com Bz em comparação a 30 a 40% dos indivíduos que receberam placebo (Sosa-Estani *et al.*, 1998). Em outro trabalho, o tratamento com Bz acarretou em 58% de sororeversão em comparação a 5% no grupo placebo aos 03 anos pós-tratamento (de Andrade *et al.*, 1996), ademais aos 06 anos de seguimento a negativação foi de 84,7% dos indivíduos tratados com Bz (Andrade *et al.*, 2004). Esta eficácia terapêutica em crianças possivelmente tem relação com a menor capacidade das nitroreduases metabolizar os

derivados nitroheterocíclicos do Bz nos microssomos hepáticos, tal como observado em modelo experimental, no qual animais jovens apresentaram níveis superiores e mais duradouros de Bz no sangue em comparação com animais adultos (Bulffer *et al.*, 2011).

Uma análise combinada de vários estudos mostrou a eficácia terapêutica do Bz, com redução dos desfechos clínicos após o tratamento de 756 pacientes chagásicos (Villar *et al.*, 2002). O tratamento na fase aguda alcançou níveis de cura em 50-70% dos casos (de Ferreira *et al.*, 1963). Por outro lado, na fase crônica a indicação restringiu aos casos indeterminados recentes (Galvão *et al.*, 2003), especialmente em crianças (revisito por Rodrigues Coura e de Castro, 2002). Mesmo assim, na fase crônica recomenda-se indicar o tratamento, a fim de impedir a evolução clínica, visto que a terapia com Bz reduziu os níveis de parasitemia, diminuiu o título sorológico e protege contra as alterações cardíacas (Amato, 1998; Cancado, 2002; Fabbro *et al.*, 2011; Andrade *et al.*, 2013; Urbina, 2014). Portanto, mesmo não alcançando a cura parasitológica, o tratamento com este fármaco minimizou a progressão clínica da DC e o prognóstico, particularmente quando o tratamento etiológico foi administrado em pacientes com a forma indeterminada (Lana *et al.*, 2009; Machado-de-Assis *et al.*, 2013).

Por outro lado, estudos de Lauria-Pires *et al.* (2000) apresentaram resultados pouco favoráveis frente ao tratamento com nitroderivados, Bz ou Nf, em pacientes randomicamente alocados. Inicialmente foi observada diminuição dos títulos dos anticorpos, porém no seguimento de 10 anos não foi observada cura parasitológica e houve progressão das alterações eletrocardiográficas. Este padrão pode estar relacionado à cepa infectante, uma vez que cepas distintas apresentam diferente susceptibilidade ao tratamento com Bz, que até mesmo pode acarretar em falha terapêutica (Filardi e Brener, 1987).

Atualmente a terapia com Bz também é preconizada para pacientes soropositivos na fase crônica, apesar dos questionamentos sobre sua eficácia e desfecho clínico. Um ensaio clínico fase 3, internacional multicêntrico, randomizado, duplo cego e placebo controlado, denominado BENEFIT (do inglês "*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*") foi iniciado em 2005, cujo objetivo é confirmar a eficácia do tratamento com Bz mesmo quando iniciado na fase crônica, ao prevenir a progressão da cardiomiopatia chagásica crônica e morte (Marin-Neto *et al.*, 2009).

Nos desfechos clínicos distintos, os níveis significativos de eficácia do tratamento contra cepas susceptíveis aparentemente está relacionado ao favorecimento da fagocitose, produção de citocinas e reativos intermediários de nitrogênio, além de inibir a respiração e alterar a forma e motilidade do parasito (Murta *et al.*, 1998; Murta *et al.*, 1999; Pupulin *et al.*, 2005). Por outro lado, as falhas terapêuticas podem estar relacionadas, pelo menos em parte, com a variabilidade genética do parasito (Murta *et al.*, 1998), uma vez que populações do *T. cruzi* resistentes ao Bz apresentam menor número de cópias e expressão do gene das enzimas nitroredutases, sendo esse mecanismo de resistência independente da formação de espécies reativas de oxigênio (Mejía-Jaramillo *et al.*, 2011).

Ao avaliar o sistema imune de indivíduos chagásicos tratados com Bz, foi observado que aparentemente este fármaco modula a resposta imune durante as fases indeterminada e crônica da DC, visto que o tratamento aumenta a quantidade e altera a capacidade funcional dos leucócitos ativos (Sathler-Avelar *et al.*, 2006; Sathler-Avelar *et al.*, 2009; revisto por Maya, 2010). Especificamente pacientes chagásicos tratados com Bz na fase aguda e considerados curados, acompanhados após 14 a 30 anos, apresentaram nível significativamente maior de proliferação das PBMCs após estímulo com antígenos de formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi* (Bahia-Oliveira *et al.*, 2000).

O padrão regulatório predominante observado nos pacientes chagásicos na forma indeterminada é determinado pelas citocinas moduladoras produzidas por linfócitos T CD4⁺. Por outro lado, pacientes cardíacos produzem menor quantidade de citocinas regulatórias, sendo observado predomínio do perfil pró-inflamatório, particularmente relacionado com monócitos de fenótipo inflamatório, neutrófilos, células NK e B que produzem citocinas de perfil misto. A diferença mais relevante é que o paciente chagásico cardíaco aumenta a produção de TNF- α por monócitos e, por outro lado, diminui a frequência de células T CD8⁺ produtoras de IL-10. Tanto na presença de estímulo com *T. cruzi in vitro* quanto no tratamento *in vivo* com Bz houveram mudanças notáveis do padrão de citocina regulatória produzida por monócitos e linfócitos T CD4⁺. O tratamento com Bz também diminuiu as células T CD4⁺ produtoras de IL-10, no grupo indeterminado, enquanto no grupo cardíaco, houve aumento da frequência de monócitos produtores de IL-10 (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008).

Especificamente, o tratamento com Bz na fase indeterminada recente da DC favoreceu a diminuição na produção das citocinas IL-12 e IL-10 produzidas por monócitos e neutrófilos, além de diminuição da produção de IFN- γ por células NK, bem como, menor produção de IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-5 por linfócitos T CD4⁺, e diminuição da produção de IL-10 por células B. Apenas, os linfócitos T CD8⁺ mantiveram o nível basal de expressão de citocinas.

Ademais, na presença de estímulo com antígeno do *T. cruzi* o perfil de citocina tem padrão modulador tipo 1, com aumento dos níveis de IL-12 e IL-10 produzidos por monócitos, bem como, maior produção de IFN- γ e IL-4 por células NK, e aumento de TNF- α e IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ (Sathler-Avelar *et al.*, 2006; Sathler-Avelar *et al.*, 2009).

Na resposta imune adaptativa é observado padrão de resposta tipo 2 pelos linfócitos T auxiliares. O tratamento com Bz nesta fase favoreceu aumento da produção de IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD4⁺. Ademais na presença de estímulo antigênico houve exuberante aumento de IL-10, além do sutil aumento de TNF- α e IL-4. Nos linfócitos B predominou a síntese de IL-10. Por outro lado, os linfócitos T citotóxicos tiveram padrão de resposta tipo 1, no qual os linfócitos T CD8⁺ expressam níveis superiores de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10, sendo que após o estímulo com antígeno de *T. cruzi* houve considerável aumento na expressão de IFN- γ . Logo, estes fatos evidenciaram que o tratamento com Bz favorece a modulação da resposta imune, caracterizada pela

importante produção de IFN- γ pelas células NK⁺ e T CD8⁺, tal como produção de IL-10 por linfócitos T CD4⁺ e B (Sathler-Avelar *et al.*, 2006).

A eficácia do tratamento da DC e a avaliação pós-tratamento para determinação de cura é complexo. Inicialmente era baseada na negativação do xenodiagnóstico e eliminação de anticorpo específico (Krettli *et al.*, 1982). Já atualmente, a eficácia do tratamento etiológico é interpretada segundo o “critério de cura clássico” (Cançado, 2002; WHO, 2002).

2.6. Modelos experimentais

A DC pode ser avaliada através do acompanhamento de pacientes ou diferentes modelos experimentais como camundongo, cobaia, rato, roedor silvestre, coelho, cão e primata, nos quais é possível reproduzir distintos aspectos patológicos da DC humana.

O modelo murino tem sido alvo preferencial de diversos pesquisadores pela facilidade de obtenção, manutenção e manuseio. Diversos parâmetros têm sido analisados, tais como a relação parasito-hospedeiro, o comportamento das cepas do *T. cruzi*, a eficácia de fármacos, a resposta imunológica e os achados histopatológicos do hospedeiro (Brener *et al.*, 1976; Andrade *et al.*, 1985; Ben Younès-Chennoufi *et al.*, 1988). Embora o modelo murino apresente alguns aspectos comuns à DC humana, como características imunológicas, patológicas e fisiológicas, existe pouca correlação entre as alterações crônicas observadas no camundongo e no ser humano (Costa, 1999). Em particular, o modelo murino não permite determinar com rigor as disfunções cardíacas (Morris *et al.*, 1991).

O modelo canino apresenta aspectos fisiológicos e morfológicos cardíacos e do sistema de condução muito semelhantes aos do humano (Lumb *et al.*, 1959; Mirowski *et al.*, 1970). Além disso, o modelo experimental canino apresenta vantagens sobre os outros modelos experimentais no estudo de vários fatores envolvidos na interação entre parasito e hospedeiro, bem como, reproduz várias características da DC humana, como a forma aguda sintomática, indeterminada e crônica sintomática cardíaca. Na infecção experimental com *T. cruzi*, o cão apresenta aspectos clínicos e sorológicos similares à DC, tais como parasitemia patente, parasitismo tecidual, inflamação e fibrose do miocárdio, com deposição de tecido adiposo no sistema de condução, o que acarreta em alterações eletrocardiográficas e pode evoluir para a disfunção cardíaca e CCC com quadro de insuficiência cardíaca. Mais importante ainda, o modelo cão reproduz a fibrose cardíaca difusa, característica da cardiopatia chagásica humana (Laranja e Andrade 1980; Tafuri *et al.*, 1988; Morris *et al.*, 1991; Lana *et al.*, 1992; Guedes *et al.*, 2002; Diniz *et al.*, 2010; Caldas *et al.*, 2013).

De modo complementar, o modelo cão também foi caracterizado como um bom modelo para estudar a quimioterapia na DC. Guedes *et al.* (2002) mostraram que o tratamento com Bz foi capaz de prevenir a morte e induzir a cura parasitológica em 68,75% dos animais infectados com as cepas

Be-78, Y e Colombiana e tratados na fase aguda, e 38,7% dos crônicos infectados com a cepa Be-78. Esses índices de cura obtidos durante as fases aguda e crônica recente foram semelhantes aos relatados para humanos.

Diante dos dados obtidos por diversos autores, aparentemente o cão atende melhor os requisitos estabelecidos pelo Comitê de Doença de Chagas do Programa Especial de Treinamento e Pesquisa de Doenças Parasitárias da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1984) de um modelo ideal, os quais são: permitir o isolamento do parasito ao longo do curso de infecção; apresentar reações sorológicas positivas indicativas da persistência da infecção; apresentar manifestações clínicas da doença de Chagas crônica; desenvolver miocardite, miosite e outras alterações patológicas que caracterizam a doença; e induzir resposta imune contra tecido do hospedeiro.

Uma vez que a interação entre o parasito e o hospedeiro envolve inúmeros fatores, e que dentre os fatores inerentes ao parasito, o processo de invasão e o desenvolvimento intracelular são importantes para determinar o tropismo tecidual (Andrade *et al.*, 2010). Por outro lado, a resposta imune do hospedeiro tem papel em modular essa infecção ao controlar a carga parasitária, sendo demonstrado em vários estudos a participação da resposta imunológica na resistência à infecção ou na formação de lesões.

Tendo isso em vista, torna-se relevante avaliar as alterações bioquímicas e a resposta imune do hospedeiro frente à infecção experimental com cepas de *T. cruzi* de diferentes DTUs, discriminando a participação das células e citocinas no sangue periférico e inter-relacionando com a lesão cardíaca e assim favorecer a compreensão das manifestações clínicas da DC. De modo complementar, a avaliação dessas mesmas alterações imunopatológicas frente ao tratamento com Benznidazol, torna-se relevante na infecção com cepas do *T. cruzi* que apresentam diferentes graus de susceptibilidade a este fármaco.

3.0. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a infecção experimental de cães por cepas do *T. cruzi* que pertencem a DTUs TcI e TcII e sua resposta ao tratamento com Benznidazol na fase aguda.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar as alterações do perfil bioquímico

Avaliar as alterações do perfil hematológico;

Identificar o fenótipo das células mononucleares do sangue periférico;

Avaliar o padrão de citocinas citoplasmáticas produzidas *in vitro* em cultura de PBMC;

Quantificar o processo inflamatório e a neoformação de colágeno no tecido cardíaco;

Avaliação da eficácia terapêutica.

4.0. Material e Métodos

4.1. Declaração de Ética

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL - COBEA), após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo CEUA nº 2012/14).

4.2. Experimentação animal e protocolo de infecção

Foram utilizados 21 cães sem raça definida, de ambos os sexos (10 machos e 11 fêmeas), nascidos e mantidos no Canil da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto/MG - Brasil. Os filhotes permaneceram com a mãe até o desmame, sendo, nesse período, realizado controle de endo e ectoparasitoses.

Aos 30, 50, 70 e 90 dias de idade os cães foram vacinados, via subcutânea no dorso anterior, com a vacina Vanguard HTLP 5/CV-L (Pfizer Inc., Nova York, EUA), contra Parvovirose, Cinomose, Leptospirose canina, Coronavírus, Adenovírus Tipo 2 e Parainfluenza.

Aproximadamente aos 100 dias de idade, os animais foram inoculados com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal, via intraperitoneal. As formas tripomastigotas foram obtidas de camundongos albinos *Swiss* infectados com as seguintes cepas:

- Cepa Y - *T. cruzi* II (Silva e Nussenzweig, 1953; Zingales *et al.*, 2009), considerada parcialmente resistente ao tratamento com Bz no modelo murino (Filardi e Brener, 1987) e susceptível no modelo canino (Guedes *et al.*, 2002).
- Cepa Colombiana - *T. cruzi* I (Federici *et al.*, 1964; Zingales *et al.*, 2009), considerada resistente ao tratamento com Bz no modelo murino (Filardi e Brener, 1987; Veloso *et al.*, 2001) e canino (Guedes *et al.*, 2002).

Os animais foram agrupados da seguinte forma: Grupo não infectado (NI - n=03); Grupo não infectado e tratado com Bz (NIBz - n=03); Grupo infectado com a cepa Y (Y - n=03); Grupo infectado com a cepa Y e tratado com Bz (YBz - n=04); Grupo infectado com a cepa Colombiana (Col - n=04); Grupo infectado com a cepa Colombiana e tratado com Bz (ColBz - n=04), conforme indicado na Figura 2.

4.3. Esquema do tratamento com Benznidazol

O Benznidazol (Bz) N-benzyl-2-(2-nitroimidazol-1-yl)acetamida - C₁₂H₁₂N₄O₃ foi sintetizado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (Recife-PE, Brasil).

O tratamento com Bz foi ministrado na dose de 7 mg/kg de peso corporal do cão, dividido em duas doses diárias por 45 dias, via oral.

A partir do 10^o dia do inóculo foi coletado, diariamente, cinco µl de sangue da veia marginal da orelha dos animais para a confirmação da infecção. O tratamento com Bz iniciou no primeiro dia em que se observaram formas tripomastigotas no sangue periférico dos animais, determinado pelo exame de sangue a fresco. No grupo não infectado o tratamento com Bz iniciou-se concomitantemente. Após o início do tratamento, a parasitemia foi avaliada até a negatização do exame de sangue a fresco, por cinco dias consecutivos, segundo a metodologia de Brener (1962).

4.4. Coleta de sangue

Os animais foram avaliados em tempos distintos da infecção até a fase crônica da doença (240 dias pós-infecção). Nesse período, houve coleta de sangue de todos os animais, para as seguintes análises: dosagens bioquímicas e hematológicas, imunofenotipagem das células do sangue periférico, dosagem da produção de citocinas por subpopulações de linfócitos e teste imunoenzimático (ELISA) para controle de cura.

Estas coletas foram realizadas, pela manhã por venipunção da jugular, após tricotomia e antissepsia do local com álcool iodado, nos tempos indicados abaixo:

Tempos	Infecção	Tratamento com Bz
“T0”	Antes da infecção	Antes do tratamento
“T1”	9 dias pós-infecção	Antes do tratamento
“T2”	30 dias pós-infecção	15 dias após o início do tratamento com Bz
“T3”	60 dias pós-infecção	45 dias após o início do tratamento, ou seja, no término do tratamento com Bz
“T4”	90 dias pós-infecção	75 dias após o início do tratamento, ou seja, 30 dias pós-término do tratamento com Bz
“T5”	240 dias pós-infecção	225 dias após o início do tratamento, ou seja, 180 dias pós-término do tratamento com Bz

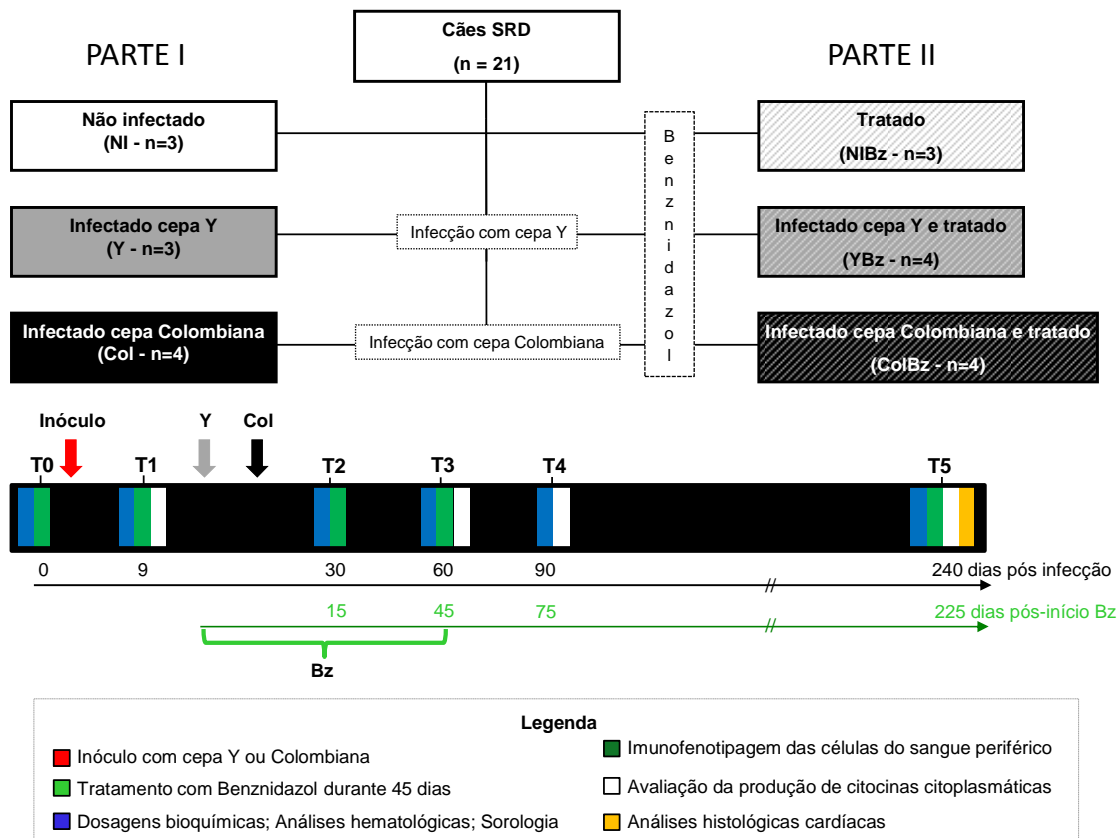


Figura 2. Delineamento experimental: PARTE I - cães sem raça definida (SRD) foram agrupados em NI (Grupo não infectado – n=3), Y (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y/kg, via intraperitoneal – n=3) e Col (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana/kg, via intraperitoneal – n=4). PARTE II – Ao ser detectada parasitemia patente (seta cinza para cepa Y ou seta preta para cepa Colombiana), grupos paralelos foram tratados com 3,5 mg de Benznidazol/kg (duas doses diárias durante 45 dias, por via oral), compondo o grupo NIBz (Grupo tratado com Bz – n=3), YBz (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y/kg, via intraperitoneal, e tratado com Bz – n=4) e ColBz (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas da cepa Colombiana/kg, via intraperitoneal, e tratado com Bz – n=4). Foram avaliadas as alterações bioquímicas, hematológicas e imunológicas no decorrer dos tempos: T0 (antes da infecção); T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz); T2 (30 dias pós-infecção / 15 dias após o início do tratamento com Bz); T3 (60 dias pós-infecção / 45 dias após o início do tratamento com Bz); T4 (90 dias pós-infecção / 75 dias após o início do tratamento); e T5 (240 dias pós-infecção / 225 dias após o início do tratamento com Bz).

4.5. Análises bioquímicas

O sangue coletado em todos os tempos avaliados foi centrifugado a 468 g por 15 min a 18°C para separação do soro, o qual foi utilizado para as análises bioquímicas.

Foram dosadas as enzimas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT - Ref. 108; Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa-MG, Brasil), aspartato aminotransferase (AST - Ref. 109; Labtest Diagnóstica S.A.), gama-glutamil transferase (Ref. 105; Labtest Diagnóstica S.A.) e fosfatase alcalina (Ref. 40; Labtest Diagnóstica S.A.). Para avaliação da função renal foi dosada a substância nitrogenada: ureia (Ref. 104; Labtest Diagnóstica S.A.). A creatina quinase (CK-NAC - Ref. 117; Labtest Diagnóstica S.A.) foi utilizada para avaliar lesões musculares.

Estes parâmetros foram avaliados utilizando o Sistema Bioquímico Automático (CELM SBA-200, Barueri-SP, Brasil) e empregando Kits comerciais do Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa-MG, Brasil), conforme metodologia descrita pelo fabricante.

4.6. Análises hematológicas

O hemograma foi realizado no aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha).

Os esfregaços sanguíneos corados pelo método do Panótico Rápido InstantProv (Newprov Ltda., Pinhais-PR, Brasil) foram avaliados por microscopia óptica em objetiva de imersão para análise dos leucócitos.

