

Fabiane Matos dos Santos

**Evolução da cardiopatia chagásica em cães
tratados com Benznidazol na fase crônica da
infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
OURO PRETO, MG
2010

FABIANE MATOS DOS SANTOS

**Evolução da cardiopatia chagásica em cães tratados
com Benznidazol na fase crônica da infecção
experimental pelo *Trypanosoma cruzi***

Relatório final do projeto de tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a defesa de Tese do Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia dos Protozoários.

Orientadora

Profa. Maria Terezinha Bahia
Universidade Federal de Ouro Preto

Co-orientadores

Profa. Rosália Moraes Torres - Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Wanderson Geraldo de Lima - Universidade Federal de Ouro Preto

Colaborador

Prof. André Talvani – Universidade Federal de Ouro Preto

Apoio financeiro: FAPEMIG e UFOP

Ouro Preto, MG

2010

“A vida é assim:
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta:
o que ela quer da gente é:
CORAGEM!!!”

Guimarães Rosa



Ao amor eterno e incondicional de toda minha vida... MEU PAI (*Osmar Francisco dos Santos*)...

À minha família – Mãe, Vó, Fernanda e Flávia, João Filipe, Dayane, Nato, aos meus tios (em especial tia Alice e tia Angélica) - agradeço pelo constante apoio e carinho!

À Professora Maria Terezinha Bahia, agradeço pelos já quase 10 anos de orientação. É muito mais do que um grande exemplo profissional, personifica para mim o sentido das palavras confiança e sinceridade. Muito obrigada por tudo!

Ao Professor Wanderson Geraldo de Lima, muito obrigada pela dedicação e importantes ensinamentos de histopatologia. Foi um grande prazer poder trabalhar com você!

À Professora Rosália Moraes Torres, agradeço pelos agradáveis momentos e interessantíssimos ensinamentos em cardiologia e ecocardiografia. Gostei realmente muito!

Ao Professor André Talvani, agradeço pelo contínuo apoio recebido durante a realização de todo este trabalho!

À Professora Marta de Lana, obrigada pelos conhecimentos e experiências repassadas!

Ao Professor Evandro Marques de Menezes Machado, com quem também convivi no laboratório!

Ao Professor Marcelo Eustáquio Silva, obrigada pelos estudos transmitidos e disponibilidade em colaborar com minha formação acadêmico-científica.

Ao Geovam e André Gravel, agradeço pela constante dedicação e valiosas colaborações com os cães e realizações das técnicas experimentais! Muito obrigada acima de tudo pelo contínuo apoio, amizade e a convivência que jamais me esquecerei!

À Tassiane, Ivo, Lívia, Maíra, Rafael, Carol, Álvaro, Jamille, Maycon e Lílian, agradeço pelos momentos em que me auxiliaram no desenvolvimento deste estudo, colaborando com necrópsias, ou realização de ecocardiograma ou ainda com informações sobre os cuidados dispensados em técnicas de diagnóstico molecular... Muito obrigada a todos!

Aos colegas do mestrado e doutorado, personifico meu agradecimento na pessoa de Girley (Auffy), com quem continuei por mais tempo tomando cafés e pedindo colaborações...

A todos os demais colegas de trabalho do laboratório, agradeço pelos momentos com os quais pude conviver... Vitim, Jaq, Feijoadá, Madá, Gláucia, Vivian, Magna, Isabel, Dani, Renata, Régia, Guilherme, Ramon, Marcela...

Também jamais me esquecerei dos amigos que passaram pelo laboratório e que me deixaram grandes aprendizados e saudades: Vanja, Paulo, Jaila, Cristina, Stêfany... continuo agradecendo a vocês pela formação e muitas colaborações anteriores...

À Ana Salomé, pessoa cativante, sempre me despertando bons sorrisos...

À Érica, agradeço pela convivência, organização e a todos os funcionários do biotério, que sempre cuidaram dos animais com os quais trabalhamos!

À Maria Chaves, obrigada pelo grande auxílio na histopatologia!

A todos os professores do Nupeb e da escola de Nutrição da UFOP, agradeço por auxiliarem a tornar possível e real o que hoje trago comigo: a formação acadêmica com todos os ensinamentos que tanto busquei e ainda busco...

À Cida, sempre muito agradável e disponível, muito obrigada!

Meus queridos amigos: Neida, Geraldo e Maria Elisa... Grandes pilares de sustentação em minha vida “ouropretana” principalmente... Obrigada!

Agradeço à companheira de casa e amiga Alvânia, mais seu fiel cão Bruce, com quem dividi muitos momentos ainda residindo em Ouro Preto no doutorado...

Ao Igor, sempre presente, mas que embora algumas vezes eu tenha deixado de agradecer... na graduação e mestrado, no concurso da Bahia... “Muito obrigada por todo o apoio”.

À querida república Rosa-Xoque, moradoras, amigas e ex-alunas, obrigada por todos os sentimentos compartilhados... Momentos de grandes alegrias e muitos ensinamentos de vida!

“Enfim, agradeço a todos vocês, amigos que contribuíram com minha vida, principalmente quando foram como anjos de Deus, amenizando e suavizando tudo!”

“A Ti Senhor, que torna tudo possível!”

RESUMO

A eficácia do tratamento com Benznidazol (Bz) na fase crônica da infecção e conseqüente prognóstico da cardiopatia chagásica permanece controversa. Neste estudo foram avaliados os efeitos do tratamento com Bz na evolução da cardiopatia chagásica crônica, utilizando cães infectados com a cepa Berenice-78 como modelo experimental. Os animais infectados foram divididos em dois grupos experimentais: (i) 12 cães tratados na fase crônica com 7,0 mg de Bz/kg, divididos em duas doses diárias, durante 60 dias; (ii) 12 cães mantidos como controles não tratados. Outros 8 animais constituíram o grupo controle não-infectado. A parasitemia foi monitorada pela PCR realizada em amostras de sangue e tecido muscular cardíaco coletados no 1º e 12º mês após o tratamento (MAT). A potente supressão da parasitemia, induzida pelo tratamento com Bz, foi observada pelos resultados negativos em 81,9% (9 de 11) dos animais tratados em relação a 36,3% (4 de 11) nos animais não tratados quando realizada a PCR no sangue coletado no 1º MAT. Resultados semelhantes foram observados na PCR do tecido muscular cardíaco, realizada no mesmo período, quando o kDNA do parasito foi detectado somente em 33,3% (2 de 6) dos animais tratados e em 100% dos animais não tratados. Um aumento dos resultados positivos na PCR do sangue e tecido foi detectado 12 MAT. Este resultado foi verificado em 60% (3 de 5) no sangue e 80% (4 de 5) no tecido muscular cardíaco dos animais tratados. Para avaliação da cardiomegalia e função sistólica ou diastólica os animais foram examinados por ecocardiograma no 1º e 12º MAT. Foram mensurados os parâmetros fração de encurtamento, volume do Átrio Esquerdo (AE), fração de ejeção, volume diastólico e diâmetro sistólico do Ventrículo Esquerdo (VE). Após essa avaliação, metade dos animais foi eutanaziada para realização das análises histopatológicas no coração. O tratamento induziu uma redução de 20% a 36% de células inflamatórias e deposição intrafascicular de colágeno no 1º MAT. Nesta fase da infecção, não houve diferença significativa nos parâmetros ecocardiográficos mensurados entre os grupos de animais infectados (tratados ou não) e não infectados. Diferentemente, 12 MAT, as lesões cardíacas foram semelhantes entre os animais infectados (tratados ou não) e significativamente maiores que naqueles não infectados. Variáveis ecocardiográficas relacionadas com cardiomegalia e disfunção diastólica também foram semelhantes entre os animais infectados (tratados ou não) e significativamente maiores que nos animais não infectados. De modo interessante, o tratamento preveniu alterações na função sistólica, uma vez que não ocorreram diferenças na fração de ejeção e fração de encurtamento entre os animais tratados e não infectados. Esses resultados demonstram que o tratamento com Bz na fase crônica da infecção de cães é eficiente em prevenir as lesões cardíacas imediatamente após o tratamento e a função sistólica um longo tempo após o término do tratamento.

ABSTRACT

The analysis of available information reveals that the efficacy of benznidazole treatment in chronic chagasic infection is doubtful. In this study we evaluated the effect of Bz-treatment on the cardiac alterations using dogs infected with Berenice-78 strain as experimental model. The infected animals were divided in two experimental groups: (i) 12 dogs were Bz-treated at 7.0 mg/kg bid (Q12) for 60 days during the chronic phase; (ii) 12 dogs were maintained as non-treated control. Another 8 animals were maintained as non-infected control group. After the benznidazole-treatment the parasite load was monitored by blood and heart tissue PCR performed in the 1st and 12th months post-treatment (MPT). The potent suppression of parasitemia induced by Bz-treatment was associated with negative results of blood PCR performed in the 1st MPT in 81.8% (9 of 11) of treated animals in relation to 36,3% (4 of 11) in those infected and non-treated animals. Similar results were observed in heart tissue PCR in the same period, when the parasite kDNA was detected only in 33,3% (2 of 6) of the treated animals. In contrast, 100% of infected and non-treated animals showed positive tissue PCR tests. An increase of positive results in blood and tissue PCR was detected 12 MPT. This result was verified in 60% (3 of 5) of blood and 80% (4 of 5) of tissue samples obtained of Bz-treated animals. For cardiomegaly and systolic or diastolic function evaluation the animals were examined by echocardiography in the 1st and 12th MPT. The parameters fractional shortening, Left Atrium (LA) volume, Left-ventricle (LV) ejection fraction, diastolic volume and systolic diameter were measured. After this evaluation a half of animals were euthanized in the same period for histopathological analysis of heart tissue. Bz-treatment led to a reduction of around 20% to 36% of inflammatory cells and intrafascicular collagen deposition when compared to non-treated animals in the first MPT. Additionally, all animals evaluated showed echocardiographic parameters similar to non-infected animals. Differently, 12 MPT the intensity of cardiac lesions were similar to treated and non-treated animals and significantly larger than those detected in non-infected animals. Also, the echocardiographic parameters, related with cardiomegaly (LV and LA volume, LV systolic diameter) and diastolic function (LA volume), were similar among treated and non-treated animals and significantly higher than those observed in non-infected animals. Interestingly, the Bz-treatment was able to prevent alterations related to cardiac systolic functions (LV ejection and shortening fraction) such these parameters were similar to treated and non-infected animals. Taken together, the results indicate that Bz-treatment performance during the chronic phase of the dogs' infection is efficient in preventing cardiac lesions immediately after the treatment and systolic cardiac function long-time post-treatment.

ABREVIATURAS

Bz - Benznidazol
NI – Não infectado
IF – Infectado e não tratado
IF-T – Infectado e tratado
CCC – Cardiopatia Chagásica Crônica
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*
Hc - Hemocultura
IgG - Imunoglobulina G
LIT - *Liver infusion tryptose*
PCR - *Polymerase chain reaction*
RT-PCR – *Reverse-transcriptase PCR*
Nfx - Nifurtimox
pb – Pares de base
PBS - *Phosphate buffered saline*
TM - *Tripomastigota metacíclico*
TS - *Tripomastigota sangüíneo*
FE – Fração de Ejeção
FEt – Fração de Encurtamento
IMVE – Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo
VTE – Volume do Ventrículo Esquerdo
DSVE – Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo
VAE - Volume do Átrio Esquerdo
BAV – Bloqueio Átrio Ventricular
BCRD – Bloqueio Completo do Ramo Direito

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1 A doença de Chagas.....	16
1.2 A cardiopatia chagásica	21
1.3 A quimioterapia na doença de Chagas.....	25
1.4 - Doença de Chagas experimental canina	31
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Delineamento experimental.....	38
4.2 Cepa do <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
4.3 Animais.....	39
4.4 Droga.....	39
4.5 Infecção dos animais.....	40
4.6 Tratamento.....	40
4.7 Avaliação do parasitismo sanguíneo e tecidual	41
4.8 Avaliação da influência do tratamento específico na resposta imune.....	44
4.9 Avaliação das lesões e da função cardíaca dos animais necropsiados no 1º e no 12º mês após o tratamento com benznidazol.....	48
4.10 Análise estatística	53
5. RESULTADOS	54
5.1 – Grupos experimentais – Curvas de parasitemia	54
5.2 - Avaliação da influência do tratamento com benznidazol nos níveis de parasitismo sanguíneo e tecidual.....	56
5.3 - Avaliação da influência do tratamento com benznidazol nos níveis de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG 1 e IgG2.....	59
5.4 Avaliações do prognóstico cardíaco dos animais necropsiados no 1º e no 12º mês após o tratamento com benznidazol	62

6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÃO	101
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