4.7. Imunofenotipagem do sangue periférico

Para caracterização do perfil fenotípico das células mononucleares do sangue periférico, 30 µl de sangue total coletado em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram misturados à 50 µl de solução de anticorpo monoclonal anti-canino, específico para marcador de superfície celular conjugado com fluorocromo (Tabela 1), com PBS com 20% de soro fetal bovino (SFB). Após homogeneização, as preparações foram incubadas por 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Em seguida, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2 ml de solução de lise. Após homogeneização, as preparações foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente, e submetidas à centrifugação de 515 g, 10 min a 18° C. O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 3 ml de PBS (pH 7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Numa etapa final, os leucócitos foram fixados com 200 µl de

solução fixadora (10 g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio e 6,67 g/l de cloreto de sódio, pH 7,2).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo utilizados para análise das populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

Anticorpos	Fluorocromo	Catálogo	Fabricante	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD3	FITC	MCA1774	AbD Serotec	Linfócitos T
Anti-CD4	APC	MCA1038	AbD Serotec	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	Alexafluor	MCA1039647	AbD Serotec	Linfócitos T citotóxicos
Anti-B cell	PE	MCA1781	AbD Serotec	Linfócitos B
Anti-CD14	Cy5	MCA1568	AbD Serotec	Monócitos

Posteriormente, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® - Becton Dickinson Co., Franklin Lakes-NJ, EUA). Os dados foram adquiridos com ajuda do programa Cell Quest Software (Becton Dickinson Co.), no qual foram lidos 20.000 eventos. O programa FlowJo® (TreeStar Inc., Ashland-OR, EUA) foi utilizado para a análise dos dados. Por exemplo, para seleção da população de linfócitos, em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC – “Forward Scatter”) versus granulosidade (SSC – “Side Scatter”) foi estabelecida a população celular de interesse (R1), conforme Figura 3.

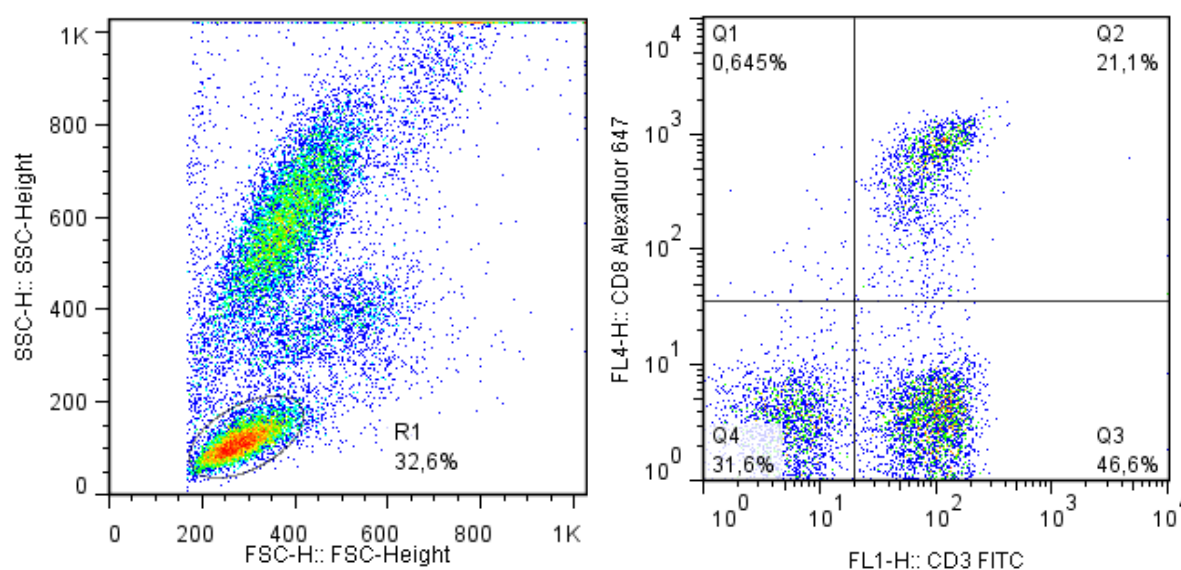


Figura 3. Análise da imunofenotipagem do sangue periférico para separação das populações de linfócitos. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL4 utilizado para quantificar o percentual de células (Q2) (Programa FlowJo®).

4.8. Avaliação da produção de citocinas citoplasmáticas após estimulação celular *in vitro* induzida por antígenos solúveis da forma epimastigota do *T. cruzi*

4.8.1. Preparo do extrato antigênico

4.8.1.1. Cultura das formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*

Foi realizada a coleta de sangue periférico de camundongos Swiss no 7º e 14º dia pós inóculo, respectivamente. Estes dias correspondem ao pico de parasitemia destas cepas, o que favorece a obtenção do maior número de formas tripomastigotas sanguíneas.

O sangue com as formas tripomastigotas foi incubado em meio de cultura "Liver Infusion Tryptose" (LIT), por 7 dias, em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (do inglês "Biochemical Oxygen Demand" - B.O.D. – Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil) a temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, a fim de se obter as formas epimastigotas do *T. cruzi* das cepas Y e Colombiana (EPI).

Após constatação da viabilidade celular e da ausência de agentes contaminantes, as formas epimastigotas, na fase estacionária de crescimento, foram recuperadas por centrifugação a 1811 g, durante 15 min a 4°C e submetidas a três lavagens com tampão fosfato salino, pH 7,2 a 7,4.

4.8.1.2. Extrato antigênico

Para obtenção do antígeno (Ag) solúvel, os parasitos foram submetidos a três processos de sonicação durante 1 min e 30 seg a 24 watts em banho de gelo, utilizando-se o ultrassom (Sonifier Cell Disruptor® - Branson Sonic Power Co., Danbury-CT, EUA). Posteriormente, o material sonicado foi centrifugado a 18.500 rpm, durante 90 min a 4°C . O sobrenadante foi dialisado em quatro trocas de PBS, durante 36 horas a 4°C e, em seguida, esterilizado por filtração em membrana de $0,22 \mu\text{m}$. A quantificação do conteúdo proteico resultante da preparação do Ag solúvel de EPI foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). A preparação antigênica foi conservada a -80°C em alíquotas até o momento de uso.

4.8.2. Cultura de células mononucleares do sangue periférico

Para identificação das citocinas citoplasmáticas, amostras de sangue periférico coletadas em tubos estéreis contendo heparina sódica, tal como descrito por Leal *et al.* (2014), alíquotas de 1000 μl foram adicionadas a 2 tubos de polipropileno de 14 ml (Becton Dickinson Co.), correspondentes às culturas controle ou estimulada com Ag solúvel de EPI, obtido conforme descrito no item 4.8.1.

A cultura controle recebeu 1000 µl de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco® - Life Technologies Co., Grand Island, NY, EUA) e foi incubada por 12 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente adicionou 20 µL de Brefeldina-A (BFA - Sigma-Aldrich Co.) na concentração de 10 µg/ml, incubada por 4 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Utiliza-se a BFA para inibir a secreção da citocina, mantendo-a no interior da célula.

A cultura estimulada foi previamente incubada, por 12 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C, na presença de 1000 µl de solução RPMI com Ag solúvel de EPI, na concentração final de 25 µg/ml. Após o período de incubação, foram adicionados 20 µl de BFA, na concentração de 10 µg/ml e a cultura re-incubada por 4 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Salientando que as culturas foram estimuladas com antígenos correspondentes a cepa infectante dos animais, desta forma, amostras dos cães infectados com a cepa Y foram estimuladas com EPI da cepa Y, tal como, amostras dos animais infectados com a cepa Colombiana foram estimuladas com EPI da cepa Colombiana. Por outro lado, amostra dos animais não infectados receberam EPI tanto da cepa Y quanto da Colombiana.

Ao término do período de incubação, as culturas foram tratadas com 220 µl EDTA (Sigma-Aldrich Co.), na concentração final de 2 mM, e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Este procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 6 ml de tampão de lavagem - PBS-W (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina - BSA e 0,1% de azida sódica), e centrifugadas a 340 g durante 7 min a 18°C.

Subsequentemente, foram identificadas as populações celulares através da marcação de moléculas de superfície específicas. Para tanto, 500 µl da suspensão celular foram adicionados em tubos contendo 20 µl de anticorpo monoclonal anti-CD4 ou anti-CD8 (fluorocromo FITC). As amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a etapa da identificação das populações celulares, procedeu-se à lise dos eritrócitos e à fixação dos leucócitos pelo tratamento com 3 ml de solução de lise por 10 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a fixação, a suspensão de leucócitos foi centrifugada a 340 g durante 7 min a 18°C, o sobrenadante descartado e as células permeabilizadas com 3 ml de solução de PBS-P (PBS-W e 0,5% de saponina – Sigma Aldrich Co.), por 10 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a permeabilização, as suspensões de leucócitos foram centrifugadas a 340 g durante 7 min e o sobrenadante descartado.

As células ressuspensas foram plaqueadas em placas de 96 poços e fundo em “U” (Thomas 9383-A90) para marcação das citocinas intracitoplasmáticas realizada com anticorpo anti-IFN γ ou anti-IL-4, bovino conjugados com o fluorocromo ficoeritrina (PE), que reagem com citocinas caninas (AbD Serotec), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo utilizados para análise das citocinas intracitoplasmáticas em subpopulações leucocitárias

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Marcador
Anti-IFN- γ	PE	CC302	AbD Serotec	Citocina
Anti-IL4	PE	CC303	AbD Serotec	Citocina

Após a incubação, as células foram lavadas com 100 μ l de PBS-P e, em seguida, com 200 μ l de PBS-W. As preparações celulares foram então fixadas em 200 μ l de solução fixadora e estocadas a 4°C ao abrigo da luz até leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur® - Becton Dickinson Co.). Os dados foram adquiridos com ajuda do programa Cell Quest (Becton Dickinson Co.), no qual foram lidos 30.000 eventos.

A produção de citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi mensurada através da análise com o programa FlowJo® (TreeStar Inc.), em gráficos de distribuição pontual de granulosidade (SSC) versus FL1 para selecionar a população celular de interesse (R1 - gate CD4⁺ ou CD8⁺). Após a seleção da R1, a frequência de subpopulações celulares produtoras de citocinas, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL2 versus FL1 (Figura 4).

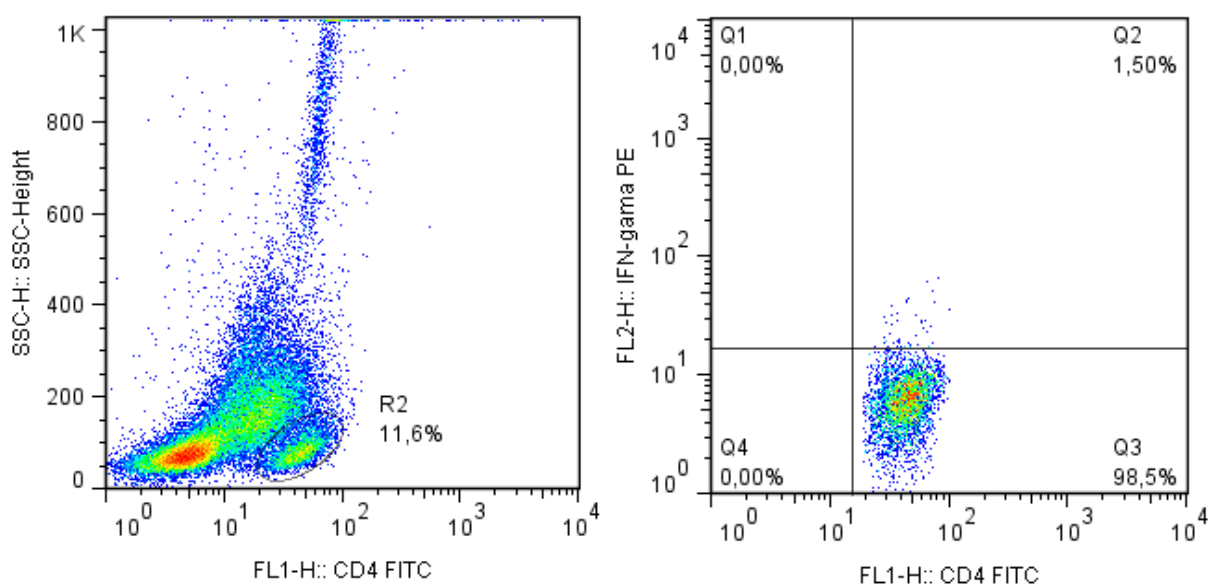


Figura 4. Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. (A) Gráfico de distribuição pontual SSC versus FL1 (CD4 ou CD8) utilizado para a seleção da população de linfócitos (R2). (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual de células produtoras de citocinas em R2 (Q2).

Os resultados de citocinas citoplasmáticas foram expressos como índice, calculado como: média da percentagem de células positivas da cultura estimulada dividida pela média da percentagem de células positivas da cultura não estimulada.

4.9. Avaliação histológica

A eutanásia dos cães foi realizada com injeção de 0,5 ml/kg de peso corporal de Thionembatal[®] (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo-SP, Brasil), com 0,03 g/ml de Tiopental sódico (Cristália Ltda., São Paulo-SP, Brasil) em solução salina 0,8%, por via endovenosa.

Fragmentos do átrio direito foram coletados para análise histopatológica das alterações inflamatórias e do processo de reparo cardíaco. Os fragmentos cardíacos foram fixados em formol 10%, tamponado em tampão fosfato (pH 7,2), desidratados em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100%), diafanizados em dois banhos de xilol e embebidos em parafina. Após o processamento, as amostras foram incluídas em parafina e submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos com espessura de quatro µm para coloração.

4.9.1. Colorações

A coloração pela Hematoxilina e Eosina (H&E) foi utilizada para análise rotineira das alterações histológicas, incluindo a quantificação do processo inflamatório. Os cortes desparafinados e hidratados foram corados pela Hematoxilina, após serem lavados em água corrente para retirada do excesso do corante, foram contra corados pela Eosina, lavados em água corrente, desidratados e montados com lamínula e Entellan[®] (Merck KGaA, Darmstadt - Alemanha).

A coloração pelo Tricrômico de Masson foi utilizada para a avaliação da neoformação de colágeno. As lâminas foram desparafinadas e hidratadas, imersas no corante Sudam III/Fucsina, seguido por diferenciação em solução de ácido Fosfotúngstico/Fosfomolibdico e contra coloração pela solução de Azul de Anilina. Entre cada uma dessas etapas as lâminas foram lavadas em água corrente. Posteriormente, foram desidratadas em álcool e montadas com lamínula e Entellan[®] (Merck).

4.9.2. Análise morfométrica

Para realizar a captura das imagens, foi utilizado o microscópio Leica DM5000B (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove-IL, USA) acoplado a uma microcâmera digital Leica, interligados a um computador com o software Leica Application Suíte (Versão 2.4.0 RI). Dessa forma, as imagens foram digitalizadas e processadas através do software Leica QWin V3.

Para estabelecer o número mínimo de imagens (campos) microscópicas representativas por amostra foram realizadas análises em 50 campos aleatórios, determinados por sorteio com reposição sendo compostos subgrupos com 10, 15, 20, 30, 40 e 50 campos. Após cálculo da média e o desvio

padrão, o número mínimo representativo de campos microscópicos foi obtido a partir do momento em que o aumento no número de campos não alterava consideravelmente na redução do respectivo valor do desvio.

4.9.2.1. Análise da infiltração inflamatória cardíaca

Nas lâminas coradas pela H&E, visualizadas com a objetiva de 40x, foram digitalizadas as imagens de 20 campos aleatórios (área total de $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) para quantificar o número médio de núcleos celulares presentes no miocárdio, com o objetivo de quantificar o infiltrado inflamatório cardíaco.

4.9.2.2. Análise da área de colágeno cardíaca

As lâminas coradas por Tricrômico de Masson, que distingue as fibras colágenas em cor azul e as fibras musculares em tons avermelhados, foram digitalizadas e analisadas semi-automaticamente utilizando-se a função de segmentação de imagens. Logo, todos os pixels com tons azuis foram selecionados para a criação de uma imagem binária e posterior cálculo da área total ocupada por colágeno. Este mesmo procedimento foi usado para quantificar a área cardíaca ocupada por tecido muscular e adiposo, com a seleção dos pixels em vermelho e branco, respectivamente. Consequentemente, a soma das áreas de colágeno, de músculo e de tecido adiposo corresponde à área total de cada campo avaliado. Nos gráficos foi mostrada a área média de colágeno em cada grupo experimental.

4.10. Análise do Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (ELISA)

A avaliação da eficácia terapêutica do tratamento com Bz foi feita apenas por dosagem de anticorpos IgG anti *-T. cruzi*. Optou-se por se fazer apesar esta avaliação por ser a negatificação da sorologia o parâmetro que mais demora a acontecer entre os demais parâmetros utilizados no critério de cura clássico (Cançado, 2002; WHO, 2002) e de mais difícil obtenção (sororeversão).

A reação de ELISA foi realizada utilizando-se Ag obtido de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* mantidas em meio LIT. Para isto, os parasitos foram isolados na fase exponencial de crescimento, tratados com solução de NaOH 0,15 M em banho de gelo durante 18 horas (Vitor e Chiari, 1987). O Ag obtido foi dosado pelo método de Lowry (1951) e conservado a -20°C , até o momento do uso.

O teste de ELISA foi realizado conforme Voller *et al.* (1976), com amostras dos soros na diluição correspondente a 1:80, Ag na concentração de $4,5 \mu\text{g/ml}$ e conjugado de anti-imunoglobulina de cão da classe IgG.

Em microplacas de 96 poços de fundo chato de poliestireno foram realizadas as reações, sendo as placas sensibilizadas com 100µl/poço de Ag diluído em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas por 18 a 24 horas em geladeira. Após a sensibilização, o excesso da solução antigênica foi removido das microplacas, por uma série de quatro lavagens com solução de lavagem (PBS-Tween 0,05%).

Em seguida as microplacas foram bloqueadas com 100µl/poços de solução PBS com soro fetal bovino, incubadas em estufa por 30 min a 37°C, e posteriormente lavadas com solução de lavagem quatro vezes.

Subsequentemente, as placas foram incubadas com 100 µl/poços de soro diluído 1:80 durante 45 min a 37°C, seguido por quatro lavagens com solução de lavagem. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 45 min a 37°C com 100 µl/poços do conjugado anti-IgG e diluído em PBS-Tween 0,05%. Ao término da incubação as placas foram lavadas novamente quatro vezes.

Posteriormente foram adicionadas às placas 100 µl/poços de solução de substrato (3 mg de Orto-fenileno-diamino [OPD] + 3 µl de H₂O₂ vol. 30 + 15 ml de tampão citrato-fosfato). Estas placas foram incubadas a 37°C por 15 min. A reação foi interrompida com a adição de 32 µl/poços de H₂SO₄ 2,5M.

A leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA (SOFT-MAX[®] PRO 4.0 – Life Sciences edition) com filtro de 490 nm. As amostras de soro com valores de absorbância iguais ou superiores ao ponto de corte ou *cut-off* (média das absorbâncias de 10 soros padrões não reativos + 2 desvios padrão) foram consideradas positivas.

Para análise dos resultados, foi considerada sororeversão quando observada negativação dos testes nos tempos T4 e T5, bem como, a queda do título de anticorpos, considerando que a sorologia convencional pode permanecer positiva mesmo após um tratamento bem-sucedido (Krettli, 2009).

4.11. Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine-CA, EUA) utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) One Way seguido pelo teste de Tukey, para comparar os grupos. Para análise da ELISA utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon.

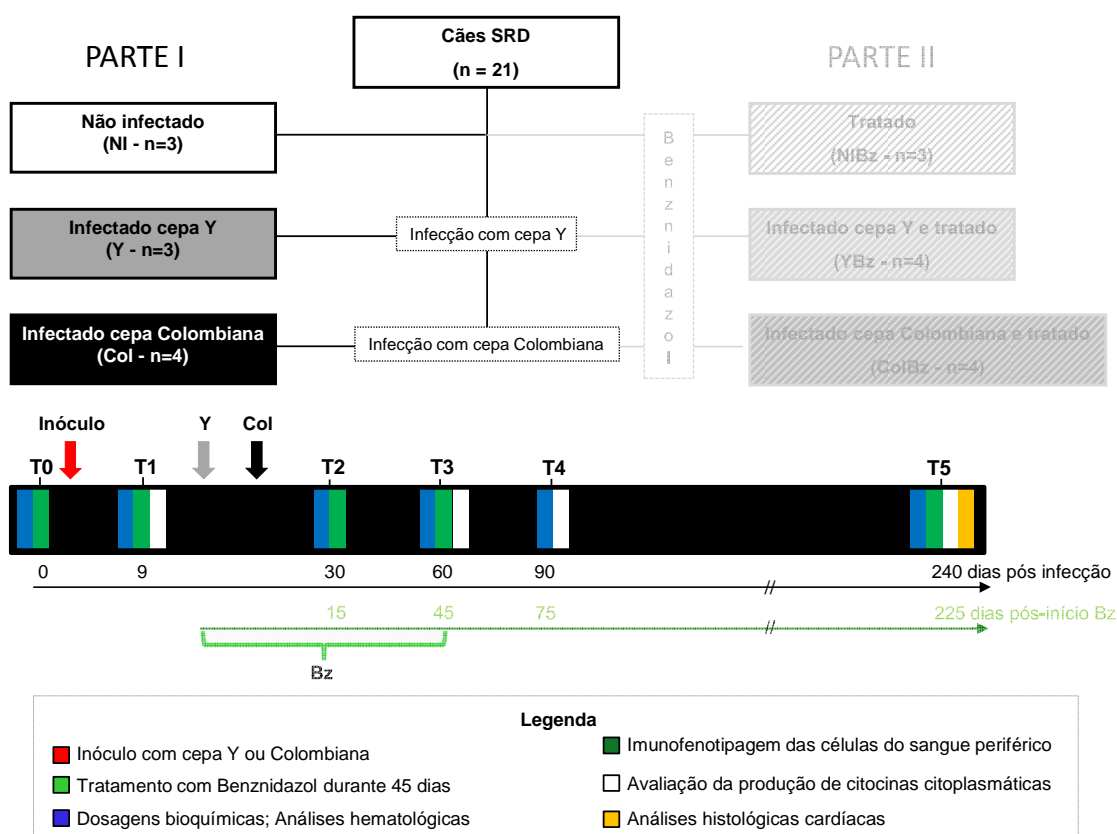
Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$.

Apresentação dos resultados

Os resultados estão apresentados em duas partes. A primeira parte aborda o papel da infecção com cepas de diferentes DTUs e a segunda, a eficácia do tratamento etiológico com o Benznidazol.

PARTE I

INFEÇÃO PELA CEPA Y (TcII) OU COLOMBIANA (TcI) DO *Trypanosoma cruzi*



Delineamento experimental: PARTE I - cães sem raça definida (SRD) foram agrupados em NI (Grupo não infectado – n=3), Y (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y/kg, via intraperitoneal – n=3) e Col (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana/kg, via intraperitoneal – n=4). Foram avaliadas as alterações bioquímicas, hematológicas e imunológicas no decorrer dos tempos: T0 (antes da infecção); T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz); T2 (30 dias pós-infecção / 15 dias após o início do tratamento com Bz); T3 (60 dias pós-infecção / 45 dias após o início do tratamento com Bz); T4 (90 dias pós-infecção / 75 dias após o início do tratamento com Bz); e T5 (240 dias pós-infecção / 225 dias após o início do tratamento com Bz).

5.1. Avaliação da parasitemia no sangue periférico dos cães infectados pela cepa Y (TclI) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

Após a infecção, o exame de sangue a fresco foi realizado diariamente para detectar as formas tripomastigotas sanguíneas. O grupo infectado com a cepa Y do *T. cruzi* (TclI) apresentou período pré-patente de 10 dias. O período patente ocorreu entre o 11^o e o 21^o d.p.i., e o pico de parasitemia ocorreu no 15^o d.p.i., com média do pico de parasitemia de 3.000 formas tripomastigotas / 0,1 ml de sangue (Tabela 3).

No grupo infectado com a cepa Colombiana (Tcl) o período pré-patente foi de 20 dias e o período patente ocorreu entre o 21^o e o 38^o d.p.i.. O pico de parasitemia ocorreu no 33^o d.p.i., e a média do pico de parasitemia deste grupo foi 7.800 formas tripomastigotas / 0,1 ml de sangue (Tabela 3).

A taxa de sobrevivência foi de 100% em todos os grupos experimentais.

Tabela 3. Valores da parasitemia no sangue periférico de cães infectados com as cepas Y ou Colombiana do *Trypanosoma cruzi*.

Grupo	Período pré-patente (d.p.i.)	Período patente (d.p.i.)	Dia do pico de parasitemia	Pico de parasitemia (nº/0,1 ml de sangue)
Y (n=03)	0-10	11-21	15	3.000
Col (n=04)	0-20	21-38	33	7.800

Y, infectado com a cepa Y; Col, Infectado com a cepa Colombiana.

5.2. Avaliações bioquímicas nos cães infectados pela cepa Y (TclI) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

Os resultados observados neste trabalho demonstraram aumento significativo na dosagem sérica de alguns analitos, comparado aos valores de referência. Esta faixa de referência foi calculada pela avaliação de todos os cães antes da infecção, somando-se ou subtraindo-se o valor de dois desvios padrões ao valor da média (média \pm 2SD) para cada analito, identificada nos gráficos como linhas pontilhadas.

A avaliação das enzimas hepáticas no grupo NI revelou diminuição significativa nos níveis de fosfatase alcalina em T4 comparado a T0, bem como em T5 em relação a T0, T1 e T2 (Figura 5 D).

No grupo de cães infectados pela cepa Y foi observado aumento significativo de ALT em T1 e T2 em relação à T0, bem como, em T2 comparado ao grupo NI (Figura 5 A). Neste mesmo grupo foi observado aumento significativo de AST em T1 comparado a T0. Posteriormente os níveis dessa enzima voltaram ao normal em T2, T3 e T5 (Figura 5 B). Por outro lado, foi observada também redução significativa no nível sérico de fosfatase alcalina em T2, T3, T4 e T5 em comparação a T0 e T1. Em T5 também houve diminuição na quantidade desta enzima comparado a T2 (Figura 5 D).

No grupo infectado pela cepa Colombiana o aumento significativo de ALT ocorreu apenas em T1 quando comparado a T0 (Figura 5 A). Neste mesmo grupo foi observada redução significativa no nível sérico de fosfatase alcalina em T2, T3, T4 e T5 em comparação a T0 e T1, sendo que em T5 houve diminuição na quantidade desta enzima também quando comparado a T2 e T3 (Figura 5 D). No grupo Colombiana foi observado níveis séricos aumentados de ureia em T4 comparado a T0, T1, T3 e T5, (Figura 5 E).

Os níveis séricos de gama-GT e CK-NAC não apresentaram diferença significativa nos grupos experimentais avaliados (Figura 5 C e F).

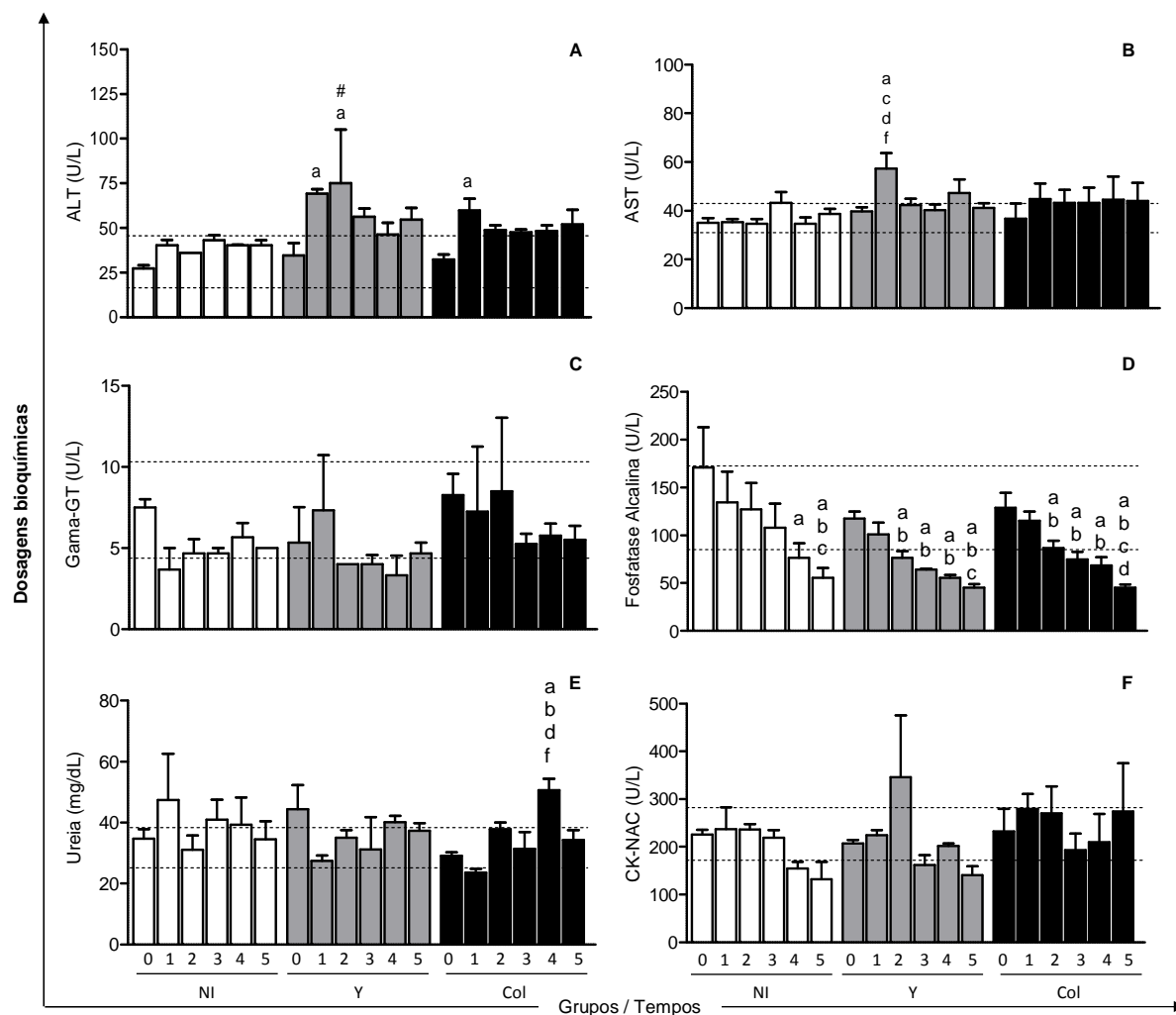


Figura 5. Dosagem da alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B), gama-glutamil transferase (C), fosfatase alcalina (D), ureia (E) e creatina quinase (CK-NAC) (F) no soro dos animais não infectados (NI; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (Y; barra cinza) ou da cepa Colombiana (Col; barra preta) do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados expressam os valores das médias da dosagem do analito \pm erro padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$ apontadas como “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” para comparação com os tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção), T2 (30 dias pós-infecção), T3 (60 dias pós-infecção), T4 (90 dias pós-infecção) e T5 (240 dias pós-infecção), respectivamente. O símbolo “#” indica diferenças entre o grupo NI e os grupos infectados (Y ou Col). A linha tracejada indica Média \pm dois Desvios padrões para todos os animais em T0, como valor de referência.

5.3. Avaliação hematológica nos cães infectados pela cepa Y (Tcll) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

No grupo NI foi observado aumento significativo na quantidade de hemoglobina em T5 comparado a T0.

No grupo de cães infectados pela cepa Y foi observado aumento significativo na quantidade de hemoglobina em T5 comparado a T0. Por outro lado, nesse mesmo grupo foi observada redução da quantidade de plaquetas no sangue periférico em T1 em relação a T0.

No grupo de cães infectados pela cepa Col foi observado aumento nos valores de eritrócito e hematócrito em T2, T4 e T5 quando comparado a T0. Houve também aumento da hemoglobina nesse mesmo grupo em T2, T3, T4 e T5 comparado a T0 (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da série vermelha do hemograma no sangue periférico de cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do *Trypanosoma cruzi*.

Quantificação das células da série vermelha						
		Eritrócitos (10 ¹² /L)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Plaquetas (10 ⁹ /L)	
Valor de Referência		5.0–6.6	12.2–15.5	32.1–39.5	129.5–379.5	
NI	T0	5.9 ± 0.1	14.3 ± 0.3	35.8 ± 1.2	262.7 ± 40.8	
	T1	6.0 ± 0.5	15.3 ± 2.1	38.7 ± 3.8	191.7 ± 125.0	
	T2	6.5 ± 0.4	16.5 ± 1.6	40.8 ± 4.7	219.7 ± 76.2	
	T3	6.6 ± 0.1	16.6 ± 0.9	38.6 ± 0.6	206.3 ± 38.9	
	T4	6.8 ± 0.2	16.6 ± 0.3	41.8 ± 1.0	249.0 ± 48.7	
	T5	6.9 ± 0.1	17.5 ± 0.1 ^a	42.5 ± 1.6	195.3 ± 11.8	
Y	T0	6.1 ± 0.4	14.5 ± 0.7	37.7 ± 1.9	290.3 ± 96.4	
	T1	5.9 ± 0.6	14.2 ± 1.0	35.9 ± 2.1	90.3 ± 54.7 ^a	
	T2	6.3 ± 0.7	15.4 ± 1.9	38.8 ± 4.9	217.3 ± 33.6	
	T3	7.1 ± 0.9	16.8 ± 2.9	43.9 ± 7.5	249.3 ± 58.9	
	T4	6.4 ± 0.2	15.4 ± 0.5	37.4 ± 1.4	233.0 ± 60.0	
	T5	7.2 ± 0.4	17.6 ± 0.2 ^a	43.3 ± 1.8	277.3 ± 76.2	
Col	T0	5.6 ± 0.3	13.3 ± 0.6	34.5 ± 1.1	221.5 ± 40.0	
	T1	5.7 ± 0.4	13.5 ± 0.5	35.5 ± 1.4	245.3 ± 10.4	
	T2	6.7 ± 0.5 ^a	16.7 ± 1.3 ^a	41.6 ± 3.1 ^a	147.5 ± 52.5	
	T3	6.5 ± 0.4	16.3 ± 0.4 ^a	38.0 ± 2.8	155.8 ± 35.1	
	T4	7.3 ± 0.6 ^a	17.4 ± 1.5 ^a	43.5 ± 4.9 ^a	174.3 ± 56.2	
	T5	7.4 ± 1.0 ^a	18.2 ± 2.8 ^a	43.9 ± 6.4 ^a	146.8 ± 25.6	

NI, não infectado; Y, infectado com a cepa Y; Col, Infectado com a cepa Colombiana.

As letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” representam a comparação com os tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção), T2 (30 dias pós-infecção), T3 (60 dias pós-infecção), T4 (90 dias pós-infecção) e T5 (240 dias pós-infecção), respectivamente. Valor de referência (Média ± 2 Desvios padrões) para todos os animais em T0.

Em relação ao leucograma foi observada, no grupo de cães infectados com a cepa Y, redução significativa no número de leucócitos no sangue periférico em T1 comparado a T0. Além disso, foi observada diminuição significativa na quantidade de monócitos em T1 e em T5 comparado a T0.

No grupo de cães infectados com a cepa Col foi observado diminuição significativa na quantidade de monócitos em T4 comparado a T0 (Tabela 5).

Tabela 5. Valores do leucograma do sangue periférico de cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do *Trypanosoma cruzi*.

Quantificação das células da série branca					
		Leucócito (mm ³)	Linfócito (mm ³)	Neutrófilo (mm ³)	Monócito (mm ³)
Valor de Referência		8100 - 20500	2232 - 8779	99 - 15056	291 - 913
NI	T0	11600 ± 2425	5413 ± 1711	5180 ± 919	497 ± 57
	T1	9633 ± 1762	4207 ± 1548	5178 ± 647	302 ± 178
	T2	11767 ± 3650	5216 ± 2419	5792 ± 1348	489 ± 231
	T3	13000 ± 1652	5313 ± 1568	7021 ± 522	211 ± 113
	T4	13266 ± 1379	4410 ± 1590	7705 ± 359	529 ± 141
	T5	11467 ± 2324	3893 ± 774	6589 ± 1450	567 ± 216
Y	T0	14800 ± 888	5116 ± 1941	7932 ± 2308	790 ± 108
	T1	6300 ± 916 ^a	2224 ± 973	3647 ± 15	231 ± 55 ^a
	T2	14700 ± 3158	6652 ± 2354	6519 ± 714	735 ± 157
	T3	13033 ± 305	5344 ± 1181	6911 ± 1171	475 ± 189
	T4	13533 ± 2470	4550 ± 1404	8119 ± 1375	465 ± 282
	T5	11167 ± 2281	3802 ± 713	6811 ± 1390	359 ± 238 ^a
Col	T0	15950 ± 3634	5891 ± 1819	9131 ± 5352	541 ± 104
	T1	12975 ± 1072	4894 ± 1012	7110 ± 1532	487 ± 181
	T2	11650 ± 4084	5567 ± 2284	5231 ± 1922	545 ± 140
	T3	13550 ± 4047	5970 ± 927	6990 ± 3654	306 ± 115
	T4	12350 ± 1701	3936 ± 1208	7730 ± 2876	232 ± 141 ^a
	T5	11875 ± 3594	3213 ± 869	7824 ± 2853	429 ± 164

NI, não infectado; Y, infectado com a cepa Y; Col, Infectado com a cepa Colombiana.

As letras "a", "b", "c", "d", "e", "f" representam a comparação com os tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção), T2 (30 dias pós-infecção), T3 (60 dias pós-infecção), T4 (90 dias pós-infecção) e T5 (240 dias pós-infecção), respectivamente.

Valor de referência (Média ± 2 Desvios padrões) para todos os animais em T0.

5.4. Fenótipo das células mononucleares do sangue periférico dos cães infectados pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

A imunofenotipagem das células mononucleares do sangue periférico mostrou, no grupo Y, redução significativa no número de linfócitos T CD4⁺ em T1 comparado a T0, voltando à normalidade a partir de T3 (Figura 6 A). Por outro lado, houve aumento significativo no número de linfócitos T CD8⁺ em T2 comparado a T0 e T1, bem como neste mesmo tempo, houve aumento significativo em relação aos grupos NI e Col (Figura 6 B). No grupo Y foi observada diminuição significativa na quantidade de linfócitos B a partir de T1 e esta redução manteve-se até o último tempo avaliado. Por outro lado, o número de monócitos CD14⁺ foi extremamente variável no grupo Y, diminuiu significativamente em T1 comparado a T0, mas posteriormente aumentou em T2 em relação aos tempos T1, e T5 (Figura 6 D).

No grupo Col foi observada diminuição significativa na quantidade de linfócitos B progressivamente entre T0 e T2, permanecendo essa redução até T5 (Figura 6 C), não sendo observadas alterações significativas no número de linfócitos T CD4⁺ (Figura 6 A), T CD8⁺ (Figura 6 B) e monócitos CD14⁺ (Figura 6 D) neste grupo experimental.

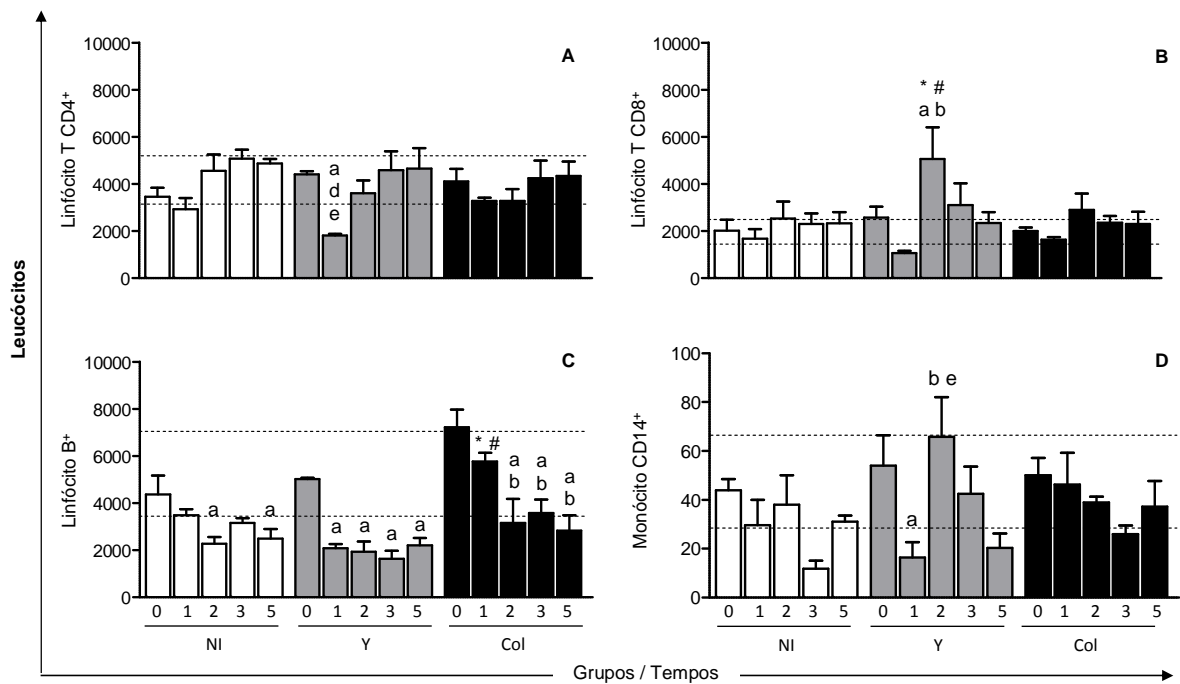


Figura 6. Análise da imunofenotipagem dos linfócitos T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (B), B (C), e monócitos CD14⁺ (D) no sangue periférico de animais não infectados (NI; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (Y; barra cinza) ou da cepa Colombiana (Col; barra preta) do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados expressam a média da contagem absoluta de células \pm erro padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$ apontadas como “a”, “b”, “c”, “d”, “e” para comparação com os tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção), T2 (30 dias pós-infecção), T3 (60 dias pós-infecção), e T5 (240 dias pós-infecção), respectivamente. O símbolo “#” indica diferenças entre o grupo NI e os grupos infectados (Y ou Col), e o símbolo “*” indica diferenças entre os grupos Y e Col. A linha tracejada indica Média \pm dois Desvios padrões para todos os animais em T0, como valor de referência.

5.5. Avaliação das citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos T na infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

A avaliação das citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi realizada na presença de estímulo com antígeno de formas epimastigotas das cepas Y ou Colombiana.

Após o estímulo das PBMCs do grupo NI, tanto com antígeno de EPI da cepa Y quanto da cepa Colombiana, não foi observada nenhuma diferença significativa, ou seja, o antígeno não foi capaz de estimular a produção das citocinas IFN- γ ou IL-4 pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos animais não infectados.

No grupo Y foi observado aumento significativo na quantidade de IFN- γ produzido por linfócitos T CD4⁺ em T3 e T5 quando comparado a T1 (Figura 7 A), ademais houve aumento significativo na produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ em T5 comparado a T1, T3, e ao grupo NI neste mesmo tempo (Figura 7 C). No grupo Y, a produção de IL-4 por linfócitos T CD8⁺ aumentou significativamente em T5 comparado à T1, T4 e ao grupo NI neste mesmo tempo (Figura 7 D).

No grupo Col houve aumento significativo na produção apenas de IL-4 por linfócitos T CD8⁺ em relação ao grupo NI em T4 (Figura 7 H).

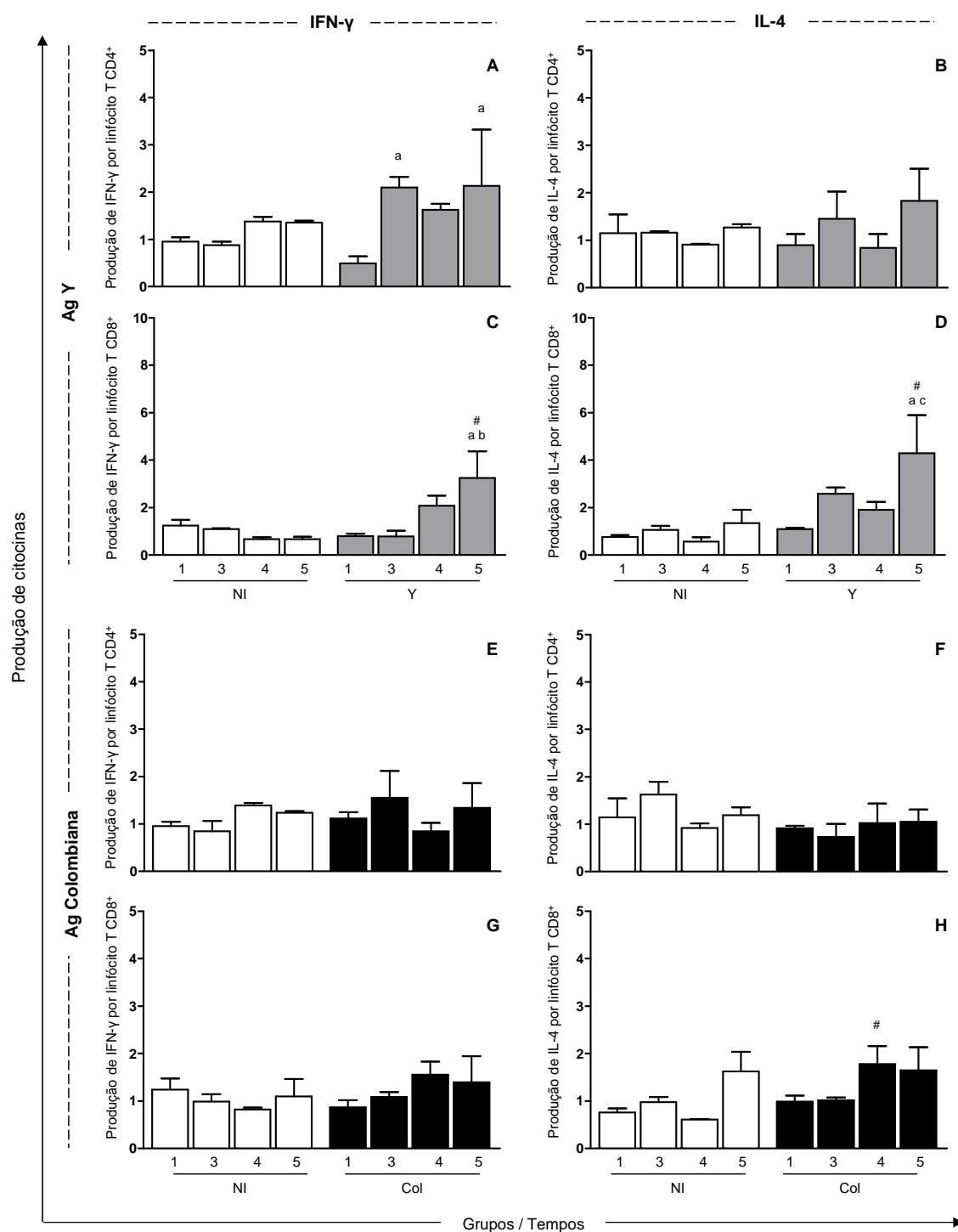


Figura 7. Produção de citocinas (IFN- γ e IL-4) por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico de animais não infectados (NI; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (Y; barra cinza) ou da cepa Colombiana (Col; barra preta) do *Trypanosoma cruzi*. Figuras A, B, C e D: razão da citocina produzida por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ em cultura estimulada com antígeno de epimastigota da cepa Y. Figuras E, F, G e H: razão da citocina produzida por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ em cultura estimulada com antígeno de epimastigota da cepa Colombiana. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$ apontadas como “a”, “b”, “c”, “d” para comparação com os tempos T1 (09 dias pós-infecção), T3 (60 dias pós-infecção), T4 (90 dias pós-infecção), e T5 (240 dias pós-infecção), respectivamente. O símbolo “#” indica diferenças entre o grupo NI e os grupos infectados (Y ou Col).