Gráfico 1: Curvas médias de parasitemia obtidas de grupos de 12 cães sem raça definida inoculados com 4.000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal da cepa Berenice-78 do <i>T. cruzi</i> . Os animais foram posteriormente tratados com benznidazol (IF-T) ou não (IF) na fase crônica recente (de 120 a 180 dias de infecção).	55
Gráfico 2: Percentual de resultados positivos em exames parasitológicos (PCR e hemocultura) e sorológicos (ELISA) realizados no sangue dos cães inoculados com 4.000 tripomastigotas/kg de peso, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> quatro meses após a infecção	56
Gráfico 3: Percentual de resultados positivos da PCR e da hemocultura realizadas no sangue dos animais antes (AT- 4 meses de infecção) e no 1 ^o , 6 ^o e 12 ^o mês (MAT) após o tratamento com 7mg de benznidazol/kg de peso corporal de cães inoculados com 4.000 tripomastigotas sanguíneos/kg de peso, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> , e dos animais do grupo controle infectado e não tratado.....	57
Gráfico 4: Percentual de resultados positivos da reação de PCR realizada no sangue e no tecido cardíaco no 1 ^o e no 12 ^o mês após o tratamento com 7mg de benznidazol/kg de peso corporal (IF-T) de cães inoculados com 4.000 tripomastigotas sanguíneos/kg de peso, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> , e dos animais do grupo controle infectado e não tratado (IF).....	58
Gráfico 5: Anticorpos específicos da classe IgG anti- <i>T. cruzi</i> determinados por ELISA no soro de cães coletados antes, no 1 ^o , 4 ^o , 6 ^o , 12 ^o e 18 ^o mês de infecção com 4 × 10 ³ tripomastigotas/kg por via intraperitoneal da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Gráfico 6: Anticorpos específicos da subclasse IgG 1 anti- <i>T. cruzi</i> determinados por ELISA no soro de cães coletados antes, no 1 ^o , 4 ^o , 6 ^o , 12 ^o e 18 ^o mês de infecção com 4 × 10 ³ tripomastigotas/kg por via intraperitoneal da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
Gráfico 7: Anticorpos específicos da subclasse IgG 2 anti- <i>T. cruzi</i> determinados por ELISA no soro de cães coletados antes, no 1 ^o , 4 ^o , 6 ^o , 12 ^o e 18 ^o mês de infecção com 4 × 10 ³ tripomastigotas/kg por via intraperitoneal da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
Gráfico 8: Correlação entre o peso do coração e o peso do animal realizada no 1 ^o e no 12 ^o mês após o tratamento com benznidazol, ao 6 ^o e 18 ^o mês após inóculo de cães sem raça definida com a cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
Gráfico 9: Celularidade (A) e fibrose (B) no miocárdio de cães infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> e necropsiados 1 mês após o tratamento com 7mg de benznidazol /kg de peso (IF-T) durante a fase crônica recente da infecção, comparativamente aos grupos controle infectado (IF) e não infectado (NI).....	64
Gráfico 10: Celularidade (A) e fibrose (B) no miocárdio de cães infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> necropsiados 12 meses após o tratamento com 7mg de benznidazol/kg de peso (IF-T) durante a fase crônica recente da infecção, comparativamente aos grupos controle infectado (IF) e não infectado (NI)	66

Gráfico 11: Quantificação de IL-10, por ELISA de captura, no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) obtidas de animais infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e submetidos (IF-T) ou não (IF) ao tratamento com benznidazol..... 69

Gráfico 12: Quantificação de TNF- α , por ELISA de captura, no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) obtidas de animais infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e submetidos (IF-T) ou não (IF) ao tratamento com benznidazol..... 70

Gráfico 13: Fração de Ejeção de cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI)..... 72

Gráfico 14: Fração de Encurtamento mensurada por ecocardiografia em cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI)..... 73

Gráfico 15: Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo mensurado por ecocardiograma de cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg /dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI)..... 74

Gráfico 16: Volume do Ventrículo Esquerdo obtido pelo ecocardiograma de cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI)..... 75

Gráfico 17: Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo obtido pelo ecocardiograma de cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg /dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI)..... 76

Gráfico 18: Medida do Volume do Átrio Esquerdo pelo método de Simpson, após realização do ecocardiograma de cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI)..... 77

Tabela 1: Número de animais inoculados com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados no 1^o e no 12^o mês após o tratamento com Benznidazol que apresentaram índice de peso (IP) cardíaco, número de células e área ocupada pelo tecido fibroso no miocárdio maior do que a média somada a um desvio padrão do observado no tecido dos animais não infectados.....68

Tabela 2: Número de animais com a presença de alterações eletrocardiográficas comumente evidenciadas na cardiopatia chagásica.....80

Tabela 3: Classificação das alterações eletrocardiográficas.83

Figura 1: Gel de poliacrilamida com revelação dos fragmentos de 330pb do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em amostras extraídas do tecido cardíaco (seis animais) e sangue (um animal) de cães sem raça definida inoculados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com 7mg de benznidazol/kg de peso na fase crônica da doença de Chagas experimental. Os fragmentos de átrio direito foram coletados nos animais necropsiados no 1^o (1 MAT) e no 12^o (12 MAT) mês após o tratamento. B = Branco; C- = Controle Negativo; C+ = Controle positivo.....59

Figura 2: Fotomicrografias de cortes histológicos do átrio direito do coração de cães controles não infectados (NI) eutanaziados com a mesma idade dos animais infectados pela cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* (IF) e de cães tratados (IF-T) com 7mg de benznidazol/kg de peso. Os animais foram necropsiados no 1^o mês após o tratamento (seis meses após a inoculação). A, C e E – cortes histológicos corados pela Hematoxilina & Eosina; B, D e F – cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Masson.65

Figura 3: Fotomicrografias de cortes histológicos do átrio direito do coração de cães controles não infectados (NI) eutanaziados com a mesma idade dos animais infectados pela cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* (IF) e de cães tratados (IF-T) com 7mg de benznidazol/kg de peso. Os animais foram necropsiados no 12^o mês após o tratamento (18 meses após a inoculação). A, C e E – cortes histológicos corados pela Hematoxilina & Eosina; B, D e F – cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Masson.67

Figura 4: Volume do Átrio Esquerdo mensurado em imagem ecocardiográfica bidimensional do coração. NI: Cão não infectado; IF: Cão infectado com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e não tratado com benznidazol; IF-T: Cão inoculado com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratado com benznidazol. Exame realizado um ano após o tratamento específico.....78

Figura 5: Volume do Ventrículo Esquerdo mensurado em imagem ecocardiográfica bidimensional do coração. NI: Cão não infectado; IF: Cão infectado com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e não tratado com benznidazol; IF-T: Cão inoculado com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma. cruzi* e tratado com benznidazol. Exame realizado um ano após o tratamento específico.79

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas, uma zoonose cujo agente etiológico é o protozoário flagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), é endêmica no continente americano. Modificações no meio ambiente impostas pelo homem, com os desmatamentos e urbanizações de áreas primariamente silvestres, permitiram que essa zoonose adquirisse uma importante prevalência entre os homens (COURA, 2007). Atualmente, 8 a 10 milhões de pessoas desde o sul dos Estados Unidos até o Chile e Argentina estão infectadas pelo *T. cruzi* e 28 milhões permanecem em risco de adquirir a doença (OPS, 2006). A incidência anual da doença de Chagas humana é de 41.200 casos, com uma taxa de mortalidade de 12.500 indivíduos por ano (OPS, 2006).