5.6. Quantificação do processo inflamatório e da neoformação de colágeno no coração de cães infectados com a cepa Y (TclI) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

A infecção por ambas as cepas de *T. cruzi* Y e Colombiana favoreceu a migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco, sendo observado infiltrado inflamatório focal composto predominantemente por células mononucleares no átrio direito (Figura 8).

No grupo Y foi observado aumento significativo no número de células no miocárdio em comparação ao grupo NI, bem como, aumento significativo na área de colágeno em comparação aos grupos NI e Colombiana, sendo a fibrose classificada como moderada.

No grupo Col foi observado aumento significativo no número de células no miocárdio em comparação ao grupo NI. Todavia, nesse grupo, não foi observada alteração significativa na área de colágeno em comparação aos demais grupos.

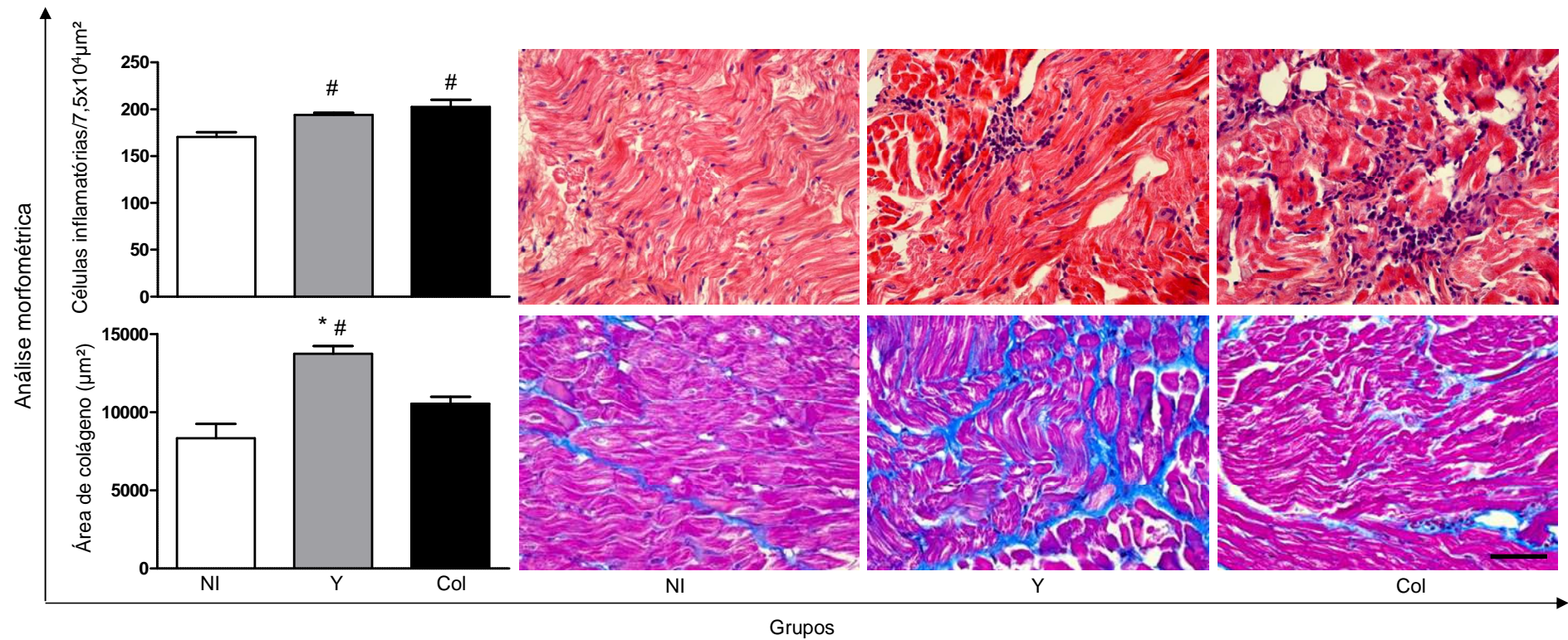


Figura 8. Número de células inflamatórias (coloração H&E) e área de colágeno (coloração Tricrômico de Masson) no átrio direito dos animais não infectados (NI; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (Y; barra cinza) ou da cepa Colombiana (Col; barra preta) do *Trypanosoma cruzi*. A quantificação aos 240 dias pós-infecção (T5) foi expressa como média do número de células ou área de colágeno \pm erro padrão. O símbolo “#” indica diferenças entre o grupo NI e os grupos infectados (Y ou Col), e o símbolo “*” indica diferenças entre os grupos Y e Col. Barra=50 μm .

5.7. Dosagem dos níveis séricos de IgG nos cães infectados com a cepa Y (TcII) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

Os resultados da cinética da dosagem sérica da imunoglobulina IgG-anti *T. cruzi* de cada animal componente dos grupos NI, e infectados pelas cepas Y e Col de *T. cruzi* estão expressos na Tabela 6. As absorvâncias em negrito apontam os resultados com valores iguais ou superiores a linha de corte, sendo então considerados como sorologia positiva.

No grupo NI todos os animais apresentaram sorologia negativa em todos os tempos avaliados.

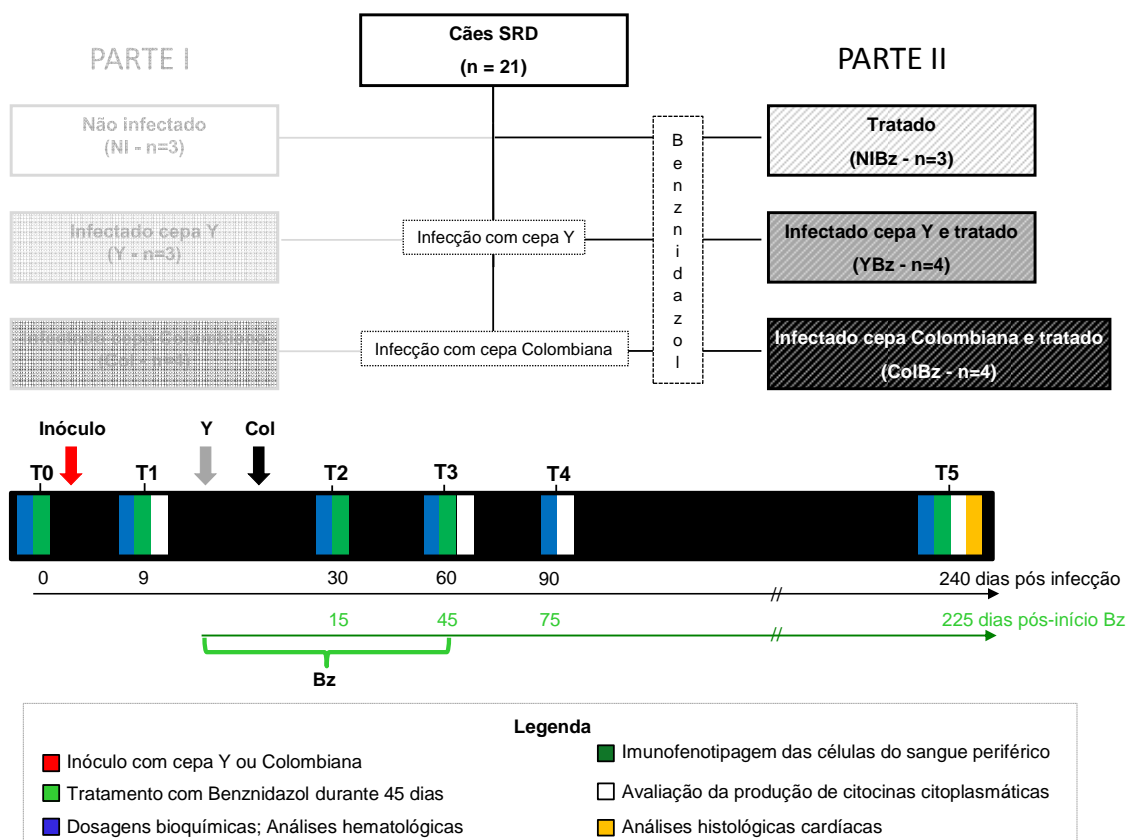
Os animais dos grupos infectados com as cepas Y e Col apresentaram soroconversão entre o T1 (100% sorologia negativa) e o T2 (100% sorologia positiva), e posteriormente a sorologia manteve-se positiva até o T5 (240^o d.p.i.).

Tabela 6. Cinética da dosagem sérica de IgG-anti *T. cruzi* em cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do *Trypanosoma cruzi*.

		Dosagem sérica de IgG-anti <i>T. cruzi</i>					
		T0	T1	T2	T3	T4	T5
NI	Cão 03	0,6	0,8	0,6	0,7	0,7	0,6
	Cão 12	0,7	0,5	0,7	1,2	0,7	0,7
	Cão 22	1,2	1,0	0,6	0,5	0,5	0,5
Y	Cão 04	0,7	0,7	3,8	4,2	4,2	3,7
	Cão 16	0,4	0,5	1,9	2,4	3,8	4,7
	Cão 17	1,0	0,5	2,9	3,8	4,2	4,8
C	Cão 01	0,3	0,3	2,7	2,9	3,3	4,0
	Cão 11	0,5	0,8	3,4	3,4	4,0	4,1
	Cão 19	1,3	0,8	3,6	4,1	4,5	3,7
	Cão 21	1,2	0,7	4,8	5,1	4,1	3,2

NI, não infectado; Y, infectado com a cepa Y; Col, Infectado com a cepa Colombiana. Tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção), T2 (30 dias pós-infecção), T3 (60 dias pós-infecção), T4 (90 dias pós-infecção) e T5 (240 dias pós-infecção). Amostras de soro com valores de absorvância iguais ou superiores ao ponto de corte ou cut-off foram consideradas positivas (valores marcados em negrito).

PARTE II
INFEÇÃO PELA CEPA Y (TcII) OU COLOMBIANA (TcI) DO *Trypanosoma cruzi* E
TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL NA FASE AGUDA



Delineamento experimental: PARTE II – Ao ser detectada parasitemia patente (seta cinza para cepa Y ou seta preta para cepa Colombiana), grupos paralelos foram tratados com 7 mg de Benznidazol/kg (dividido em duas doses diárias durante 45 dias, por via oral), compondo o grupo NIBz (Grupo tratado com Bz – n=3), YBz (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y/kg, via intraperitoneal, e tratado com Bz – n=4) e ColBz (Grupo infectado com 2.000 formas tripomastigotas da cepa Colombiana/kg, via intraperitoneal, e tratado com Bz – n=4). Foram avaliadas as alterações bioquímicas, hematológicas e imunológicas no decorrer dos tempos: T0 (antes da infecção); T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz); T2 (30 dias pós-infecção / 15 dias após o início do tratamento com Bz); T3 (60 dias pós-infecção / 45 dias após o início do tratamento com Bz); T4 (90 dias pós-infecção / 75 dias após o início do tratamento); e T5 (240 dias pós-infecção / 225 dias após o início do tratamento com Bz).

5.8. Avaliação da parasitemia no sangue periférico frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TclI) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

A parasitemia foi avaliada com exame de sangue a fresco, o grupo infectado com a cepa Y do *T. cruzi* (Tcl) e tratado com Bz (YBz) apresentou período pré-patente de 11 dias, posteriormente o período patente ocorreu entre o 12º e o 22º d.p.i.. A parasitemia máxima ocorreu no 13º d.p.i.. Neste dia a média do pico de parasitemia foi 4.500 formas tripomastigotas / 0,1 ml de sangue.

No grupo infectado com a cepa Colombiana (Tcl) e tratado com Benznidazol (ColBz) o período pré-patente foi de 20 dias e o período patente variou entre o 21º e o 37º d.p.i.. O pico de parasitemia ocorreu no 36º d.p.i., e a parasitemia máxima foi 4.500 formas tripomastigotas / 0,1 ml de sangue (Tabela 7).

O tratamento com Bz iniciou ao ser detectada, pelo menos, uma forma tripomastigota sanguínea no animal. Após iniciado o tratamento, a partir do segundo dia, todos os animais dos grupos YBz e ColBz apresentaram parasitemia negativa, que foi confirmada pela avaliação do exame de sangue a fresco durante os próximos 5 dias consecutivos (Tabela 7). O tratamento com Bz no grupo não infectado iniciou concomitantemente aos grupos infectados e tratados.

A taxa de sobrevivência foi de 100% em todos os grupos experimentais.

Tabela 7. Valores da parasitemia no sangue periférico de cães infectados com as cepas Y ou Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol.

Grupo	Período pré-patente (d.p.i.)	Período patente (d.p.i.)	Dia do pico de parasitemia	Pico de parasitemia (nº/ 0,1 ml de sangue)
YBz (n=04)	0-11	12-22	13	4.500
ColBz (n=04)	0-20	21-37	36	4.500

YBz, infectado com a cepa Y e tratado com Bz; ColBz, infectado com a cepa Colombiana e tratado com Bz.

5.9. Avaliação bioquímica frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (Tcll) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

Ao quantificar a dosagem sérica dos analitos frente ao tratamento com Bz, no grupo NIBz foi observado aumento significativo no nível sérico de ALT em T5 comparado a T0, T1 e T2 (Figura 9 A). Por outro lado, esse grupo apresentou diminuição significativa do nível de fosfatase alcalina, progressivamente entre T3 e T5 (Figura 9 D). Ademais, no grupo NIBz foi observado aumento significativo no nível de ureia sérica em T2 comparado a T1 (Figura 9 E).

No grupo YBz o nível sérico de ALT aumentou significativamente em T1 comparado a T0, e em relação ao grupo NIBz neste mesmo tempo, além disso o nível de ALT foi menor em T2 e T3 comparado a T1. Ademais foi observado aumento significativo de ALT em T5 comparado a T0 (Figura 9 A). Todavia, no grupo YBz foi observada diminuição significativa do nível sérico de fosfatase alcalina, progressivamente entre T3 e T5 (Figura 9 D). Neste mesmo grupo, o nível da ureia sérica aumentou significativamente em T4 comparado a T1 e T3 (Figura 9 E).

No grupo ColBz o nível de ALT foi significativamente superior em T5 comparado a T0, T2 e T3, porém em T3 o nível de ALT foi significativamente inferior comparado ao grupo NIBz neste mesmo tempo (Figura 9 A). No grupo ColBz foi observada diminuição significativa do nível sérico de gama-GT em T4 comparado ao grupo NIBz (Figura 9 C). Tal como observado nos outros grupos experimentais, o grupo ColBz apresentou diminuição significativa do nível de fosfatase alcalina entre T3 e T5 (Figura 9 D).

Os níveis séricos das enzimas AST e CK-NAC não apresentaram diferença significativa nos grupos experimentais (Figura 9 B e F).

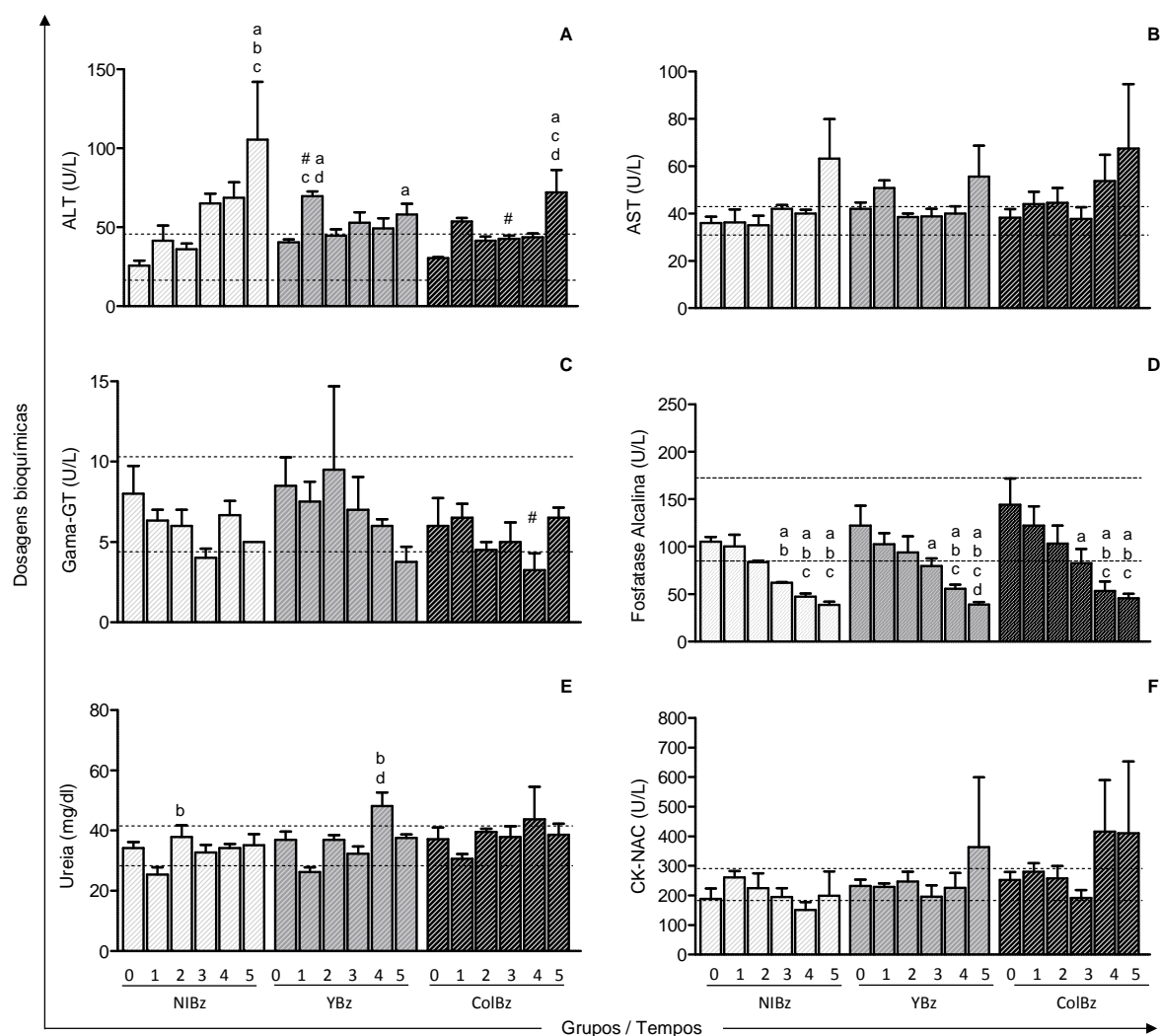


Figura 9. Dosagem da alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato aminotransferase (AST) (B), gama-glutamil transferase (C), fosfatase alcalina (D), ureia (E) e creatina quinase (CK-NAC) (F) no soro dos animais não infectados e tratado com Benznidazol (NIBz; barra branca hachurada) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (YBz; barra cinza hachurada) ou da cepa Colombiana (ColBz; barra preta hachurada) do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol. Os resultados expressam os valores das médias das dosagens dos analitos \pm erro padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$ apontadas como “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” para comparação com os tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz), T2 (30 dias pós-infecção / 15 dias após o início do tratamento com Bz), T3 (60 dias pós-infecção / término do tratamento com Bz), T4 (90 dias pós-infecção / 30 dias após o término do tratamento), e T5 (240 dias pós-infecção / 180 dias após o tratamento com Bz), respectivamente. O símbolo “#” indica diferenças entre o grupo NIBz e os grupos infectados e tratados (YBz ou ColBz). A linha tracejada indica Média \pm dois Desvios padrões para todos os animais em T0, como valor de referência.

5.10. Avaliação hematológica frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TclI) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

A avaliação hematológica frente ao tratamento com Bz revelou, no grupo NIBz, aumento significativo na quantidade de eritrócitos em T3 comparado a T0, e em T5 comparado a T0 e T1, respectivamente.

No grupo YBz o nível de eritrócitos foi significativamente superior em T3 comparado a T0, T1 e T2, seguido por redução significativa em T4 e T5, comparado a T3. Além disso, de maneira semelhante, a quantidade de hemoglobina foi significativamente maior em T3 comparado a T0 e T1, seguida por redução significativa em T4 comparado a T3. Foi também observado aumento significativo na quantidade de hematócrito em T2 comparado a T0, além de aumento em T3 em relação a T0, T1, e comparado ao grupo ColBz neste mesmo tempo. Todavia, posteriormente, nos tempos T4 e T5 foi observada diminuição significativa na quantidade de hematócrito comparado a T3. Quanto ao número de plaquetas no sangue periférico, o grupo YBz apresentou trombocitopenia em T1 comparado a T0, com posterior aumento no número de plaquetas em T2, T3, T4 e T5 comparado a T1.

No grupo ColBz foi observado aumento significativo na quantidade de hemoglobina em T5 comparado a T0 (Tabela 8).

Tabela 8. Valores da série vermelha do hemograma no sangue periférico de cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol.