A principal via de transmissão do *T. cruzi* é a vetorial, que corresponde a 80-90% dos casos de infecção humana, ocorrendo através da penetração das formas tripomastigotas metacíclicas em mucosas ou na pele lesionada (SCHOFIELD, 1994). Outras vias de transmissão da tripanossomíase americana, como transfusão sanguínea, transplante de órgãos e via congênita, constituem formas de contágio comuns principalmente em áreas não endêmicas, em que a presença do indivíduo chagásico crônico expõe o risco de transmissão da doença na ausência de seu clássico inseto vetor e das precárias condições ambientais necessárias para sua existência (PRATA, 2001; FORES e cols., 2007; MARTIN-DAVILA e cols., 2008). Neste contexto, e devido aos movimentos migratórios internacionais, a tripanossomíase americana passa a ocorrer com frequências que vem se elevando em países de outros continentes, como na Europa e Ásia, não sendo mais a doença de Chagas humana restrita ao continente americano (SCHMUNIS, 2007). Na Espanha foram diagnosticados entre 6.000 e 30.000 casos da forma cardíaca da doença de Chagas nos últimos anos (PEREZ e cols., 2009).

A transmissão oral da doença de Chagas, pela ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou seus dejetos, tem sido documentada em vários países tais como no Brasil, Colômbia e México. Esta via de transmissão representa um dos atuais desafios no controle epidemiológico da doença de Chagas, visto que um crescente número de casos tem sido recentemente reportado na região amazônica, em especial no estado do Pará, onde vários surtos foram relatados, principalmente via suco de frutas e cana de açúcar (PEREIRA e cols., 2009; NÓBREGA e cols., 2009; BENCHIMOL BARBOSA, 2006).

No Brasil, calcula-se que 8,2% das 5.074.000 mortes ocorridas no período de 1977 a 1983, foram provocadas por essa enfermidade (SILVEIRA, 1986). Felizmente o programa de controle da transmissão do *T. cruzi* nos países do Cone-Sul reduziu a transmissão pelo vetor *Triatoma infestans* e a transmissão por transfusão sanguínea do parasito, chegando a interromper a transmissão vetorial da doença em 12 dos 16 estados endêmicos do Brasil em 2000 (MONCAYO, 2003) e nos demais estados em 2006, nos quais a incidência do *T. cruzi* podia ser associada à presença do *Triatoma infestans* (MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Mas mesmo nas áreas onde a transmissão vetorial está controlada, ainda persiste o problema dos indivíduos na fase crônica da doença que representam um grande impacto sócio-econômico e uma das principais causas de aposentadoria precoce. Concomitante a essa existência de casos crônicos em regiões de incidência controlada, também tem sido relatado um aumento nas taxas de incidência da doença no norte do país (especialmente por transmissão oral), com sinais e sintomas clínicos de uma doença de Chagas humana um pouco diferente da conhecida desde o início do século XX (AGUILAR e cols., 2007; PINTO e cols., 2008; 2009; MARCILI e cols., 2009). Estes dados reforçam a importância da manutenção de políticas de controle desta parasitose, incluindo o papel das agências de fiscalização sanitária e de saúde em monitorar as etapas desde a coleta até a comercialização de alimentos/produtos gerados em áreas geográficas endêmicas.

A infecção pelo *T. cruzi* apresenta como consequência uma longa relação entre o parasito e o hospedeiro, que pode gerar principalmente inflamação e fibrose na musculatura cardíaca, dilatação do esôfago ou cólon e anormalidades no sistema nervoso central (MONCAYO, 1999; TAFURI, 1987; TAFURI, 1970). De modo geral, reconhece-se a presença de dois estádios na doença de Chagas: agudo e crônico, sendo no último observadas as formas indeterminada, cardíaca, digestiva, e mais raramente a forma mista (WHO, 1991).

A fase aguda da doença de Chagas é assintomática ou oligossintomática na maioria dos casos. Entretanto, em um menor número de indivíduos, após um período de incubação de cerca de sete a dez dias, podem ser observados os primeiros sinais e sintomas da doença. Nestes casos podem ser evidenciados a ocorrência de febre e outros sinais da doença aguda, como edema subcutâneo, enfartamento ganglionar, hepatoesplenomegalia e miocardite aguda acompanhada de cardiomegalia (SALGADO e cols., 1962; SALGADO, 1980; RASSI, 1979; RASSI Jr. e cols., 2000). Em crianças, as manifestações clínicas da doença aguda são geralmente mais graves, sendo observado até 10% de mortalidade em crianças infectadas menores de dois anos e não submetidas ao tratamento específico (RIBEIRO & ROCHA, 1998). De modo inusitado, casos agudos com quadros sintomatológicos mais graves têm sido relatados na região amazônica, na doença adquirida através da via oral, independente da idade em que o indivíduo é infectado (COURA, 2007; PINTO e cols. 2009).

Após cerca de 6 a 8 semanas de infecção inicia-se o estágio crônico da doença de Chagas. A fase crônica da doença de Chagas humana apresenta características bastante peculiares, podendo os indivíduos infectados apresentarem diferentes manifestações clínicas, dependentes tanto de fatores inerentes ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado. Os fatores relevantes inerentes ao parasito são: a variabilidade entre as cepas, a virulência, a antigenicidade, o tropismo e o tamanho do inóculo. Em relação ao hospedeiro vertebrado, fatores como idade, sexo, estado nutricional e o perfil da resposta imune parecem modular

diferenças nas manifestações clínicas observadas no decurso da infecção (DIAS, 2000; ANDRADE & ZICKER, 1995).

Na fase crônica da doença, o indivíduo pode apresentar as formas indeterminada, cardíaca, digestiva, mista (cardíaca e digestiva) e mais raramente a forma nervosa. A forma indeterminada pode ser encontrada em aproximadamente 60% a 70% dos indivíduos infectados, os quais permanecem totalmente assintomáticos com ausência de modificações anatômicas e fisiológicas que propiciem alterações eletrocardiográficas ou radiológicas significativas (COURA, 2007). Nas demais formas clínicas encontradas na fase crônica o indivíduo apresenta sinais e sintomas com gravidade variável. Pode ser observado envolvimento cardiovascular e/ou intestinal, ambos desencadeados por um processo inflamatório progressivo que causa destruição no músculo cardíaco e na inervação autônoma do trato digestivo do hospedeiro (BRENER, 1994). A forma cardíaca é uma importante manifestação da doença de Chagas, com o desenvolvimento de uma miocardite crônica que pode levar à cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva, bloqueios átrios-ventriculares, arritmias e tromboembolismo (TANOWITZ e cols., 1992; COURA, 2007). Nas formas digestivas são observadas dilatação do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e/ou megacólon). Essas manifestações clínicas digestivas resultam de alterações no peristaltismo do esôfago e cólon, desencadeadas por destruição do plexo mioentérico (COURA, 2007). Em análises histopatológicas, o coração e o trato digestivo normalmente apresentam infiltrado linfocitário focal (BRENER, 1992b), com fibrose e destruição de células do miocárdio (PALACIOS-PRU e cols., 1989) e a degeneração neuronal com desnervação em megaesôfago e megacólon (KÖEBERLE, 1968), respectivamente.