Quantificação das células da série vermelha						
		Eritrócitos (10 ¹² /L)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Plaquetas (10 ⁹ /L)	
Valor de Referência		5.0–6.6	12.2–15.5	32.1–39.5	129.5–379.5	
NIBz	T0	5.5 ± 0.3	13.7 ± 0.8	34.4 ± 1.6	239.7 ± 84.2	
	T1	5.3 ± 0.6	13.1 ± 1.7	34.1 ± 4.6	184.0 ± 140	
	T2	6.5 ± 0.4	16.9 ± 1.2	40.8 ± 3.2	229.3 ± 38.6	
	T3	6.8 ± 0.2 ^a	17.2 ± 0.1	42.4 ± 1.4	223.0 ± 6.1	
	T4	6.6 ± 0.6	16.5 ± 1.3	40.5 ± 2.1	247.0 ± 68.6	
	T5	7.1 ± 0.4 ^{a,b}	18.0 ± 1.6	43.7 ± 3.8	194.3 ± 41.6	
YBz	T0	5.8 ± 0.2	14.1 ± 0.6	35.5 ± 1.6	201.5 ± 49.6	
	T1	5.8 ± 0.3	14.2 ± 0.7	36.5 ± 2.1	100.0 ± 33.8	a,c,d,e,f
	T2	6.5 ± 0.2	16.3 ± 0.8	42.1 ± 2.1 ^a	205.3 ± 45.2	
	T3	7.7 ± 0.8 ^{a,b,c,e,f}	19.0 ± 2.2 ^{a,b,e}	48.1 ± 4.3 ^{a,b,e,f*}	182.0 ± 38.3	
	T4	6.5 ± 0.4	15.8 ± 1.5	39.4 ± 2.4	191.0 ± 21.1	
	T5	6.6 ± 0.4	16.5 ± 1.3	41.0 ± 3.3	178.3 ± 16.4	
ColBz	T0	6.1 ± 0.5	14.7 ± 1.4	37.8 ± 2.9	230.3 ± 73.6	
	T1	6.2 ± 0.5	15.2 ± 1.3	39.1 ± 2.4	213.8 ± 43.6	
	T2	6.8 ± 0.3	17.4 ± 1.0	42.2 ± 2.2	186.5 ± 34.4	
	T3	7.0 ± 0.1	17.4 ± 0.3	41.4 ± 1.5	191.3 ± 22.9	
	T4	6.9 ± 0.5	17.3 ± 1.2	42.2 ± 4.9	159.5 ± 76.2	
	T5	7.1 ± 0.7	17.7 ± 2.0 ^a	43.3 ± 5.5	165.3 ± 23.8	

NIBz, não infectado e tratado com Bz; YBz, infectado com a cepa Y e tratado com Bz; ColBz, infectado com a cepa Colombiana e tratado com Bz.

As letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” representam a comparação com os tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz), T2 (30 dias pós-infecção / 15 dias após o início do tratamento com Bz / 30 dias após o término do tratamento), T3 (60 dias pós-infecção / término do tratamento com Bz), T4 (90 dias pós-infecção / 30 dias após o tratamento com Bz) e T5 (240 dias pós-infecção / 180 dias após o tratamento com Bz), respectivamente.

“*” indica diferenças entre os grupos YBz e ColBz.

Valor de referência (Média ± 2 Desvios padrões) para todos os animais em T0.

Em relação ao leucograma, no grupo NIBz o tratamento não alterou significativamente a quantidade de leucócitos ou de subtipos celulares no sangue periférico.

No grupo YBz foi observada diminuição significativa de vários subtipos de células do sangue periférico, com leucopenia em T1 comparado a T0, bem como, leucocitose em T2, T3 e T4 comparado a T1. Além disso, foi observada diminuição significativa na quantidade de linfócitos e neutrófilos em T1 comparado a T0, com posterior aumento significativo no número destas células em T2 e T3 comparado a T1. Também foi observada diminuição significativa do número de monócitos em T1 comparado a T0, porém no tempo T5 foi observado aumento significativo do número de monócitos no sangue periférico comparado a T1.

No grupo ColBz foi observada diminuição significativa na quantidade de monócitos presente no sangue periférico em T4 comparado a T0 e em relação ao grupo NIBz no mesmo tempo (Tabela 9).

Tabela 9. Número de leucócitos e diferentes subtipos de células no sangue periférico de cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol.

Quantificação das células da série branca					
		Leucócito (mm ³)	Linfócito (mm ³)	Neutrófilo (mm ³)	Monócito (mm ³)
Valor de Referência		8100 - 20500	2232 - 8779	99 - 15056	291 - 913
NIBz	T0	11633 ± 3014	4494 ± 550	6576 ± 3017	448 ± 256
	T1	9100 ± 7038	4303 ± 2985	4108 ± 3994	288 ± 290
	T2	12800 ± 1819	5410 ± 1637	6444 ± 42	601 ± 137
	T3	13400 ± 1179	5239 ± 1479	7607 ± 737	322 ± 237
	T4	11.866 ± 550	3890 ± 962	7063 ± 837	552 ± 51
	T5	10800 ± 1509	3416 ± 104	6919 ± 1451	320 ± 105
YBz	T0	14175 ± 3340	5424 ± 1145	7530 ± 2234	502 ± 102
	T1	7000 ± 1936 ^{a,c,d,e}	2980 ± 1131 ^{a,c,d}	3545 ± 534 ^{a,c,d}	197 ± 93 ^{a,f}
	T2	14975 ± 1801	6969 ± 1350	6871 ± 498	432 ± 185
	T3	14600 ± 2507	5956 ± 996	8166 ± 1766	289 ± 134
	T4	11450 ± 1721	4904 ± 1250	5921 ± 918	269 ± 138
	T5	10775 ± 1236	3798 ± 876	5829 ± 1326	574 ± 161
ColBz	T0	14675 ± 2087	5666 ± 1008	8069 ± 2711	497 ± 141
	T1	13575 ± 4736	5525 ± 2328	7162 ± 1936	4734 ± 121
	T2	13275 ± 3215	5942 ± 1100	6575 ± 2658	425 ± 84
	T3	13375 ± 1735	5382 ± 1034	7398 ± 1181	249 ± 137
	T4	10325 ± 4590	3340 ± 1581	6315 ± 2471	206 ± 108 ^{a#}
	T5	11025 ± 2769	3339 ± 1667	6859 ± 1353	470 ± 165

NIBz, não infectado e tratado com Bz; YBz, infectado com a cepa Y e tratado com Bz; ColBz, infectado com a cepa Colombiana e tratado com Bz.

As letras "a", "b", "c", "d", "e", "f" representam a comparação com os tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz), T2 (30 dias pós-infecção / 15 dias após o início do tratamento com Bz / 30 dias após o término do tratamento), T3 (60 dias pós-infecção / término do tratamento com Bz), T4 (90 dias pós-infecção / 30 dias após o tratamento com Bz) e T5 (240 dias pós-infecção / 180 dias após o tratamento com Bz), respectivamente.

"#" indica diferenças entre o grupo NIBz e os grupos infectados e tratados (YBz ou ColBz).

Valor de referência (Média ± 2 Desvios padrões) para todos os animais em T0.

5.11. Fenótipo das células mononucleares do sangue periférico frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (TcI) do *T. cruzi*

A imunofenotipagem das células mononucleares do sangue periférico revelou, frente ao tratamento com Bz, no grupo NIBz diminuição significativa no número de linfócitos T CD4⁺ em T1 comparado a T0, e aumento em T5 comparado a T1 (Figura 10 A).

No grupo YBz foi observada diminuição significativa na quantidade de linfócitos T CD4⁺ em T1 comparado a T0 e aumento significativo desta célula em T2, T3 e T5 comparado a T1 (Figura 10 A). Por outro lado, nesse grupo foi observado aumento significativo do número de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico em T2 comparado a T0 e T1, e aos grupos NIBz e ColBz neste mesmo tempo. Além disso, a quantidade de linfócitos T CD8⁺ foi significativamente menor em T3 comparado a T1 (Figura 10 B). Não houve alteração significativa da quantidade de linfócitos B (Figura 10 C) e monócitos CD14⁺ (Figura 10 D) no sangue periférico neste grupo.

No grupo ColBz não foi observada diferença significativa na quantidade desses subtipos celulares (Figura 10 A, B, C e D).

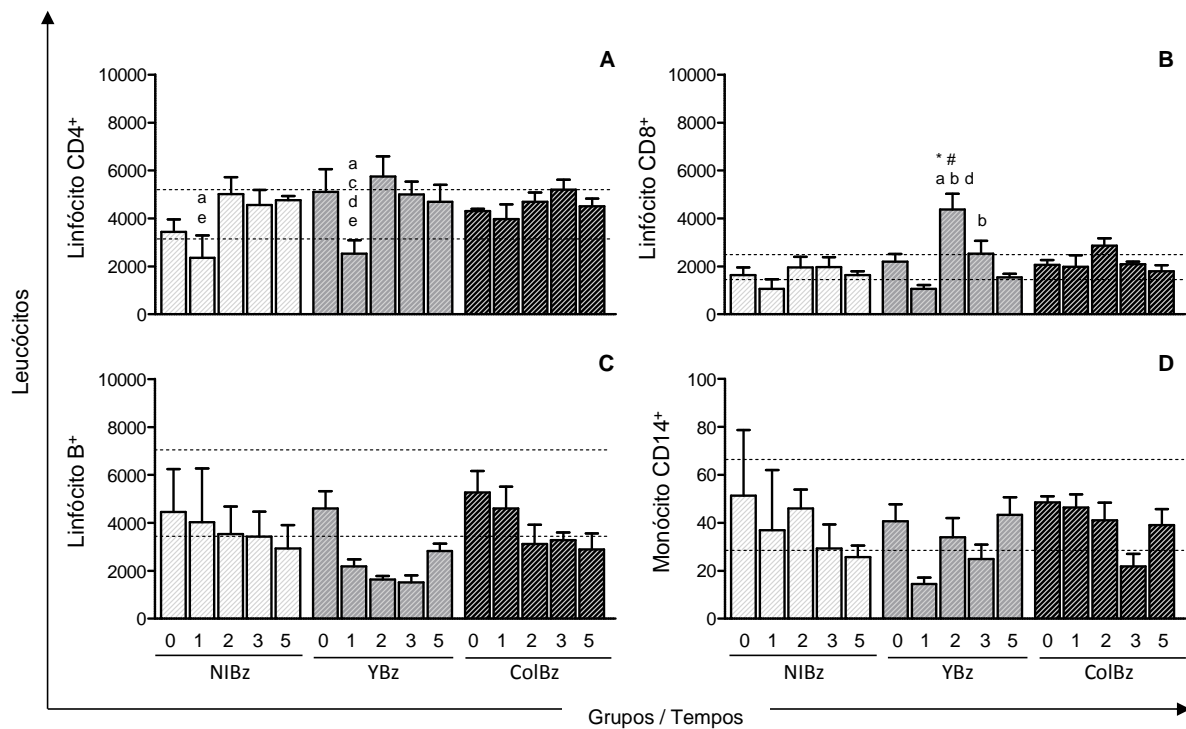


Figura 10. Análise da imunofenotipagem dos linfócitos T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (B), B (C), e monócitos CD14⁺ (D) no sangue periférico de animais não infectados e tratados com Benznidazol (NIBz; barra branca hachurada) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (YBz; barra cinza hachurada) ou da cepa Colombiana (ColBz; barra preta hachurada) do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol. Os resultados expressam a média da contagem absoluta de células \pm erro padrão. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$ apontadas como “a”, “b”, “c”, “d”, “e” para comparação com os tempos T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz), T2 (30 dias pós-infecção / 15 dias após o início do tratamento com Bz), T3 (60 dias pós-infecção / término do tratamento com Bz), e T5 (240 dias pós-infecção / 180 dias após o tratamento com Bz), respectivamente. “#” Diferenças entre o grupo NIBz e os grupos infectados (YBz ou ColBz). O símbolo “#” indica diferenças entre os grupos NI e grupos infectados e tratados (YBz ou ColBz), e o símbolo “*” indica diferenças entre os grupos YBz e ColBz. A linha tracejada indica Média \pm dois Desvios padrões para todos os animais em T0, como valor de referência.

5.12. Avaliação das citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos T frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (TcI) do *T. cruzi*

A avaliação das citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi realizada na presença de estímulo com antígeno de formas epimastigotas das cepas Y ou Colombiana.

No grupo NIBz não foi observada nenhuma diferença significativa, ou seja, o antígeno não foi capaz de estimular a produção das citocinas IFN- γ ou IL-4 pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos animais não infectados e tratados com Bz.

No grupo YBz foi observado aumento significativo na quantidade de IFN- γ e IL-4 produzida por linfócitos T CD4⁺ em T3. Especificamente, a produção de IFN- γ foi significativamente superior em T3 comparado a T1, e ao grupo NIBz neste mesmo tempo, bem como nos tempos T4 e T5 a produção de IFN- γ foi significativamente inferior comparado a T3 (Figura 11 A). A produção de IL-4 foi significativamente maior em T3 comparado a T1 (Figura 11 B).

No grupo ColBz não foi observada diferença significativa na produção de IFN- γ ou IL-4 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em nenhum dos tempos avaliados (Figura 11 E, F, G e H).

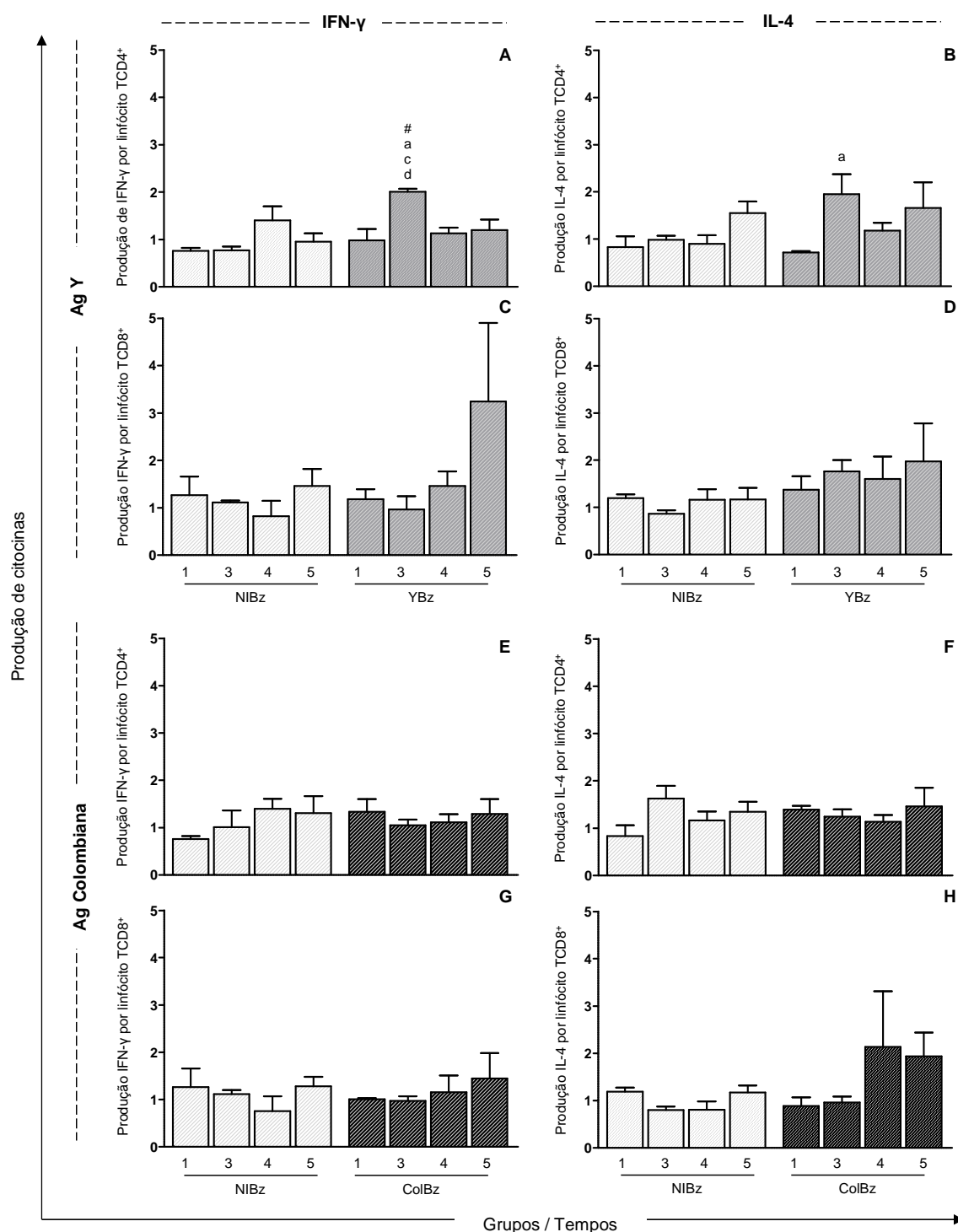


Figura 11. Produção de citocinas (IFN- γ e IL-4) por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico de animais não infectados e tratados com Benznidazol (NIBz; barra branca) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (YBz; barra cinza hachurada) ou com a cepa Colombiana (ColBz; barra preta hachurada) do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol. Figuras A, B, C e D: razão da citocina produzida por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ em cultura estimulada com antígeno de epimastigota da cepa Y. Figuras E, F, G e H: razão da citocina produzida por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ em cultura estimulada com antígeno de epimastigota da cepa Colombiana. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$ apontadas como "a", "b", "c", "d" para comparação com os tempos T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz), T3 (60 dias pós-infecção / término do tratamento com Bz), T4 (90 dias pós-infecção / 30 dias após o término do

tratamento), e T5 (240 dias pós-infecção / 180 dias após o tratamento com Bz), respectivamente. O símbolo “#” indica diferenças entre o grupo NIBz e os grupos infectados e tratados (YBz ou ColBz).

5.13. Quantificação do processo inflamatório e da neoformação de colágeno no coração frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TcII) ou Colombiana (TcI) do *T. cruzi*

A avaliação qualitativa dos cortes histológicos do coração dos animais tratados com Bz, de modo geral, não mostrou inflamação, lesão tecidual ou parasitismo. Apenas um dos quatro animais do grupo ColBz apresentou focos de infiltrado inflamatório moderado.

Ao quantificar o número de células e a área de colágeno no átrio direito não foi observada diferença significativa entre os grupos NIBz, YBz e ColBz (Figura 12).

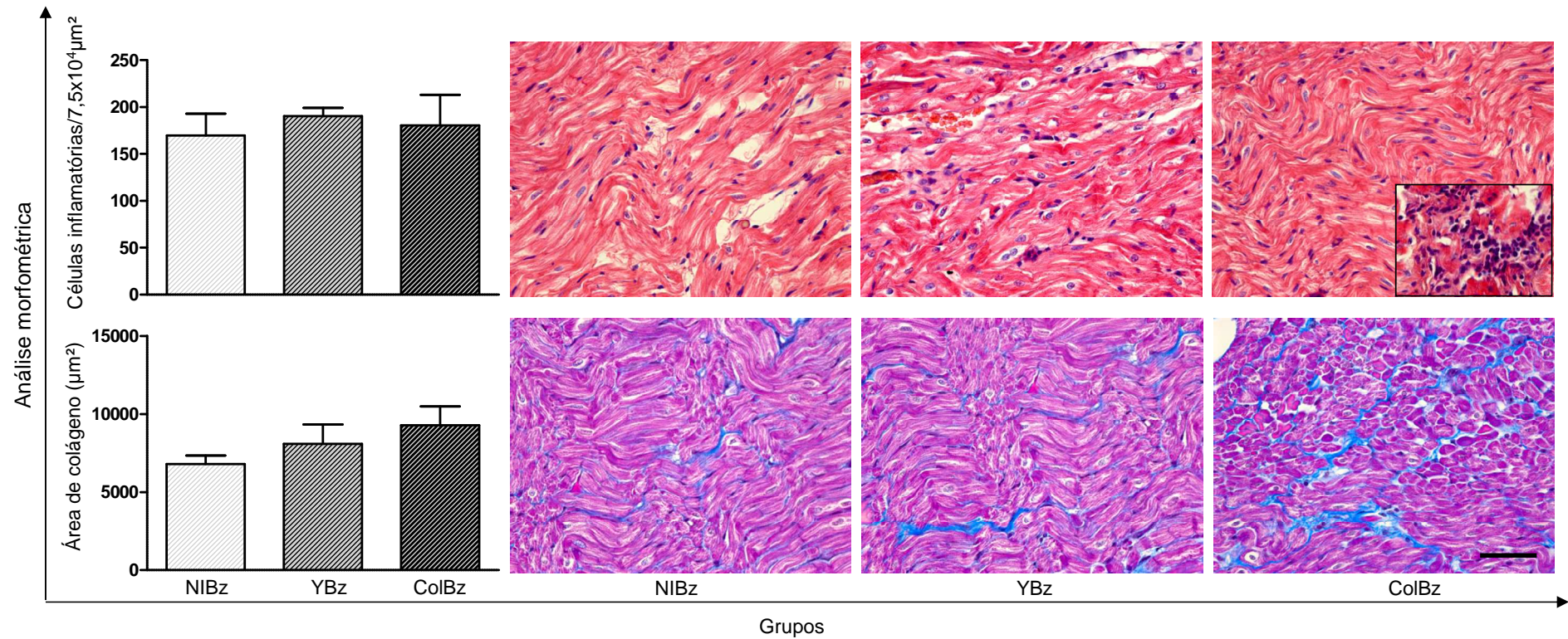


Figura 12. Número de células inflamatórias (coloração H&E) e área de colágeno (coloração Tricrômico de Masson) no átrio direito dos animais não infectados e tratados com Benznidazol (NIBz; barra branca hachurada) ou infectados com 2×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas/kg da cepa Y (YBz; barra cinza hachurada) ou da cepa Colombiana (ColBz; barra preta hachurada) do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol. Detalhe do infiltrado inflamatório focal moderado, observado em somente um dos quatro animais do grupo ColBz. A quantificação aos 240 dias pós-infecção (T5) foi expressa como média do número de células ou área de colágeno \pm erro padrão. O símbolo “#” indica diferenças entre o grupo NIBz e os grupos infectados (YBz ou ColBz), e o símbolo “*” indica diferenças entre os grupos YBz e ColBz. Barra=50 μm .

5.14. Dosagem dos níveis séricos de IgG frente ao tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pela cepa Y (TclI) ou Colombiana (Tcl) do *T. cruzi*

Os resultados da cinética da dosagem sérica da imunoglobulina IgG-anti *T. cruzi* de cada animal componente dos grupos NIBz, YBz e ColBz estão expressos na Tabela 10. As absorvâncias em negrito apontam os resultados com valores iguais ou superiores a linha de corte, sendo então considerados como sorologia positiva.

No grupo NIBz não foi observada imunoreatividade em todos os animais nos tempos avaliados.