Os mecanismos imunopatológicos que promovem as lesões nos tecidos durante a fase crônica da doença ainda não estão completamente elucidados. A dificuldade em se detectar o parasito no miocárdio levou a postulação de teorias auto-imunes para explicar o desenvolvimento das lesões inflamatórias miocárdicas durante a fase crônica da doença. Estas

lesões poderiam ser resultantes de uma reação de auto-imunidade, causada por auto-anticorpos ou por linfócitos T auto-reativos derivados de mimetismo molecular de antígenos do parasito e do hospedeiro, ou por ativação *bystander*, com a ausência de envolvimento direto de antígenos do *T. cruzi* e participação ativa de antígenos provenientes de lesões teciduais do hospedeiro (LEON e cols., 2001; KIERSZENBAUM, 1999; COSSIO e cols., 1974; ANSELMINI e cols., 1966). Entretanto, vários estudos têm demonstrado a participação ativa do parasito na patogênese da cardiopatia chagásica crônica (HIGUCHI, 1995; HIGUCHI e cols., 1993; BARBOSA e cols., 1986). Uma correlação positiva entre a inflamação e a presença do *T. cruzi* no tecido cardíaco, assim como sua ausência em locais sem inflamação foi descrita por Belloti e cols. (1996) e Higuchi (1995) utilizando a técnica de imunoperoxidase. A presença do kDNA ou DNA nuclear do parasito também tem sido detectada em tecidos cardíacos de pacientes com lesões inflamatórias graves através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização com sondas internas específicas. Resultados concordantes foram obtidos por Vago e cols. (1996) e Lages-Silva e cols. (2001) através da amplificação de seqüências do DNA do cinetoplasto (kDNA) do *T. cruzi* em tecidos do esôfago de pacientes com megaesôfago, sendo observada uma correlação entre a inflamação tecidual e a presença do parasito.

A presença do parasito parece ser importante para desencadear o processo de formação da miocardite chagásica crônica. Na maioria dos casos, não é possível fazer uma correlação entre a intensidade da lesão e a quantidade de antígeno e/ou DNA do parasito presente, sugerindo que o parasito (envolvendo características genéticas inerentes à cepa do *T. cruzi* presente) é responsável por disparar e manter o processo de patogênese no miocárdio, e que este seria amplificado por mecanismos auto-imunes que dependeriam da predisposição genética do hospedeiro (GIRONES & FRESNO, 2003; ÃNEZ e cols., 1999; BELLOTI e cols., 1996; HIGUCHI, 1995; ROWLAND e cols., 1995; JONES e cols., 1993).

1.2 A cardiopatia chagásica

A cardiopatia chagásica é a mais importante apresentação clínica da doença de Chagas, compreendendo um amplo espectro de manifestações que incluem a falência cardíaca, arritmias, bloqueios de condução, morte súbita, tromboembolismos e fibrilações (BIOLO e cols., 2010; ROCHA e cols., 2003). Mesmo na fase aguda, período em que os sintomas da doença são menos evidentes, sinais de envolvimento cardíaco podem ser observados em até 90% dos casos sintomáticos (PARADA e cols., 1997). Segundo Laranja e cols. (1956) e Kirchhoff (1996) ocorre o desenvolvimento de miocardite, cardiomegalia e falência cardíaca congestiva em um pequeno percentual do total de indivíduos agudamente acometidos pelo parasito. A ocorrência de arritmias, bloqueios cardíacos ou falência cardíaca congestiva na fase aguda são indicativos de um prognóstico ruim para a evolução crônica da patologia chagásica (PARADA e cols., 1997). Nestes casos, o eletrocardiograma (ECG) pode demonstrar baixa voltagem, alterações difusas do segmento ST e onda T, refletindo alterações na repolarização ventricular e anormalidades na condução do impulso elétrico ainda no estágio agudo da infecção (PUNUKOLLU e cols., 2007).

Entretanto, mesmo na ausência de sinais e sintomas específicos da maioria dos indivíduos infectados, após o breve tempo de duração da fase aguda, o *T. cruzi* instala-se no organismo humano, principalmente na musculatura cardíaca. Aproximadamente 95% dos pacientes apresentam recuperação espontânea na fase aguda, e na maioria dos casos evoluem para a forma indeterminada da fase crônica da infecção, com a ausência de sinais clínicos de lesões orgânicas e a silenciosa invasão celular pelo parasito (PRATA, 2001; PUNUKOLLU e cols., 2007; WHO, 2002). Contudo, exames clínicos realizados em indivíduos chagásicos com a forma indeterminada monitorados por Holter ou por ecocardiografia, podem, às vezes, revelar níveis subclínicos de acometimento cardíaco (BARRETTO & IANNI, 1995).

O envolvimento cardíaco é o mais importante aspecto clínico da doença de Chagas, tanto pela maior frequência quanto pela maior gravidade entre os casos sintomatológicos descritos (PRATA, 2001). É na fase crônica, após vários anos de seu início, que aproximadamente 10% a 40% dos indivíduos infectados apresentam sinais clínicos evidentes do envolvimento crônico de vários órgãos, principalmente o coração (PRATA, 2001). Importantes ferramentas são utilizadas no monitoramento da função cardíaca em indivíduos chagásicos, entre elas o eletrocardiograma (ECG) e o ecocardiograma. A presença de alterações eletrocardiográficas constitui elemento fundamental na caracterização de comprometimento cardíaco significativo na doença de Chagas. O ECG tem sido o recurso básico utilizado ao longo do tempo para o diagnóstico clínico e topográfico da cardiopatia chagásica, tanto aguda como crônica, ensejando a terapêutica mais adequada e mostrando em populações não selecionadas o peso médico-social da doença, além de conseguir indicar a evolução dos casos, individualmente (SVS, 2005; GARZÓN e cols., 1994; LARANJA, 1949; PSH, 1985; WHO, 2002). Inúmeros estudos epidemiológicos vêm demonstrando que pacientes com um exame de ECG normal têm uma excelente expectativa média de vida útil, e a ocorrência de disfunção ventricular esquerda severa, o principal marcador prognóstico da doença de Chagas, é raramente descrita nesses indivíduos (RIBEIRO & ROCHA, 1998; MAGUIRE e cols., 1987). Por outro lado, quanto maior o número e a gravidade das alterações de ECG registradas em um mesmo traçado, mais possivelmente avançadas se encontram as lesões miocárdicas e pior será o prognóstico (RASSI Jr. e cols., 2001).

Por sua vez, a ecocardiografia constitui uma técnica não invasiva muito importante na avaliação do acometimento cardíaco na doença de Chagas. O ecocardiograma permite o reconhecimento da disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, o envolvimento do ventrículo direito, e anormalidades regionalizadas de contratilidade, incluindo os típicos aneurismas apicais evidenciados na cardiopatia chagásica (BIOLO e cols., 2010). A identificação de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, correlacionada à variável fração

de ejeção mensurada no ecocardiograma, é de extrema relevância pelo fato deste se constituir o mais forte preditor de morbidade e mortalidade na doença de Chagas (NUNES e cols., 2008; RIBEIRO e cols., 2008; CARRASCO e cols., 1994; VIOTTI e cols., 2005).

Uma alternativa para a prevenção da morte cardíaca súbita, o mais freqüente mecanismo de morte na cardiopatia chagásica, segundo Rassi e cols. (2001), é a realização de uma avaliação prognóstica proposta recentemente, a qual engloba a identificação de três fatores de risco: a fração de ejeção do ventrículo esquerdo abaixo de 50% mensurada por ecocardiograma, taquicardias ventriculares monitoradas por sucessivos ECG e a longitude do complexo QRS maior que 133 milissegundos na derivação D2 do ECG. Estes fatores em conjunto permitem dividir os pacientes em três grupos de risco e conseqüentes prognósticos clínicos: (i) baixo risco, com mortalidade em 1% do grupo; (ii) risco indeterminado, com 20% de chance em vir a óbito e (iii) alto risco, nos quais ocorre a identificação dos três fatores de risco descritos acima e a taxa de mortalidade gira em torno de 50% (RIBEIRO e cols., 2008). A intervenção terapêutica e o amplo cuidado com o indivíduo chagásico devem ocorrer de acordo com a prévia classificação desse escore prognóstico, embora não se saiba os mecanismos reais que desencadeiem uma patologia mais grave em alguns, mais branda ou até mesmo inexistente em outros.

Vários estudos têm sido realizados com as ferramentas clínicas disponíveis para a melhor descrição dos eventos da disfunção cardíaca (RIBEIRO & ROCHA, 1998; MAGUIRE e cols., 1987; TORRES, 2004; NUNES e cols., 2008; RIBEIRO e cols., 2008). Entretanto, poucos são os trabalhos realizados para melhor avaliar a evolução da cardiopatia chagásica em hospedeiros vertebrados tratados na fase crônica e seus mecanismos patogênicos, com a presença ou ausência do parasito desencadeando perfis específicos da resposta imune. A patogênese da cardiopatia chagásica ainda não está muito bem esclarecida, principalmente porque suas manifestações clínicas resultam de uma estreita e complexa relação entre o hospedeiro e o parasito ao longo da infecção (HIGUCHI, 2003; BIOLO e cols., 2010). Entre

os principais mecanismos patogênicos sugeridos para a ocorrência das lesões cardíacas encontram-se: (i) o dano histopatológico direto do parasito ao miocardiócito; (ii) as lesões desencadeadas pelos produtos da resposta imune alimentada ou não pela direta ou indireta presença do parasito; (iii) a disautonomia, com evidências patológicas e funcionais de desnervação cardíaca e (iv) os desequilíbrios microvasculares, com anormalidades funcionais e estruturais na microcirculação, possivelmente associados a eventos inflamatórios que culminam com a elevação nos níveis de tromboxano A-2 e endotelina-1, formação de trombos plaquetários, manifestações de vasoespasmos e isqueminas focais (MARIN-NETO e cols., 2007; ROSSI & BESTETTI, 1995; ROSSI, 1990; TANOWITZ e cols., 1990; TANOWITZ e cols., 1996).

O mecanismo exato pelo qual o parasitismo desencadeia as lesões teciduais na fase crônica não é bem estabelecido, e a relação definitiva de causa-efeito da persistência do parasito para a progressão da doença ainda não está conclusivamente demonstrada. Embora a agressão direta do parasito à célula seja um possível mecanismo de destruição celular e gênese provável dos processos de fibrose tecidual, a estimulação da resposta imune pelo parasito parece ser a causa mais provável de inflamação e fibrose (MARIN-NETO e cols., 2007; PUNUKOLLU e cols., 2007). Acredita-se que a persistência do parasito seja um ativador da infiltração linfocitária no miocárdio, sendo, pois a presença de antígenos do *T. cruzi* ou seu material genômico descritos em focos inflamatórios (TARLETON, 2001; PALOMINO e cols., 2000).

Dada a importância dos mecanismos imunológicos para o desenvolvimento da miocardite difusa decorrente de miocitólises e fibroses reparativas, é plausível pensar que o perfil da resposta imune possa estar relacionado com a evolução clínica da doença. A presença de linfócitos e macrófagos nos infiltrados inflamatórios pode estar diretamente relacionada ao processo de fibrose, pela produção de citocinas, de fatores de crescimento que induziriam a destruição tecidual e ativariam a fibrogênese (REIS e cols., 1997). Ferreira e

cols. (2003) demonstraram a associação dos níveis mais elevados da citocina TNF- α em pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC) e significativa disfunção do ventrículo esquerdo, quando comparados com pacientes na forma indeterminada da infecção. Os autores sugeriram que o TNF- α pode ter um importante papel na gênese e formação das lesões e das disfunções cardíacas verificadas na CCC.

A resposta imune inflamatória, com acentuados períodos recorrentes de exacerbações, pode ser a principal responsável pelos danos neurológicos progressivos, alterações circulatórias, deformações do tecido cardíaco e a conseqüente falência do órgão (HIGUCHI, 2003). Vitteli-Avelar e cols. (2008), Samudio e cols. (1998) e D'Ávila e cols. (2009) demonstraram que indivíduos portadores da forma crônica indeterminada ou na fase crônica recente da doença de Chagas apresentam predominantemente um perfil de citocinas regulatórias, ao passo que indivíduos com a forma cardíaca apresentam um perfil dominante de citocinas inflamatórias. Resultados semelhantes foram obtidos por Guedes e cols. (2009) utilizando o modelo experimental canino.

A participação da resposta imune humoral no decurso da cardiopatia chagásica também tem sido evidenciada. De acordo com Guedes e cols. (2008) o perfil das subclasses IgG1 e IgG2 está correlacionado com a ocorrência de cardiomegalia em cães da raça *Beagle* experimentalmente infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*.