No grupo YBz, ao avaliar os resultados de cada animal em cada coleta, aponta-se sorologia positiva em T2 em dois animais (cão 06 e cão 08), já em T3 somente um animal apresentava sorologia positiva (cão 06). No tempo T4 dois animais apresentaram sorologia positiva (cão 05 e cão 06), e no tempo T5 somente um animal apresentou sorologia positiva (cão 05). Salienta-se que o cão 06 apresentou sororeversão, uma vez que foi observada diminuição progressiva nos títulos de anticorpos durante todos os tempos (T2 a T5), e sorologia negativa em T5.

No grupo ColBz no tempo T2 foi observada sorologia positiva em três animais (cão 09, cão 13 e cão 20), todavia, em T3 somente um animal apresentava sorologia positiva (cão 20), os outros animais previamente com sorologia positiva negativaram a sorologia. No tempo T4 dois animais apresentaram sorologia positiva (cão 13 e cão 20). No tempo final, T5, somente um animal apresentava sorologia positiva (cão 13). O cão 20 apresentou sororeversão, uma vez que foi observada diminuição nos títulos de anticorpos durante os tempos T2 a T5, e no tempo T5 apresentou sorologia negativa.

Desta forma, tanto no grupo YBz quanto no grupo ColBz 75% dos animais apresentaram sororeversão, considerando os animais que apresentaram sorologia negativa tanto no tempo T4 quanto no tempo T5, bem como, os que apresentavam diminuição dos títulos de anticorpos ao longo dos tempos e negatificação no T5.

Tabela 10. Cinética da dosagem sérica de IgG-anti *T. cruzi* em cães não infectados ou infectados com as cepas Y ou Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e tratados com Benznidazol.

		Dosagem sérica de IgG-anti <i>T. cruzi</i>					
		T0	T1	T2	T3	T4	T5
NIBz	Cão 10	0,7	0,5	0,7	0,8	0,6	0,6
	Cão 15	0,7	0,8	0,6	0,6	0,6	0,5
	Cão 18	0,6	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4
YBz	Cão 05	1,0	0,7	1,1	1,4	3,9	3,2
	Cão 06	1,1	0,8	2,7	2,4	2,0	1,3
	Cão 08	0,8	0,8	2,0	1,2	1,3	0,8
	Cão 14	0,8	0,6	1,4	1,1	0,9	0,8
ColBz	Cão 02	0,4	0,4	1,0	0,7	0,7	0,6
	Cão 09	0,3	0,4	1,7	0,9	1,0	0,8
	Cão 13	0,9	0,7	2,0	1,2	2,8	3,0
	Cão 20	1,4	0,8	4,2	2,9	1,6	1,3

NIBz, não infectado e tratado com Bz; YBz, infectado com a cepa Y e tratado com Bz; ColBz, infectado com a cepa Colombiana e tratado com Bz.

Tempos: T0 (antes da infecção), T1 (09 dias pós-infecção / antes do tratamento com Bz), T2 (30 dias pós-infecção / 15 dias após o início do tratamento com Bz / 30 dias após o término do tratamento), T3 (60 dias pós-infecção / término do tratamento com Bz), T4 (90 dias pós-infecção / 30 dias após o tratamento com Bz) e T5 (240 dias pós-infecção / 180 dias após o tratamento com Bz).

Amostras de soro com valores de absorbância iguais ou superiores ao ponto de corte ou *cut-off* foram consideradas positivas (valores marcados em negrito).

Na América Latina são encontradas diferentes cepas correspondentes a distintos DTUs do *T. cruzi* responsáveis pelas distintas formas da DC crônica. Embora vários estudos tenham esclarecido inúmeros aspectos sobre a relação entre o parasito e as alterações clínicas, ainda não existe uma associação clara frente às alterações imunopatológicas com relação às DTUs do parasito. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar aspectos imunopatológicos das fases aguda e crônica recente da DC, na infecção experimental de cães com cepas de diferentes DTUs que apresentam distintos graus de susceptibilidade ao Bz.

Há relatos, na infecção experimental com o *T. cruzi*, de comprometimento hepático e presença de parasitos viáveis no fígado de camundongos (Sardinha *et al.*, 2010). Este parasitismo favorece a migração de numerosas células inflamatórias, como monócitos, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK para o parênquima e o espaço porta hepático, local onde este infiltrado inflamatório tem importância em controlar o parasito (Sardinha *et al.*, 2010). Tendo em vista a relevância do fígado como sítio de migração e controle do parasito, avaliamos a função hepática mediante dosagens laboratoriais no soro dos animais.

Dentre as enzimas hepáticas avaliadas, observamos aumento no nível sérico de ALT e AST frente à infecção com a cepa Y, tal como, aumento do nível sérico de ALT na infecção com a cepa Colombiana. Sabe-se que em casos de lesão tissular ou doença afetando o parênquima hepático ocorre a liberação de maior quantidade dessas enzimas para a corrente sanguínea (Bergmeyer *et al.*, 1978).

Resultados semelhantes também foram relatados na infecção experimental, com aumento nos níveis séricos de ALT e AST em quatis (*Nasua nasua*) (Herrera *et al.*, 2002) e em cães infectados com *Trypanosoma evansi* (Aquino *et al.*, 2002) ou com *T. cruzi* (Barr *et al.*, 1991), demonstrando que a infecção pode levar a uma lesão inicial nesse órgão, que após o controle do parasitismo não é mais observada.

Além disso, o aumento do nível sérico de AST é comumente detectado em pacientes com infarto agudo do miocárdio (Stryer, 2000). Quanto o modelo cão, Kley *et al.* (2003) descreveram uma peculiaridade do nível sérico de AST, a dosagem não se altera em função da idade, sexo ou raça do animal, portanto acreditamos que o aumento no nível sérico de ALT seja diretamente relacionado a infecção experimental com o *T. cruzi*.

Frente ao tratamento com Bz todos os grupos apresentaram aumento do nível sérico de ALT, fato semelhante a este também foi demonstrado no trabalho de Rojas *et al.* (2012), no qual foi observado aumento no nível de ALT tanto em ratos infectados com o *T. cruzi* quanto nos animais infectados e tratados com Bz, todavia esta alteração não foi observada nos animais controles (não infectados e não tratados). Este aumento das enzimas hepáticas no soro dos animais tratados com Bz pode estar relacionado ao estresse oxidativo que este fármaco induz, tal como demonstrado por Pedrosa *et al.* (2001), que avaliaram biomarcadores do estresse oxidativo no fígado de ratos 30 dias após o tratamento com Bz, observando aumento da atividade da glutathione redutase e catalase. Além disso, dentre os efeitos colaterais indicados na bula deste fármaco está elencado o risco de

insuficiência hepática. Conjuntamente, estes resultados podem sugerir que o Bz associado à infecção, mesmo em dose terapêutica, pode ser ainda mais lesivo ao fígado.

A dosagem do nível sérico de fosfatase alcalina apresentou resultado que aparentemente não tem relação com a infecção experimental com *T. cruzi*, uma vez que todos os grupos experimentais apresentaram diminuição do nível sérico de fosfatase alcalina, o que pode demonstrar que o nível desta enzima está diretamente relacionado ao crescimento do animal, uma vez que no início do protocolo experimental os animais tinham aproximadamente 3 meses e ao término, 11 meses de idade. Esse resultado corrobora com o descrito por outros autores que avaliaram 308 cães de diferentes raças e idades (Kley *et al.*, 2003).

Ao avaliar a função renal foi observado aumento do nível sérico de ureia no grupo Col. Semelhantemente, lesão renal foi observada em cães da raça *Beagle* experimentalmente infectados com cepas do *T. cruzi* isoladas de *Didelphis marsupialis*, *Dasypodidae* ou *Canis lupus familiaris* infectados (Barr *et al.*, 1991). Em estudo detalhado sobre o parasitismo dos rins de hamster, detectaram antígeno solúvel e DNA do *T. cruzi* em amostra de urina (Castro-Sesquen *et al.*, 2013), bem como, parasitismo na região cortical e medular renal e peri-renal, com infiltrado inflamatório e permeabilidade vascular renal aumentada. Outro estudo apontou que a infecção experimental murina com o *T. cruzi* ocasionou redução da excreção urinária e depuração de creatinina, com elevação acentuada da proporção do volume de urina em relação aos rins e o peso corporal, o que sugeriu que o parasito pode comprometer a função renal (Lemos *et al.*, 2013).

No presente estudo foi observado aumento do nível sérico de ureia nos grupos NIBz e YBz. Ademais, o estudo de De Souza *et al.* (2006) apontou que o tratamento com Bz não foi capaz de controlar esta lesão renal ocasionada pelo parasito em camundongos. Logo, estes dados podem sugerir que o tratamento com Bz pode acarretar em algum tipo de lesão renal, uma vez que a insuficiência renal é indicada na bula deste medicamento como um possível efeito colateral.

De modo a avaliarmos lesão muscular, o nível sérico da enzima CK-NAC foi dosado e não apresentou diferença significativa nos grupos experimentais. Todavia, apesar de não ser observada diferença estatística, salienta-se que os níveis de CK-NAC foram superiores ao valor de referência, nos grupos Y e YBz, bem como, no grupo ColBz. De maneira semelhante Cano *et al.* (2000) também observaram aumento do nível de creatina quinase no plasma de camundongos infectados com as cepas K-1, X-1 e Tulahuen em comparação a animais não infectados.

Portanto, de maneira geral, neste trabalho observamos que a infecção pelo *T. cruzi*, independente da cepa/DTU (Tcl ou TcII), favoreceu a lesão hepática e renal, tal como demonstrado em outros modelos experimentais, camundongos, cães e coatis infectados com *T. cruzi* (Barr *et al.*, 1991; Aquino *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2002; de Souza *et al.*, 2006). Além disso, observamos quadro de lesão hepática e renal em modelo experimental frente ao tratamento com Bz, tal como descrito por Strauss *et al.* (2013), que apontam áreas de necrose, infiltrados inflamatórios periportais e congestão vascular no fígado, além de ninhos de amastigotas e infiltrados inflamatórios no rim dos camundongos infectados e tratados com Bz. Com esses resultados podemos concluir que o

tratamento com Bz pode, até mesmo, ter favorecido o agravamento da lesão hepática e renal na fase aguda da infecção chagásica.

Os parâmetros hematológicos, frente à infecção, de modo geral foram majoritariamente alterados nos cães infectados com a cepa Colombiana, com aumento significativo na quantidade de hemoglobina, eritrócito e hematócrito no grupo Col. Por outro lado, o grupo Y apresentou aumento significativo somente na quantidade de hemoglobina. Aparentemente o TcI, DTU da cepa Colombiana, favorece o aumento dos subtipos celulares da série vermelha.

Semelhantemente, foi descrito que a infecção experimental com *T. cruzi*, em rato, favoreceu maior viscosidade do plasma e aumento da percentagem de hematócrito, com alterações morfológicas nas células vermelhas do sangue (Berra *et al.*, 2005). Todavia, resultados contraditórios foram observados em outros estudos que avaliaram a infecção experimental canina com *T. cruzi*, na qual houve quadro de anemia na infecção com a cepa Sylvio X10/4 (Quijano-Hernández *et al.*, 2012), ou mesmo diminuição na quantidade de eritrócitos na infecção com as cepas Y, ABC ou Be-78 em cães *Beagle* (Guedes *et al.*, 2012). Por outro lado, cães sem raça definida infectados com as cepas Be-62 ou Be-78 não apresentaram alterações hematológicas (Lana *et al.*, 1992). Da mesma forma, na infecção experimental de macacos Rhesus com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Colombiana não se observou diferença significativa na quantidade de eritrócito e hemoglobina na fase aguda (Bonecini-Almeida *et al.*, 1990). Essa variedade de resultados sugere que tanto o modelo experimental quanto a cepa do *T. cruzi* podem influenciar o impacto da infecção chagásica sob as alterações hematológicas.

No presente trabalho, o tratamento com Bz alterou o padrão descrito na infecção chagásica, sendo observado aumento significativo na quantidade de eritrócito no grupo NIBz, de hematócrito, eritrócito e hemoglobina no grupo YBz, e aumento significativo de hemoglobina no sangue periférico no grupo ColBz. Sugerimos que o tratamento com Bz, apesar de ter impactado a quantidade das células da série vermelha no sangue periférico nos grupos NIBz e YBz ao aumentar alguns subtipos que não haviam sido alterados na infecção chagásica, o mesmo não foi observado frente à infecção com a cepa Colombiana.

Quanto à quantidade de plaqueta no sangue periférico, observamos trombocitopenia na infecção com a cepa Y, independente do tratamento com Bz. Este resultado é condizente com a redução do número de plaquetas na fase aguda da DC em pacientes (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1990), em camundongos (Cardoso e Brener, 1980; Marcondes *et al.*, 2000) e em cães experimentalmente infectados com *T. evansi* (La Rue *et al.*, 1997). Todavia, Guedes *et al.* (2012) não observaram essa diminuição do número de plaqueta no sangue periférico na infecção experimental de cães da raça *Beagle* com as cepas Y, Be-78 e ABC, provavelmente devido a uma particularidade desta raça.

Ao avaliar a série branca, este estudo demonstrou na infecção canina com a cepa Y leucopenia e monocitopenia, além disso, o grupo YBz apresentou diminuição significativa na quantidade de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos no sangue periférico. Bem como, na infecção com a cepa Colombiana foi observada diminuição na quantidade de monócitos, independente do tratamento com Bz.

Desta forma, independente das variações dos subtipos celulares na infecção com cada cepa, a infecção favoreceu leucopenia, quadro já descrito no modelo murino infectado com *T. cruzi* (Marcondes *et al.*, 2000). O estudo de Aquino *et al.* (2002), com modelo canino infectado com *T. evansi*, apontou diminuição significativa no número de leucócitos e neutrófilos entre a segunda e quinta semana pós-infecção, sendo que posterior a este período os valores normalizaram, apesar de continuarem inferiores em relação ao grupo não infectado. O número de linfócitos também diminuiu no sangue periférico, mas permaneceu dentro da faixa de referência.

De maneira geral, na infecção experimental com as cepas Y ou Colombiana, as curvas de parasitemia apresentaram diferentes períodos pré-patentes e patentes. Na infecção com a cepa Y o período patente ocorreu entre o 11º e o 21º d.p.i. e o pico de parasitemia ocorreu no 15º d.p.i.. Neste grupo o aumento significativo da quantidade sérica das enzimas hepáticas ALT e AST ocorreu entre o 9º e o 30º d.p.i. e as alterações hematológicas ocorreram em diferentes momentos, com diminuição da quantidade de plaquetas, leucócitos e monócitos aos 9 d.p.i., seguido de aumento significativo de hemoglobina aos 240 d.p.i.. Por outro lado, na infecção com a cepa Colombiana a parasitemia apresentou valor superior, com período patente entre o 21º e o 38º d.p.i. e pico no 33º d.p.i., ou seja, posterior ao pico de parasitemia da cepa Y. No grupo Col foi observado aumento significativo do nível sérico de ALT aos 9 d.p.i., e de eritrócito, hemoglobina e hematócrito a partir do 30º d.p.i.. Logo, apesar de não ter sido observada uma correlação direta entre o dia do pico de parasitemia e as alterações hepáticas e hematológicas, vários analitos apresentaram alterações evidentes no período patente da infecção com as cepas Y e Colombiana, o que corrobora com os achados de Guedes *et al.* (2012), que descreveram uma relação direta entre as alterações hematológicas e a parasitemia na infecção canina experimental com as cepas Y, Berenice-78 e ABC de *T. cruzi*.

Interessantemente, neste trabalho, o tratamento com Bz foi eficaz em negativar a parasitemia em até dois dias após o início da terapia. Essa supressão da parasitemia patente frente ao tratamento com Bz também foi amplamente descrita em modelo murino (Fernández *et al.*, 2010; Olivieri *et al.*, 2010; Oliveira-Silva *et al.*, 2015) e canino (Guedes *et al.*, 2002; Caldas *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012).

Na fenotipagem do sangue periférico dos animais foi observada redução significativa na quantidade de linfócitos T CD4⁺ e posterior aumento das células T CD8⁺ na infecção com a cepa Y, independente do tratamento com Bz. Este mesmo padrão de diminuição dos linfócitos T CD4⁺ seguido pelo aumento dos T CD8⁺ foi observado no modelo experimental canino infectado com a cepa Be-78 (Carneiro *et al.*, 2007). Nota-se que ambas as cepas, Y e Be-78, pertencem à DTU TcII, o que indica que esta resposta celular poderia ser relacionada à genética do parasito. Por outro lado, a infecção com a cepa Colombiana não alterou significativamente a quantidade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Desta forma podemos sugerir que a cepa TcI é mais "silenciosa" comparada à TcII, ao não alterar a quantidade das subpopulações de linfócitos.

Ademais observamos, na fase aguda, que a infecção com a cepa Y favoreceu a inversão da razão de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺, independente do tratamento com Bz. Este resultado corrobora com o descrito por Carneiro *et al.* (2007) que indicaram que a inversão da razão de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺

foi uma característica imunológica intrínseca a infecção com *T. cruzi*. Além disso essa alteração não foi relacionada à idade do animal (Reis *et al.*, 2005). Portanto, de modo peculiar, o presente estudo sugere que esta inversão das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pode ser relacionada a algumas cepas do *T. cruzi*, tal como Be-78 (Carneiro *et al.*, 2007) e Y (TcII), uma vez que não foi observada na infecção com a cepa Colombiana (TcI), o que enfatiza os distintos padrões de resposta imune em função da respectiva DTU do parasito.

Poucos estudos estão disponíveis na literatura especializada sobre a análise qualitativa da resposta imune de pacientes durante a infecção chagásica aguda. Todavia a ativação de mecanismos inatos é importante para controlar a parasitemia ao favorecer a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α (Dutra *et al.*, 2014). Além disso, o linfócito T CD4⁺ participa no controle do parasito ao favorecer a expansão dos linfócitos citotóxicos T CD8⁺ e a produção de IFN- γ , uma citocina pró-inflamatória que estimula a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, controlando assim a replicação do parasito e promovendo a síntese de isotipos de imunoglobulinas (Brenner e Gazzinelli, 1997). Todavia, este quadro de inflamação exacerbada pode lesionar o tecido, e a transição da fase aguda para a fase crônica da DC é acompanhada pela diminuição da parasitemia e parasitismo, bem como, controle da resposta imune. Possivelmente, este controle da resposta inflamatória é realizado por citocinas anti-inflamatórias, dentre IL-10 considerada uma importante citocina imunomoduladora produzida por linfócitos T e monócitos (Dutra *et al.*, 2014).

No presente trabalho foi observado aumento na produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e produção de IL-4 por linfócitos T CD8⁺ na infecção de cães com a cepa Y. Sugerimos que o aumento na produção de IFN- γ pode contribuir para a resposta pró-inflamatória, tal como observado na infecção experimental com a cepa Be-78 (TcII) em modelo murino, que favoreceu a produção precoce de IFN- γ coincidentemente à inflamação cardíaca, que posteriormente apresentou perfil imunoregulatório (Vieira *et al.*, 2012).

No entanto, na infecção com a cepa Colombiana foi observado aumento significativo na produção de IL-4 pelos linfócitos T CD8⁺, não sendo observada alteração significativa na produção de IFN- γ . Especulamos que a cepa Colombiana, TcI, tem "perfil mais silencioso" ao não ativar a expressão de citocina pró-inflamatória na fase aguda, uma vez que somente foi observado aumento na produção de citocina anti-inflamatória na fase crônica.

Petray *et al.* (1993) avaliaram a influência do tratamento anti-IFN- γ e anti-IL-4 no curso da infecção murina com duas cepas reticulotrópicas, RA e Tulahuén, e a cepa Colombiana, miotrópica. Os autores observaram que na infecção com a cepa Colombiana o tratamento anti-IFN- γ e anti-IL-4 não influenciou o curso da infecção, enquanto que na infecção com as cepas reticulotrópicas o tratamento anti-IFN- γ aumentou a susceptibilidade do hospedeiro ao parasito. Por outro lado, o tratamento anti-IL-4 aumentou a resistência do hospedeiro.

Esses resultados corroboram com os dados clínicos de pacientes chagásicos, visto que comparando indivíduos chagásicos aos não infectados foi observada maior produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e TNF- α pelos linfócitos T CD4⁺ frente à infecção chagásica (Lorena *et al.*, 2010). Além disso, foi relatado aumento no nível sérico de IFN- γ no início da infecção, sendo essa a citocina

predominante até os primeiros 30 d.p.i.. Posteriormente, foi verificado que aos 60 d.p.i., ocorreu a inversão no perfil inflamatório do tipo 1 para o tipo 2 com predomínio de IL-4 e IL-10. Ressalta-se que o IFN- γ está associado à diminuição do parasitismo e pode favorecer o controle da inflamação cardíaca no modelo murino (Talvani *et al.*, 2000).

A relação entre o perfil da expressão de citocina e a forma clínica da DC humana já foi bastante estudada. Todavia ainda não está completamente caracterizada (de Melo *et al.*, 2012). Ainda existem controvérsias, uma vez que alguns estudos indicam que na forma indeterminada há predomínio de citocinas pró-inflamatórias e na forma cardíaca o perfil predominante seja o anti-inflamatório (de Melo *et al.*, 2012). Por outro lado, resultados discordantes foram descritos por Abel *et al.* (2001), Gomes *et al.* (2003), Souza *et al.* (2007) e Dutra *et al.* (2014), que indicaram níveis elevados de IFN- γ e TNF- α na forma cardíaca, sendo estas citocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos, por outro lado, na forma indeterminada foi observado nível elevado de IL-10, produzido majoritariamente por monócitos CD14⁺, o que sugere um perfil modulador.

Ressalta-se que ao relacionar a expressão de citocinas com a dilatação cardíaca foi observado predomínio na expressão de IFN- γ em cultura de sangue periférico de pacientes com a forma cardíaca dilatada e, por outro lado, predomínio na expressão de IL-4 em cultura de sangue periférico de pacientes com a forma cardíaca sem dilatação (Lorena *et al.*, 2010), o que pode sugerir uma relação entre o perfil das citocinas e a cardiomegalia, e que a cardiopatia tem impacto direto com a perda da qualidade de vida do paciente.

De maneira complementar, na presença de estímulo *in vitro* com antígeno do *T. cruzi*, o padrão de expressão de citocinas pode se alterar. De maneira geral, em cultura de célula não estimulada, linfócitos T CD4⁺ e monócitos de pacientes chagásicos cardíacos produzem citocinas pró-inflamatórias enquanto que PBMCs de pacientes com a forma indeterminada produzem citocinas anti-inflamatórias. Todavia, frente ao estímulo com antígeno *in vitro* esse padrão de citocinas produzidas se altera, os pacientes cardíacos apresentam predomínio de citocinas regulatórias e pacientes com a forma indeterminada apresentam predomínio de citocinas pró-inflamatórias (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008).

De modo contraditório, os resultados de Dutra *et al.* (1997) apontaram que a cultura de PBMCs de pacientes chagásicos crônicos apresentou maior expressão de IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ comparado a indivíduos não infectados, porém ao incubar as culturas com antígeno do parasito foi observado aumento na expressão de IFN- γ e diminuição nos níveis de IL-10.

Ademais, salientamos que a produção de IFN- γ tem papel paradoxal ao ser relacionada tanto a cardiomiopatia chagásica crônica (Dutra *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2003; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Lorena *et al.*, 2010; Dutra *et al.*, 2014) quanto a cura parasitológica (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998). Esta dúvida participação do IFN- γ foi apontado no estudo de Bahia-Oliveira *et al.* (1998) que avaliou grupos de pacientes chagásicos e tratados com Bz na fase aguda *versus* pacientes chagásicos crônicos. No grupo tratado, as PBMCs dos pacientes curados produziram maior quantidade de IFN- γ comparado a dos pacientes não curados. Por outro lado, o grupo crônico não tratado apresentou níveis maiores de IFN- γ comparado a pacientes com a forma indeterminada.

Neste trabalho, o tratamento de cães com Bz frente à infecção com a cepa Y favoreceu o aumento na produção de IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺. Semelhantemente, Sathler-Avelar *et al.* (2006) observaram em pacientes chagásicos que o tratamento com Bz favoreceu a produção de IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD4⁺, fato esse que se torna relevante, uma vez que o Bz na presença da citocina IFN- γ favorece a fagocitose e a morte do parasito (Romanha *et al.*, 2002). Todavia, o tratamento com Bz não favoreceu a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺, o que foi observado no grupo de cães infectados com a cepa Y, a diminuição na produção desta citocina após o tratamento de crianças com Bz também foi descrita por Cutrullis *et al.* (2011).

Semelhantemente, o tratamento com Bz pode estar relacionado a mecanismos imunoregulatórios, ao modificar o balanço entre mediadores pró e anti-inflamatórios (Revelli *et al.*, 1999), uma vez que crianças tratadas com Bz apresentaram, na imunidade inata, aumento da quantidade de macrófagos e monócitos pró-inflamatórios. Todavia o aumento destas células não se relacionou com os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- γ e IL-12. Na imunidade adaptativa o tratamento favoreceu a produção de IL-10 por linfócitos T CD4⁺ e B. Desta forma, o tratamento com Bz controlou a resposta imune exacerbada em pacientes chagásicos (Sathler-Avelar *et al.*, 2006; Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Além disso, o tratamento nos estágios iniciais da infecção chagásica, na maioria dos casos, é associado a níveis muito mais elevados de cura e desfechos clínicos satisfatórios (Galvão *et al.*, 1993).

Quanto aos linfócitos B, no presente estudo, foi observada diminuição na quantidade desta célula no sangue periférico dos animais infectados com as cepas Y e Colombiana. Essa diminuição do número de células B circulantes nos momentos iniciais da infecção do *T. cruzi* pode estar relacionada a apoptose (Zuñiga *et al.*, 2000), bem como alguns pesquisadores apontaram a relação entre a ativação policlonal e a diminuição da proporção deste subtipo celular (Minoprio *et al.*, 1989; Montes *et al.*, 2002). Uma vez que o linfócito B tem importância em controlar a parasitemia, o parasitismo e favorecer a ativação de outras células que tem papel crítico na resistência ao patógeno intracelular. Este quadro de diminuição na quantidade de linfócitos B no sangue periférico foi previamente descrito por Carneiro *et al.* (2007), que observaram na infecção experimental com *T. cruzi* em modelo canino a redução dos níveis de linfócitos CD21⁺. Com isto, sugerimos que a diminuição do número de linfócitos B pode não ser diretamente relacionada à cepa/DTU do parasito. Frente ao tratamento com Bz não foram observadas diferenças significativas no número de linfócitos B circulantes no sangue periférico dos diferentes grupos, o que pode sugerir que o tratamento foi importante ao proteger esta célula, que favorece a produção de citocinas IFN- γ e IL-12, a manutenção das células T efectoras de memória, bem como exerce papel crucial na manutenção dos linfócitos T CD8⁺ (Cardillo *et al.*, 2007), tal como demonstrado na infecção experimental murina.

Ademais, as células apresentadoras de antígeno, tal como os monócitos, são relevantes para direcionar a resposta imune pelos linfócitos T. Neste trabalho observamos monocitopenia nos animais infectados com a cepa Y ou Colombiana, independente do tratamento com Bz. Similarmente, esta diminuição do número de monócitos foi observada em cães naturalmente infectados por *T. cruzi* e soropositivos (Cruz-Chan *et al.*, 2009). Sendo assim, aparentemente a diminuição do número de

monócitos no sangue periférico estaria relacionada à migração desta célula para os tecidos-alvo, nos diferentes estágios da infecção de acordo com a cepa infectante.

Especificamente, ao quantificarmos os monócitos CD14⁺, a quantidade desta célula foi variável no grupo Y com diminuição primeiramente e posterior aumento, variação esta não observada no grupo tratado com Bz. Similarmente, esta redução no nível de monócitos CD14⁺ foi considerada a alteração mais relevante na fase aguda da infecção experimental com a cepa Be-78 do *T. cruzi* (Carneiro *et al.*, 2007) e pode estar relacionada a migração dos macrófagos para o infiltrado inflamatório cardíaco (de Souza 2010).

Sob o ponto de vista clínico, os monócitos apresentam diferenças funcionais conforme a forma clínica do paciente. Desta forma os monócitos CD14⁺ de pacientes chagásicos com a forma indeterminada apresentam características imunomoduladoras relacionada a baixa expressão de molécula de superfície HLA-DR e alta expressão de IL-10. Todavia monócitos CD14⁺ de pacientes chagásicos com a forma cardíaca favorecem a resposta imune pró-inflamatória com a alta expressão de TNF- α (Souza *et al.*, 2004). Ou seja, a dicotomia entre a produção de citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória aparentemente reflete no quadro clínico, uma vez que pacientes cardíacos apresentam maior produção de TNF- α e IFN- γ , que se correlacionam com a piora da função cardíaca e agravo do prognóstico da doença. Por outro lado, pacientes com a forma indeterminada, sem sinais clínicos aparentes, apresentam maior produção de IL-10. Estes dados sugerem que a produção de citocinas imunoreguladoras tem papel em controlar a progressão da doença nos pacientes com a forma indeterminada. Já nos pacientes chagásicos crônicos a expressão desta citocina não é suficiente para controlar o agravo da doença (Gomes *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004; de Araujo *et al.*, 2011). Frente ao tratamento com Bz foi observada diminuição da capacidade fagocítica dos monócitos do sangue periférico dos pacientes com a forma indeterminada. Todavia essa redução não alterou o nível intracitoplasmático de óxido nítrico. Por outro lado, o tratamento de pacientes com a forma cardíaca não alterou a capacidade fagocítica e favoreceu a expressão das citocinas IL-10 e TGF- β pelos monócitos (Campi-Azevedo *et al.*, 2015).

Neste estudo, a análise histológica do átrio direito dos animais infectados mostrou a presença de infiltrados inflamatório no coração, com aumento significativo do número de células no miocárdio dos grupos infectados com as cepas Y e Colombiana na fase crônica em comparação ao grupo não infectado, similar ao observado na fase crônica da infecção experimental no modelo canino (Caliari *et al.*, 2002; Guedes *et al.*, 2009; Diniz *et al.*, 2010). Ao avaliar o infiltrado inflamatório cardíaco de pacientes com CCC este é composto predominantemente por linfócitos T CD8⁺. Contudo, vale a pena salientar que esta inflamação tecidual depende de linfócitos previamente sensibilizados (Higuchi *et al.*, 1997).

Todavia, esta inflamação cardíaca descrita na infecção chagásica foi controlada frente ao tratamento com Bz na fase aguda, não sendo observada diferença significativa no número de células no átrio direito dos grupos de cães NIBz, YBz e ColBz, com exceção de somente um animal do grupo ColBz, que apresentou focos de infiltrado inflamatório. Esse quadro de inflamação cardíaca em um animal do grupo infectado com a cepa Colombiana e tratado é compreensível, visto que, esta cepa é

miotrópica e que respostas distintas podem ser desencadeadas frente ao tratamento, em diferentes indivíduos. Porém, de modo geral, o tratamento com Bz teve importante papel ao controlar a lesão e inflamação cardíaca, tal como demonstrado por Olivieri *et al.* (2010) e Oliveira-Silva *et al.* (2015) em camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi*.

Quanto à análise da fibrose cardíaca, observamos aumento da área de colágeno no miocárdio no grupo infectado com a cepa a Y em comparação aos outros dois grupos experimentais (NI e Col). Esta fibrose é caracterizada pela deposição de colágeno intrafascicular, tal como previamente descrito em outros estudos com o modelo experimental canino por Lana *et al.* (1992), Guedes *et al.* (2009) e Diniz *et al.* (2010). Estas áreas de fibrose acarretam na desorganização e isolamentos dos cardiomiócitos, o que provavelmente contribui para as alterações eletrocardiográficas observadas tanto no modelo canino quanto na CCC (Caliari *et al.*, 2002; Caldas *et al.*, 2013). Contudo, frente ao tratamento com Bz não foi observada diferença significativa na área de fibrose no átrio direito dos animais infectados em relação aos não infectados. Os dados sugerem que a terapia com Bz controlou a deposição de colágeno e formação de áreas de fibrose, independente da cepa infectante. Isso seria esperado, uma vez que o tratamento com Bz previne a deposição de fibronectina, laminina e de moléculas da matriz extracelular, quadro este já descrito na infecção chagásica experimental (Olivieri *et al.*, 2010).

No conjunto, os dados demonstram que o tratamento com Bz na fase aguda foi eficiente em controlar a infecção chagásica, semelhante ao observado por diferentes autores (Guedes *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2010; Olivieri *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012). Além disso, a terapia com Bz minimizou a inflamação e fibrose cardíaca (Olivieri *et al.*, 2010; Oliveira-Silva *et al.*, 2015).

Em pacientes chagásicos, a produção de IgG aumenta progressivamente, de maneira lenta no início da infecção, com pico de produção no 30^o d.p.i. e mantendo-se elevada até o 93^o d.p.i. (Grauert *et al.*, 1993). Semelhantemente, no presente trabalho, observamos aumento do título do anticorpo IgG-anti *T. cruzi* na infecção com as cepas Y e Colombiana entre o 9^o e o 30^o d.p.i.. Esse resultado corrobora com outros trabalhos que avaliaram o comportamento sorológico na infecção experimental com *T. cruzi* no modelo canino. Lana *et al.* (1991) observaram níveis de IgG superiores aos de IgM após a quinta semana de infecção, permanecendo até o 30^o mês de infecção no modelo canino. Carneiro *et al.* (2007) apontaram pico de reatividade de IgG no 14^o dia após a infecção experimental com a cepa Be-78 em cães sem raça definida. Essa detecção de IgG precocemente também foi observada na infecção experimental de cães da raça *Beagle* com diferentes cepas do *T. cruzi*, com aumento nos níveis de IgG a partir da segunda semana pós-infecção (Guedes, 2006).

No presente trabalho, a eficácia do tratamento com Bz foi baseada na dosagem de IgG-anti *T. cruzi* nos diferentes tempos, através da reação de ELISA, por ser a negatização da sorologia convencional a última a negatizar entre os exames (xenodiagnóstico, PCR e lise mediada pelo complemento) indicados para avaliação pós-tratamento segundo o critério clássico de cura de Cançado (2002) e WHO (2002). Aqui foi considerada negativa a sorologia abaixo do valor de corte nos tempos T4 e T5, bem como, a queda do título de anticorpos ao longo dos tempos pós-tratamento

até sua negatificação (Krettli *et al.*, 2009), identificado pela queda no título de IgG de T3 a T5, sendo a dosagem em T5 abaixo valor de corte.

Portanto, baseado nesses critérios, observamos sororeversão em 75% dos animais dos grupos YBz e ColBz aos 180 dias após o tratamento com Bz. Estes resultados corroboram com os descritos por outros pesquisadores que observaram redução significativa no nível de IgG em cães infectados com cepas Y (Diniz *et al.*, 2010) ou camundongos infectados com clones representantes das linhagens *T. cruzi* I e II (dos Santos *et al.*, 2009) e tratados com Bz na fase aguda da infecção experimental.

Semelhantemente, no acompanhamento clínico de 231 crianças tratadas com Bz na fase aguda foi observada sororeversão em 88,2% e 93,9% dos pacientes aos 18 e 36 meses pós-infecção, respectivamente (Escribà *et al.*, 2009). Ressalta-se que uma proporção significativa de casos com sorologia positiva no primeiro exame sororeverteu no segundo exame, particularmente os pacientes jovens, além disso, dentre os pacientes soropositivos no segundo exame 51% apresentavam clara tendência a sororeversão, com diminuição significativa nos títulos de anticorpo (Escribà *et al.*, 2009). Com isso, o tratamento com Bz, mesmo na fase crônica levou a diminuição do título de anticorpo anti-IgG principalmente nos pacientes tratados na forma indeterminada (Lana *et al.*, 2009), porém seu desaparecimento só pode ser observado lentamente. Pois estes mesmos pacientes que apresentaram quedas de anticorpos, permaneceram sororeativos numa avaliação realizada 5 anos mais tarde (Machado-de Assis *et al.*, 2013).

Interessantemente, ao traçar um paralelo entre os resultados observados na análise histológica com os níveis de IgG-anti *T. cruzi*, frente ao tratamento com Bz na fase aguda, observamos que nos casos de sororeversão também foi observada melhora do quadro histológico cardíaco.

Com relação aos casos em que não foi observada sororeversão, o cão 05 foi o único animal do grupo YBz a apresentar sorologia positiva aos 180 dias após o tratamento com Bz. A análise histopatológica do átrio direito deste animal mostrou processo inflamatório cardíaco semelhante aos outros animais do grupo, contudo a área de fibrose foi qualitativamente intensa comparado aos outros animais. Conjuntamente, podemos sugerir que a infecção com a cepa Y favoreceu o início da inflamação cardíaca precocemente, e que na fase crônica do único animal com sorologia positiva, o processo de reparo tecidual estava em andamento, ou seja, a lesão persistia.

Quanto ao grupo ColBz, apenas o cão 13 apresentou sorologia positiva aos 180 dias após o tratamento e este foi o único animal que apresentou focos de infiltrado inflamatório moderado no tecido cardíaco, não observado nos outros animais desse grupo. Todavia, a área de fibrose foi semelhante em todos os animais do mesmo grupo. De maneira geral, esse dado corrobora com a caracterização de que a cepa Colombiana é “silenciosa” sob o ponto de vista da resposta imunológica, o que sugere que a inflamação do tecido cardíaco possivelmente se iniciou de maneira mais lenta. Desta forma, na fase crônica, quando não houve sororeversão foi observado processo inflamatório ativo e processo de reparo inicial, enquanto que nos animais com sorologia negativa o tratamento com Bz minimizou a inflamação cardíaca.

Logo, no presente trabalho, procuramos contribuir para a melhor compreensão das alterações imunopatológicas relacionadas à DTUs distintas do *T. cruzi*, bem como, elucidar a participação do tratamento com Bz frente à infecção chagásica experimental. Entretanto, acreditamos que a avaliação da cura através de outras metodologias pode corroborar os achados relatados, bem como, ressaltamos ainda que a avaliação de outras cepas/DTUs será importante.

A infecção com cepas pertencentes a diferentes DTUs tem impacto distinto sobre a resposta imunopatológica do hospedeiro. A infecção com a cepa Y do *T. cruzi* (TcII) desencadeou uma infecção com alterações na quantidade e na expressão das células mononucleares no sangue periférico, o que pode ter favorecido a migração destes subtipos celulares para os tecidos, o que causou inflamação tecidual, e subsequente fibrose cardíaca.

A infecção com a cepa Colombiana do *T. cruzi* (TcI) favoreceu aumento do número de células da série vermelha, com discretas as alterações nas células imunes periféricas, permitindo a migração do parasito para o tecido, o que favoreceu as lesões inflamatórias, sem o início imediato do reparo cardíaco por tecido fibroso.

O tratamento com Benznidazol na fase aguda da infecção pode ter favorecido a lesão hepática e renal na fase aguda. Além disso, alterou, de modo discreto, a quantidade e expressão de algumas células mononucleares, mas a maior relevância do tratamento com Bz foi reduzir/suprimir a parasitemia na fase aguda, bem como, a inflamação e fibrose cardíaca na fase crônica independente da cepa infectante.

8.0. Referências bibliográficas

- Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E (2001). Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 17(1):99-107.
- 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(4):1433-40.
- Amato Neto V (1998). Therapeutics of the chronic form of Chagas' disease. Specific treatment of *Trypanosoma cruzi* infection. *Arq Bras Cardiol.* 70(1):63-4.
- Anais da Reunião de Debates sobre a Doença de Chagas (1963). Rio de Janeiro, Brasil, 19-21 de março de 1962. *Revista Goiana de Medicina*, 9:1-300.
- Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Silva SA, Aires AI, Soussumi LM, Covas DT, Silva LS, Andrade JG, Travassos LR, Almeida IC (2004). Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. *Am J Trop Med Hyg.* 71(5):594-7.
- Andrade LO, Galvão LM, Meirelles Mde N, Chiari E, Pena SD, Macedo AM (2010). Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105(6):834-7.
- Andrade MC, Oliveira Mde F, Nagao-Dias AT, Coêlho IC, Cândido Dda S, Freitas EC, Coelho HL, Bezerra FS (2013). Clinical and serological evolution in chronic Chagas disease patients in a 4-year pharmacotherapy follow-up: a preliminary study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 46(6):776-8.
- Andrade SG (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. *Rev. Patol. Trop.* 3:65–121.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL (1985). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ.* 63(4):721-6.
- Andrade SG, Magalhães JB (1996). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop.* 30(1):27-35.
- Andrade SG, Magalhães JB (1997). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30:27–35.
- Andrade ZA, Andrade SG (1980). Pathology of experimental Chagas disease in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 75(3-4):77-95.
- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Lima JÁ (1980). Experimental Chagas disease in dogs. Morphologic and electrocardiographic relations in the acute phase of the infection. *Arq Bras Cardiol.* 35(6):485-90.
- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M (1984). Damage and healing in the conducting tissue of the heart (an experimental study in dogs infected with *Trypanosoma cruzi*). *J Pathol.* 143(2):93-101.
- Andrade ZA, Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ (1994). Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol.* 144(6):1403-11.
- Anonymous (1999). Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94(Suppl. II):429–432.
- Aquino LPCT, Machado RZ, Alessi AC, Santana AE, Castro MB, Marques LC, Malheiros EB (2002). Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 54(1):8-18.

- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 48(2):211-21.
- Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, Luz ZM, Pereira ME, Coffman RL, Dias JC, Cançado JR, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R (1998). IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res.* 31(1):127-31.
- Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Cançado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZM, Moreira MC, Gazzinelli G, Correa-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(2):634-8.
- Baptista R de P, D'Ávila DA, Segatto M, do Valle ÍF, Franco GR, Valadares HM, Gontijo ED, Galvão LM, Pena SD, Chiari E, Machado CR, Macedo AM (2014). Evidence of substantial recombination among *Trypanosoma cruzi* II strains from Minas Gerais. *Infect Genet Evol.* 22:183-91.
- Barr SC, Gossett KA, Klei TR (1991). Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am J Vet Res.* 52(6):954-60.
- Barreto ML, Andrade ME (1994). Impact of Chagas' infection on some demographic characteristics: results of an ecological study. *Cad Saude Publica.* 10 Suppl 2:273-80.
- Ben Younès-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Tricottet V, Eisen H, Reynes M, Said G (1988). Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82(1):77-83.
- Benznidazol: 2-nitroimidazol. Ledoar Guedes Lima (Farmacêutico Responsável). Recife-PE: Laboratório Farmaceutico de Pernambuco S/A - LAFEPE, 2010. Bula de Medicamento.
- Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW (1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.*24:58.
- Berra HH, Piaggio E, Revelli SS, Luquita A (2005). Blood viscosity changes in experimentally *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 32(3):175-82.
- Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Russo M, Fonseca SG, Faé KC, Martins DG, Silva AM, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E (2007). TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 9(9):1104-13.
- Bonecini-Almeida M da G, Galvão-Castro B, Pessoa MH, Pirmez C, Laranja F (1990). Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. I. Clinical, parasitological, hematological and anatomopathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 85(2):163-71.
- Brener Z (1961). The therapeutic activity of furaltadone, furazolidone and furadantine in experimental infection of the mouse by "*Trypanosoma cruzi*". *Hospital (Rio J).* 60:947-51.
- Brener Z (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 4:389-96.
- Brener Z (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 27:347-82.
- Brener Z, Costa CA, Chiari C (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 18(6):450-5.
- Brener Z, Gazzinelli RT (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 114(2):103-10.

- Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM (1993). A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88(1):171-2.
- Bulffer RF, Castro JA, Fanelli SL (2011). Benznidazole levels in blood vary with age in rats. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(3):374-7.
- Caldas IS, Talvani A, Caldas S, Carneiro CM, de Lana M, da Matta Guedes PM, Bahia MT (2008). Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res.* 103(2):413-21.
- Caldas IS, da Matta Guedes PM, dos Santos FM, de Figueiredo Diniz L, Martins TA, da Silva do Nascimento AF, Azevedo MA, de Lima WG, Neto RM, Torres RM, Talvani A, Bahia MT (2013). Myocardial scars correlate with electrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. *Trop Med Int Health.* 18(1):75-84.
- Calviari MV, Machado RP, Lana M, Cajá RAF, Carneiro CM, Bahia MT, Santos CAB, Magalhães GA, Sampaio IBM, Tafuri WL (2002). Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 44(5):273-8.
- Camargo EP (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. i. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 6:93-100.
- Campi-Azevedo AC, Gomes JA, Teixeira-Carvalho A, Silveira-Lemos D, Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Peruhype-Magalhães V, Béla SR1, Silvestre KF, Batista MA, Schachnik NC, Correa-Oliveira R, Eloi-Santos SM, Martins-Filho AO (2015). Etiological treatment of Chagas disease patients with benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events. *Immunobiology.* 220(5):564-74.
- Campos MA, Gazzinelli RT (2004). *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm.* 13(3):139-43.
- Campos MC, Leon LL, Taylor MC, Kelly JM (2014). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Mol Biochem Parasitol.* 193(1):17-9.
- Cancado JR (2002). Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 44(1):29-37.
- Cano RC, Hliba E, Rubiolo ER (2000). Creatine kinase and lactate dehydrogenase levels as potential indicators of *Trypanosoma cruzi* infectivity and histotropism in experimental Chagas' disease. *Parasitol Res.* 86(3):244-52.
- Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, Nomizo A, Mengel J (2007). B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8⁺ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology.* 122(4):584-95.
- Cardoso JE, Brener Z (1980). Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 75(3-4):97-104.
- Carneiro CM, Martins-Filho OA, Reis AB, Veloso VM, Araújo FM, Bahia MT, Lana M, Machado-Coelho GL, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Tafuri WL (2007). Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Acta Trop.* 101(2):120-9.
- Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Yauri V, Cok J, Angulo N, Escalante H, Bern C (2013). Detection of soluble antigen and DNA of *Trypanosoma cruzi* in urine is independent of renal injury in the guinea pig model. *PLoS One.* 8(3):e58480.