1.3 A quimioterapia na doença de Chagas

Após um século da descoberta da tripanossomíase americana (CHAGAS, 1911) ainda não existe um medicamento capaz de induzir a cura parasitológica em todas as fases da doença de Chagas.

Embora grandes avanços tenham sido alcançados no controle vetorial e da transmissão por transfusão sanguínea do parasito, o tratamento etiológico da infecção pelo *T. cruzi* não

teve grandes avanços nos últimos 30 anos. Os medicamentos recomendados para o tratamento da tripanossomíase americana foram disponibilizados clinicamente em 1967 pela Bayer (nifurtimox, Lampit[®]) e em 1972 pela Roche (benznidazol, Rochagan[®] ou Radamil[®]) (PÉREZ-MOLINA e cols., 2009). Ambos os fármacos apresentam limitações, que incluem a eficácia variável, a toxicidade, a necessidade de longos cursos de administração, a resistência e efeitos colaterais, combinados a outros fatores (CROFT, 1999).

Até 1970 não havia nenhum medicamento disponível para o tratamento da doença de Chagas, quando então os dois fármacos nitro-heterocíclicos foram introduzidos, nifurtimox (Nfx) e benznidazol (Bz). O Nfx (descontinuado no Brasil) atua através da redução do grupo nitro em radicais nitroanions instáveis que produzem metabólitos oxigenados reduzidos altamente tóxicos, como anions superóxidos e peróxido de hidrogênio (DOCAMPO, 1990). O *T. cruzi* tem sido considerado deficiente em mecanismos de detoxificação para metabólitos oxigenados, particularmente o peróxido de hidrogênio, sendo mais sensível ao “stress oxidativo” que as células dos vertebrados. O Bz também age através de estresse redutivo, o qual envolve reações covalentes de macromoléculas pela nitrorredução de radicais intermediários e vários componentes celulares, como DNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (DIAZ DE TORANZO e cols., 1988; DOCAMPO, 1990). Tanto o Nfx quanto o Bz atuam sobre o genoma do *T. cruzi*. Ambos inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas (STOPPANI, 1999).

A eficácia e tolerância ao Bz podem ser inversamente correlacionadas com a idade do paciente (STREIGER e cols., 2004) e seus efeitos colaterais são mais freqüentes em pacientes idosos (CANÇADO, 2002). Os principais efeitos colaterais descritos pelos fármacos nitro-heterocíclicos são correlacionados à atividade enzimática de nitrorredução e geração dos radicais livres tóxicos. Essa atividade enzimática é mais reduzida em crianças e adultos jovens, o que pode justificar a menor incidência de efeitos colaterais nestes grupos etários (CANÇADO, 2002). A toxicidade desses fármacos pode ser exercida por ação direta dos

radicais nitroaniônicos (EDWARDS, 1993; STOPPANI, 1999), geração de radicais livres oxigenados (DOCAMPO e cols., 1981; DOCAMPO, 1990) e produção de radicais nitrosos e da hidroxilamina, de citotoxicidade conhecida (EDWARDS, 1993; STOPPANI, 1999), todos considerados produtos da atividade enzimática de nitrorredução.

O Nfx e o Bz apresentam alta eficácia no tratamento da fase aguda da doença de Chagas, sendo observados índices que variam de 40% a 76% de cura parasitológica (ANDRADE e cols., 1992; CANÇADO, 1999; CANÇADO, 2002). A quimioterapia com Bz também é eficaz no tratamento de crianças, provavelmente na fase crônica recente da doença de Chagas. Sosa-Estani e cols. (1998, 1999), na Argentina, verificaram pelo menos 62% de cura em triagem clínica para testar a eficácia e tolerância do Bz em crianças com a forma indeterminada da infecção pelo *T. cruzi*. Nesse estudo o critério de cura foi estabelecido pela negatização de testes sorológicos após quatro anos do tratamento com Bz. No Brasil, Andrade e cols. (2004) verificaram 84,7% de negatização dos testes sorológicos e nenhuma alteração eletrocardiográfica em crianças infectadas pelo *T. cruzi*, após seis anos de tratamento com Bz. Por outro lado, o tratamento com Bz de crianças e adolescentes chagásicos de duas diferentes regiões, induziu níveis de 0 a 5,4% de cura na Bolívia e de 58 a 87% de cura na Guatemala e Honduras (YUN e cols., 2009). Estes resultados mostram a importância da implementação de programas de diagnóstico e tratamento da doença de Chagas, mesmo nas regiões rurais mais remotas. A variabilidade aparente na eficácia do tratamento de crianças e adolescentes pode ser um reflexo direto das diferenças genéticas entre as populações de parasitos e de hospedeiros provenientes de regiões geográficas distintas.

Por outro lado, na fase crônica, os resultados da quimioterapia com Bz e Nfx revelam pouca variabilidade: o tratamento com ambos os fármacos apresentam baixa eficácia na doença de Chagas crônica. Os percentuais de cura variam entre zero a 30% na fase crônica (CANÇADO e cols., 1979; GALVÃO e cols., 1993; CANÇADO, 1997; BRAGA e cols., 2000). Braga e cols. (2000), utilizando a PCR como controle de cura, detectaram 0% de cura

parasitológica em pacientes crônicos tratados com Nfx e Bz. Além disso, os significativos efeitos colaterais que ambos os fármacos apresentam, como anorexia, vômitos, polineuropatia periférica e dermatia alérgica, podem levar à interrupção do tratamento (CANÇADO, 2002).

As razões para a marcada diferença na eficácia antiparasitária dos compostos nitro-heterocíclicos nas fases aguda e crônica da doença não são bem determinadas. Entretanto, podem estar relacionadas às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis destes compostos, como a meia-vida relativamente curta e a limitada penetração tecidual (RAAFLAUB & ZIEGLER, 1979; RAAFLAUB, 1980; WORKMAN e cols., 1984). Estes fatores podem dificultar a sua ação na fase crônica da doença, quando os parasitos estão limitados principalmente aos tecidos e sofrem lenta replicação (URBINA, 2009). Além disso, verificar com eficácia a cura parasitológica em indivíduos tratados durante a fase crônica, quando os níveis de parasitos circulantes encontram-se extremamente baixos ou indetectáveis, permanece um problema desafiador, mesmo com a utilização de testes mais sensíveis como a PCR (MARTINS e cols., 2008).

A baixa eficácia do tratamento durante a fase crônica associada a suspeita do envolvimento de fenômenos auto-imunes na gênese das lesões cardíacas (ACOSTA e cols., 1985) levaram ao abandono do tratamento específico dos indivíduos chagásicos crônicos. Na década de 90, porém, a demonstração da importância da presença do parasito na persistência das lesões durante a fase crônica da doença de Chagas (KALIL e cols., 1993; HIGUCHI e cols., 1993) causou a retomada do estímulo aos estudos relacionados à quimioterapia da doença de Chagas.