- Chagas C (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o evolutivo da *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1:159-218.
- Chagas C (1916). Tripanosomíase americana. Forma aguda da moléstia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 8:37-60.
- Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari CA (1989). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop. 22(1):19-23.
- Costa SC (1999). Mouse as a model for Chagas disease: does mouse represent a good model for Chagas disease? Mem Inst Oswaldo Cruz. 94 Suppl 1:269-72.
- Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W (1997). Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. Rev Soc Bras Med Trop. 30(2):139-44.
- Cruz-Chan JV, Bolio-González M, Colín-Flores R, Ramirez-Sierra MJ, Quijano-Hernandez I, Dumonteil E (2009). Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. Vet Parasitol. 162(1-2):151-5.
- Cummings KL, Tarleton RL (2003). Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. Mol Biochem Parasitol. 129(1):53-9.
- Cutrullis RA, Moscatelli GF, Moroni S, Volta BJ, Cardoni RL, Altcheh JM, Corral RS, Freilij HL, Petray PB (2011). Benznidazole therapy modulates interferon- γ and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children. PLoS One. 6(10):e27133.
- D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, Chiari E, Galvão LM (2009). Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. J Clin Microbiol. 47(6):1718-25.
- de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM (1996). Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet. 348(9039):1407-13.
- de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, Otávio Costa Rocha M, Elói-Santos SM, Pinho RT, Correa-Oliveira R, Martins-Filho AO (2011). Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. PLoS Negl Trop Dis. 5(5):e992.
- de Castro CR, Montalto de Mecca M, Fanelli SL, de Ferreyra EC, Díaz EG, Castro JÁ (2003). Benznidazole-induced ultrastructural and biochemical alterations in rat esophagus. Toxicology. 191(2-3):189-98.
- de Ferreira HO, Prata A, Rassi A (1963). Prolonged administration of nitrofurazone in the treatment of acute Chagas' disease. Hospital (Rio J). 63:1391-6.
- de Melo AS, Lorena VMB, Braz SCM, Docena C, Gomes YM (2012). IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. Cytokine. 58(2):207-12.
- de Pontes VM, Souza Júnior AS, Cruz FM, Coelho HL, Dias AT, Coêlho IC, Oliveira Mde F (2010). Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceará. Rev Soc Bras Med Trop. 43(2):182-7.
- de Souza EM, Oliveira GM, Boykin DW, Kumar A, Hu Q, De Nazaré C Soeiro M (2006). Trypanocidal activity of the phenyl-substituted analogue of furamidine DB569 against *Trypanosoma cruzi* infection *in vivo*. J Antimicrob Chemother. 58(3):610-4.

- De Souza SM (2010). Caracterização imunohistoquímica do infiltrado inflamatório cardíaco durante a fase aguda da infecção experimental de cães por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 77f.
- Dias E (1934). Estudos sobre *Schizotrypanum cruzi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 28: 1-110.
- Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G (1956). Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 14(6):1035-60.
- Dias JC (1987). Control of chagas disease in Brazil. *Parasitol Today*. 3(11):336-41.
- Dias JC (1989). The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 22(3):147-56.
- Dias JC. Epidemiology of Chagas disease. (1992). In S Wendel, Z Brener, M S Camargo, A Rassi (eds), *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*, ISBTBrazil'92, São Paulo, 49-80.
- Dias JCP, COURA JR (1997). Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 486 p.
- Dias JC (2006). Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saude Publica*. 22(10):2020-1.
- Dias JC (2009). Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 Suppl 1:41-5.
- Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ (1988). Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*. 44(10):880-1.
- Diniz L de F, Caldas IS, Guedes PM, Crepalde G, Lana M, Carneiro CM, Talvani A, Urbina JA, Bahia MT (2010). Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(7):2979-86.
- Docampo R, Moreno SN (1984). Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Infect Dis*. 6(2):223-38.
- Docampo R, Moreno SN (1986). Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed Proc*. 45(10):2471-6.
- Docampo R (1990). Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact*. 73(1):1-27.
- dos Santos DM, Talvani A, Guedes PM, Machado-Coelho GL, de Lana M, Bahia MT (2009). *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. *Exp Parasitol*. 121(1):8-14.
- Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, Carvalho-Parra JF (1997). Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand J Immunol*. 45(1):74-80.
- Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ (2014). Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 36(8):377-87.
- Duz AL, Vieira PM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Cardoso JM, Oliveira FC, Reis LE, Tafuri WL, Veloso VM, Reis AB, Carneiro CM (2014). The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109(8):1005-13.

- Elias FE, Vigliano CA, Laguens RP, Levinx MJ, Berek C (2003). Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 68(2):242-7.
- Engman DM, Leon JS (2002). Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop.* 81(2):123-32.
- Escribà JM, Ponce E, Romero Ade D, Viñas PA, Marchiol A, Bassets G, Palma PP, Lima MA, Zúniga C, Ponce C (2009). Treatment and seroconversion in a cohort of children suffering from recent chronic Chagas infection in Yoro, Honduras. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(7):986-91.
- Fabbro DL, Olivera V, Bizai ML, Denner S, Diez C, Marcipar I, Streiger M, Arias E, del Barco M, Mendicino D, Bottasso O (2011). Humoral immune response against P2 β from *Trypanosoma cruzi* in persons with chronic Chagas disease: its relationship with treatment against parasites and myocardial damage. *Am J Trop Med Hyg.* 84(4):575-80.
- Factor SM, Sonnenblick EH (1985). The pathogenesis of clinical and experimental congestive cardiomyopathies: recent concepts. *Prog Cardiovasc Dis.* 27(6):395-420.
- Federici EE, Abelmann WH, Neva FA (1964). Chronic and progressive myocarditis and myositis in c3h mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 13:272-80.
- Fernández MC, González Cappa SM, Solana ME (2010). *Trypanosoma cruzi*: Immunological predictors of benznidazole efficacy during experimental infection. *Exp Parasitol.* 124(2):172-80.
- 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(5):755-9.
- Fragata Filho AA, Boianain E, Silva MAD, Correia EB, Borges Filho R, Martins C, Salene V, Batlouni M, Souza E (1995). Validade do tratamento etiológico da fase crônica da doença de Chagas com benznidazol. *Arq Bras Cardiol.* 65 (Supl I):71.
- Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2(3):e24.
- Galvão LM, Nunes RM, Cançado JR, Brener Z, Krettli AU (1993). Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 87(2):220-3.
- Galvão LM, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL (2003). PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microbiol.* 41(11):5066-70.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 71(3):1185-93.
- Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvão LM, Chiari E (1998). *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol.* 88(1):28-33.
- Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS, Zaverucha do Valle T, Lagrange PH (2002). *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histol Histopathol.* 17(3):837-44.
- Gorla N, Díaz Gómez MI, Castro JA (1986). Interaction of Benznidazole reactive metabolites with rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 280(1):22-31.

- Grauert MR, Houdayer M, Hontebeyrie-Joskowicz M (1993). *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' Disease. Clin Exp Immunol. 93(1):85-92.
- Guedes PM, Veloso VM, Tafuri WL, Galvão LM, Carneiro CM, Lana Md, Chiari E, Ataíde Soares K, Bahia MT (2002). The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. Acta Trop. 84(1):9-17.
- Guedes PM (2006). Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 103f.
- Guedes PM, Veloso VM, Afonso LC, Caliani MV, Carneiro CM, Diniz LF, Marques-da-Silva EA, Caldas IS, Do Valle Matta MA, Souza SM, Lana M, Chiari E, Galvão LM, Bahia MT (2009). Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. Vet Immunol Immunopathol. 130(1-2):43-52.
- Guedes PM, Veloso VM, Mineo TW, Santiago-Silva J, Crepalde G, Caldas IS, Nascimento MS, Lana M, Chiari E, Galvão LM, Bahia MT (2012). Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Parasitol Vet. 21(2):151-6.
- Haberhorn A, Gonnert R (1972). Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. Arzneimittelforschung. 22(9):1570-82.
- Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PE, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM (2012). Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. J Antimicrob Chemother. 67(5):1261-6.
- Herrera HM, Alessi AC, Marques LC, Santana AE, Aquino LP, Menezes RF, Moraes MA, Machado RZ (2002). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. Acta Trop. 81(3):203-10.
- Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F (1997). Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. Am J Trop Med Hyg. 56(5):485-489.
- Ianni BM, Arteaga E, Mady C, et al (1993). Uso do benznidazol em chagásicos na forma indeterminada: resultados a longo prazo. Arq Bras Cardiol. 61(supl II): 130.
- Jannin J, Villa L (2007). An overview of Chagas disease treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102 Suppl 1:95-7.
- Kley S, Tschudi P, Busato A, Gaschen F (2003). Establishing canine clinical chemistry reference values for the Hitachi ® 912 using the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) recommendations. Comparative Clinical Pathology 12(2):106-12.
- Kretzli AU, Cançado JR, Brener Z (1982). Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas's disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 76(3):334-40.
- Kretzli AU (2009). The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104 Suppl 1:142-51.
- La Rue ML, Silva RAMS, De Carli GA (1997). Coagulopathy in dogs infected with *Trypanosoma* (trypanozoon) *evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. Parasitología Día 21:1-5.

- Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, Galvão LMC, Junho SD (2006). Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol.* 44(6):2167-71.
- Lamas MC, Villaggi L, Nocito I, Bassani G, Leonardi D, Pascutti F, Serra E, Salomón CJ (2006). Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *Int J Pharm.* 307(2):239-43.
- Lana M, Vieira LM, Machado-Coelho GL, Chiari E, Veloso VM, Tafuri WL (1991). Humoral immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 86(4):471-473.
- Lana M, Chiari E, Tafuri WL (1992). Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87(1):59-71.
- Lana M, Lopes LA, Martins HR, Bahia MT, Machado-de-Assis GF, Wendling AP, Martins-Filho OA, Montoya RA, Dias JC, Albajar-Viñas P, Coura JR (2009). Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(8):1139-47
- Laranja FS, Dias E. Nóbrega G (1948). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 46:473-499.
- Laranja FS, Andrade ZA (1980). Chronic cardiac form of chagas disease in dogs. *Arq Bras Cardiol.* 35(5):377-80.
- Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simões-Barbosa A, Tinoco DL, Teixeira AR (2000). Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg.* 63(3-4):111-8.
- Leal GGA, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Carneiro CM, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Francisco AF, Cardoso JM, Mathias FA, Correa-Oliveira R, Carneiro M, Coura-Vital W, Reis AB (2014). Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 205(3-4):472-82.
- Lemos JR, Rodrigues WF, Miguel CB, Parreira RC, Miguel RB, de Paula Rogerio A, Oliveira CJ, Chica JE (2013). Influence of parasite load on renal function in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* 8(8):e71772.
- Lorena VM, Lorena IM, Braz SC, Melo AS, Melo MF, Melo MG, Silva ED, Ferreira AG, Morais CN, Costa VM, Correa-Oliveira R, Gomes YM (2010). Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after *in vitro* stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 72(6):529-39.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.
- Lumb G, Skacklett RS, Dawkins WA (1959). The cardiac conduction tissue and its blood supply in the dog. *Am. J. Path.* 35:467-87.
- Luz ZM, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU (1994). Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 27(3):143-8.
- Macedo V, Silveira CA (1987). Perspectivas da Terapêutica Específica na doença de Chagas. Experiências na forma indeterminada. *Rev Soc Bras Med Trop.* 20 (supl II):M-24- M-26.

- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(1):1-12.
- Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS (2000). *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. Circulation. 102(24):3003-8.
- Machado-de-Assis GF, Silva AR, Do Bem VA, Bahia MT, Martins-Filho OA, Dias JC, Albajar-Viñas P, Torres RM, Lana M (2012). Posttherapeutic cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. Clin Vaccine Immunol. 19(8):1283-91.
- Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JC, Coura JR, Machado-Coelho GL, Albajar-Viñas P, Torres RM, Lana Md (2013). A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. Mem Inst Oswaldo Cruz. 108(7):873-80.
- Mantilla JC, Zafra GA, Macedo AM, González CI (2010). Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. Hum Pathol. 41(4):610-3.
- Marcondes MCG, Borelli P, Yoshida N, Russo M (2000). Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. Microbes Infect. 2(4):347-52.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, Mattos AC, Rassi A, Morillo CA, Sosa-Estani S, Yusuf S; BENEFIT Investigators (2009). The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104 Suppl 1:319-24.
- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 146(4):601-20.
- Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A (2010). Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. Biol Res. 43(3):323-31.
- Mecca MM, Bartel LC, Castro CR, Castro JA (2008). Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. Mem Inst Oswaldo Cruz. 103(6):549-53.
- Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Palacio L, Triana-Chávez O (2011). Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. Parasit Vectors. 4:169.
- Miles MA, Cedillos RA, Pova MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V (1981). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet. 1(8234):1338-40.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A (1989). Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. Immunol Rev. 112:183-207.
- Mirowski M, Lau SH, Bobb GA, Steiner C, Damato AN (1970). Studies on left atrial automaticity in dogs. Circ. Res. 26(3):317-25.
- Miziara AN, Molina RJ, Ferreira BD, Barbosa CJ, Dias da Silva VJ, Prata A, Correia D (2006). Cardiac autonomic modulation in hypertensive patients with Chagas' disease Acta Trop. 97(2):188-95.

- Moncayo A (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(5):577-91.
- Moncayo A, Silveira AC (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1:17-30.
- Montes CL, Zuñiga EI, Vazquez J, Arce C, Gruppi A (2002). *Trypanosoma cruzi* mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation. *Clin Exp Immunol.* 127(1):27-36.
- Montilla MM, Guhl F, Jaramillo C, Nicholls S, Barnabe C, Bosseno MF, Breniere SF (2002). Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 66(4):394-400.
- Morris SA, Tanowitz HB, Wittner M, Bilezikian JP (1990). Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation.* 82(6):1900-9.
- Morris SA, Barr S, Weiss L, Tanowitz H, Wittner M, Bilezikian JP (1991). Myocardial beta-adrenergic adenylate cyclase complex in a canine model of chagasic cardiomyopathy. *Circ Res.* 69(1):185-95.
- MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde Brasil (2005). Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38 (Supl. 3):7-29.
- Müller U, Sobek V, Balkow S, Hölscher C, Müllbacher A, Museteanu C, Mossmann H, Simon MM (2003). Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur J Immunol.* 33(1):70-8.
- Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol.* 93(2):203-14.
- Murta SM, Ropert C, Alves RO, Gazzinelli RT, Romanha AJ (1999). In-vivo treatment with benznidazole 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. *Parasite Immunol.* 21(10):535-44.
- Oliveira-Silva JC, Machado-de-Assis GF, Oliveira MT, Paiva NC, Araújo MS, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Martins HR, Lana Md (2015). Experimental benznidazole treatment of *Trypanosoma cruzi* II strains isolated from children of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil, with Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(1):86-94.
- Olivieri BP, Molina JT, de Castro SL, Pereira MC, Calvet CM, Urbina JA, Araújo-Jorge TC (2010). A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents.* 36(1):79-83.
- Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C, Inglessis I (1997). Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol.* 60(1):49-54.
- Pedrosa RC, De Bem AF, Locatelli C, Pedrosa RC, Geremias R, Wilhelm Filho D (2001). Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Rep.* 6(4):265-70.
- Petkova SB, Huang H, Factor SM, Pestell RG, Bouzahzah B, Jelicks LA, Weiss LM, Douglas SA, Wittner M, Tanowitz HB (2001). The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int J Parasitol.* 31(5-6):499-511.

- Petray PB, Rottenberg ME, Bertot G, Corral RS, Diaz A, Orn A, Grinstein S (1993). Effect of anti-gamma-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett.* 35(1):77-80.
- Pissetti CW, Correia D, Braga TT, Faria GEL, Oliveira RF, Ribeiro BM, Rodrigues DBR, Rodrigues V (2014). Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- α , IFN- γ , IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009 42(4):425-30.
- Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, Marin-Neto JA, Morillo CA, Rosas F, Guhl F. Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). *PLoS One.* 7;9(3):e91154.
- Prata A (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1(2):92-100.
- Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 115(3):279-83
- Pupulin ART, Paludetto A, Silva SV, Bracht AMK (2005). Efeito do Benznidazol em fígados de ratos perfundidos. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 37(3):153-6.
- Quijano-Hernández IA, Castro-Barcena A, Aparicio-Burgos E, Barbosa-Mireles MA, Cruz-Chan JV, Vázquez-Chagoýna JC, Bolio-González ME, Dumonteil E (2012). Evaluation of clinical and immunopathological features of different infective doses of *Trypanosoma cruzi* in dogs during the acute phase. *Scientific World Journal.* 2012:635169.
- Raaflaub J, Ziegler WH (1979). Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung.* 29(10):1611-4.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JÁ (2010). Chagas disease. *Lancet.* 375(9723):1388-402.
- Reis AB, Carneiro CM, Carvalho Md, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho AO (2005). Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 103(3-4):173-85.
- Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 48(5):637-44.
- Revelli S, Le Page C, Piaggio E, Wietzerbin J, Bottasso 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(2):271-7.
- Rocha MO, Nunes MC, Ribeiro AL (2009). Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1:159-66.
- Rodrigues Coura J, de Castro SL (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(1):3-24.
- Rojas J, Palacios O, Ronceros S (2012). The effect of the essential oil from *Aloysia triphylla* britton (lemon verbena) on *Trypanosoma cruzi* in mice. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 29(1):61-8.
- Romanha AJ, Alves RO, Murta SM, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT (2002). Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis.* 186(6):823-8.

- Rottenberg ME, Riarte A, Sporrang L, Altchek J, Petray P, Ruiz AM, Wigzell H, Orn A (1995). Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett.* 45(1-2):53-60.
- Santos FM, Lima WG, Gravel AS, Martins TA, Talvani A, Torres RM, Bahia MT (2012). Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother.* 67(8):1987-95.
- Santos FR, Pena SD, Epplen JT (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet.* 90(6):655-6.
- Sardinha LR, Mosca T, Elias RM, do Nascimento RS, Gonçalves LA, Bucci DZ, Marinho CR, Penha-Gonçalves C, Lima MR, Alvarez JM (2010). The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(1):e578.
- Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho AO (2006). Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol.* 64(5):554-63.
- Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO (2009). Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1:246-51.
- Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Elói-Santos SM, Gontijo ED, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO (2012). Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. *BMC Infect Dis.* 12:123.
- Schmunis GA (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102 Suppl 1:75-85.
- Schmunis GA, Yadon ZE (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115(1-2):14-21.
- Schofield CJ, Dias JC (1999). The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol.* 42:1-27.
- Shikanai-Yasuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto V, Pereira Barreto AC, Higaki Y, Moreira AAB, Funayama G, Barone AA, Duarte A, Odone V, Cerri GC, Sato M, Pozzi D, Shiroma M (1990). Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 32:16-27.
- Silva LHP, Nussenzweig V (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 20:191-203.
- Silveira AC, Dias JCP (2011). O controle da transmissão vetorial. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44(Suplemento II):52-63.
- Silverio JC, de-Oliveira-Pinto LM, da Silva AA, de Oliveira GM, Lannes-Vieira J (2010). Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Exp Pathol.* 91(1):72-86.
- Sobrinho JLS, Medeiros FPM, La Roca MF, Silva KER, Lima LNA, Neto PJR (2007). Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas. *Revista de Patologia Tropical.* 36(2):103-18.

- Sosa-Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 59(4):526-9.
- Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damásio MP, Chaves AT, Ferreira KS, Nunes MC, Medeiros NI, Valente VA, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO (2014). Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PLoS One.* 9(3):e87082.
- Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO (2004). Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.* 72(9):5283-91
- Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO (2007). *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun.* 75(4):1886-94.
- Strauss M, Lo Presti MS, Bazán PC, Baez A, Fauro R, Esteves B, Sanchez Negrete O, Cremonezzi D, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW (2013). Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Int.* 62(3):293-299.
- Stryer L (2000). *Biochemistry.* New York: W. H. Freeman and Company.
- Tafuri WL, Lana M, Chiari E, Caliarri MV, Bambirra EA, Rios-Leite VH, Barbosa AJ (1988). Dogs as experimental models for the study of the natural course of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 21(2):77.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M (1992). Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* 5(4):400-19.
- Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT (2000). Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2(8):851-66.
- Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM (2004). Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* 38(7):943-50.
- Tibayrenc M, Ayala FJ (1988). Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42, 277-292.
- Tibayrenc M (1998). Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. *Parasitol Today.* 14(8):323-9.
- Tibayrenc M (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis.* 28;2(1):12.
- Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL, Lana M (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(1):223-30.
- Toledo MJ, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Alves CF, Martins HR, Cruz RE, Tafuri WL, Lana M (2004). Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 53(6):1045-53.

- Tostes S Jr, Bertulucci Rocha-Rodrigues D, de Araujo Pereira G, Rodrigues V Jr (2005). Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 99(2):233-7.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME (1996). Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 34(9):2143-7.
- Urbina JA (2014). Recent Clinical Trials For The Etiological Treatment Of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges And Perspectives. *J Eukaryot Microbiol.* 62(1):149-56.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Am J Pathol.* 156(5):1805-9.
- Veloso VM, Carneiro CM, Toledo MJ, Lana M, Chiari E, Tafuri WL, Bahia MT (2001). Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96(7):1005-11.
- Vieira PMdA, Francisco AF, Machado EMdM, Nogueira NC, Fonseca KdS, Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Tafuri WL, Carneiro CM (2012). Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. *PLoS One.* 7(3):e32912.
- Villar JC, Marin-Neto JA, Ebrahim S, Yusuf S (2002). Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. *Cochrane Database Syst Rev.* (1):CD003463
- Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J.* 127(1):151-62.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, Elói-Santos SM, Martins-Filho AO (2008). Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol.* 68(5):516-25.
- Vitor RW, Chiari E (1987). Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction. I. Different antigenic extracts. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 29(3):178-82.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ.* 53(1):55-65.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* 171(2):527-43.
- Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(13):5022-7.
- World Health Organization (1984). Report of the scientific working group on the development and evaluation of animal models for Chagas' disease. Geneva.
- World Health Organization (1991). Control of Chagas Disease. Report a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 95:811.
- World Health Organization (2002). Control of Chagas' disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 905.
- World Health Organization (2014). Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organ Fact Sheet, n340.

- Zafra G, Mantilla JC, Jácome J, Macedo AM, González CI (2011). Direct analysis of genetic variability in *Trypanosoma cruzi* populations from tissues of Colombian chagasic patients. *Hum Pathol.* 42(8):1159-68.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 28(1):105-12.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG; Second Satellite Meeting (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(7):1051-4.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 12(2):240-53.
- Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, Ribeiro I (2014). Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109(6):828–833.
- Zuñiga 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(3):507-15.