Controvérsias sobre a eficácia do tratamento com Bz, especialmente durante a fase crônica, ainda permanecem. De acordo com a hipótese da importância da presença do parasito na gênese das lesões durante a fase crônica da doença de Chagas, o tratamento específico pode diminuir a carga parasitária em tecidos infectados, e dessa forma reduzir a intensidade

dos processos inflamatórios associados com as formas crônicas da tripanossomíase americana (URBINA & DOCAMPO, 2003). Entretanto, os baixos índices de cura detectados na fase crônica, associados aos efeitos adversos induzidos pelo tratamento com os nitrofuranos (Nfx) e nitroimidazoles (Bz), fazem ainda com que muitos clínicos permaneçam com fortes reservas quanto ao tratamento de indivíduos chagásicos crônicos (URBINA & DOCAMPO, 2003).

A capacidade de um fármaco induzir a cura parasitológica em indivíduos com infecção aguda ou crônica, possuir atividade em pequenas doses, apresentar ausência de efeitos colaterais significativos e baixa probabilidade para o desenvolvimento de parasitos resistentes, são os requerimentos mais importantes que se buscam em um medicamento para o tratamento da doença de Chagas (BRENER, 1984). A procura por novos compostos com atividade tripanocida, com baixas toxicidades e elevados níveis de eficácia durante a fase crônica permanece. Estudos com Inibidores da Biossíntese de Ergosterol (EBIs), amplamente utilizados no tratamento de infecções fúngicas (VANDEN-BOSSCHE & MARICHAL, 1992), vêm demonstrando a eficácia de alguns destes compostos, tais como D0870 (Astra-Zeneca Pharmaceuticals), posaconazole (SCH 56592; Schering-Plough Research Institute), TAK-187 (Takeda Chemical Company) e albaconazole (UR-9825; Uriach & Company, Barcelona, Spain), em induzir cura parasitológica em ambas as fases da doença de Chagas experimental, aguda e crônica, com baixos níveis de toxicidade para os hospedeiros (LIENDO e cols., 1998; URBINA, 2002; URBINA e cols., 1996; 1998; 2003; MOLINA e cols., 2000a; 2000b; GUEDES e cols., 2004). Entre esses compostos, apenas o Posaconazole está disponível no comércio para o tratamento de micoses profundas, e será avaliado para o tratamento da doença de Chagas humana, com triagem clínica programada para ser iniciada ainda em 2010 (URBINA, informação pessoal).

Embora o principal efeito que se busque na quimioterapia seja a cura parasitológica, a possibilidade de que o fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas humana, o Bz, possa apresentar efeito benéfico na prevenção da progressão da doença poderia justificar

sua utilização. Alguns autores têm demonstrado a redução da fibrose, das lesões e disfunções fisiológicas em animais experimentalmente infectados com o *T. cruzi* e submetidos ao tratamento específico (ANDRADE e cols., 1989; SEGURA e cols., 1994; GARCIA e cols. 2005; BUSTAMANTE e cols., 2007). Na doença de Chagas humana, alguns estudos têm relatado a negatificação da sorologia, em crianças abaixo de 12 anos, após a quimioterapia com o Bz (ANDRADE e cols., 1996; CANÇADO, 1997; FERREIRA, 1990). Fragata-Filho e cols. (1995) acompanhando chagásicos crônicos por longos períodos demonstraram uma evolução clínica desfavorável, com um aumento das alterações eletrocardiográficas entre os indivíduos não tratados quando comparados aos indivíduos tratados. Viotti e cols. (1994, 2006) e Fabbro De Suasnabar e cols. (2000) demonstraram que o tratamento de indivíduos chagásicos com Bz durante a fase crônica induz a uma diminuição da progressão de alterações eletrocardiográficas e para a cardiopatia chagásica, em relação aos não tratados. Além disto, os indivíduos tratados apresentaram a negatificação da sorologia ou mostraram um decréscimo dos níveis de anticorpos mais freqüentemente que os não tratados.

Por outro lado, Braga e cols. (2000) observaram 0% de cura parasitológica em indivíduos com infecção crônica pelo *T. cruzi* e tratados durante 30 a 60 dias com Bz ou Nfx. Trinta e quatro indivíduos chagásicos crônicos, com pelo menos dois entre três testes sorológicos positivos para a infecção, e dezessete indivíduos controles com testes sorológicos negativos para o *T. cruzi* formaram o grupo de estudo. Os autores usaram a PCR quantitativa para monitorar a eficácia do tratamento, e observaram que a carga parasitária foi semelhante entre os indivíduos tratados e não tratados. De modo semelhante, Lauria-Pires e cols. (2000) não observaram diferenças na evolução da doença de Chagas (10 anos após o tratamento) entre indivíduos chagásicos crônicos tratados com Bz e indivíduos não tratados. Estes resultados e as progressivas alterações clínicas observadas em ambos os grupos de pacientes indicam que o tratamento da infecção crônica parece não induzir nenhum benefício (LAURIA-PIRES e cols., 2000, BRAGA e cols., 2000).

De acordo com Murta e cols. (1998), os insucessos terapêuticos verificados no tratamento da doença de Chagas podem ser relacionados, em parte, à susceptibilidade ou resistência ao fármaco entre determinadas populações do *T. cruzi* que apresentam diferentes características genéticas. De modo interessante, recentes estudos demonstraram a possibilidade de indução natural da resistência ao Bz, em algumas populações do parasito isoladas da cepa Berenice-78 após longo tempo de infecção no hospedeiro vertebrado (VELOSO e cols., 2001; CALDAS e cols., 2008).

Essas divergências apresentadas em diferentes estudos sobre a eficácia da quimioterapia com Bz na fase crônica da infecção revelam a importância da realização de maiores estudos sobre o impacto do tratamento específico na evolução da infecção crônica em seus aspectos imunopatológicos. O projeto BENEFIT, *Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*, atualmente em andamento, constitui um amplo ensaio clínico com o objetivo de melhor avaliar os efeitos do tratamento com benznidazol em indivíduos com cardiopatia chagásica crônica (MARIN-NETO e cols., 2009).

1.4 - Doença de Chagas experimental canina

Em estudos sobre a patogênese da doença de Chagas crônica faz-se necessária a utilização de um modelo experimental que reproduza fidedignamente as lesões das manifestações clínicas observadas em pacientes chagásicos. Uma vez que a progressão da doença é lenta, torna-se importante em estudos experimentais a utilização de um hospedeiro que não tenha um curto tempo de vida, tal como verificado em camundongos. Neste sentido, o cão além de possuir um tempo de vida prolongado, aproximadamente 20 anos, é altamente susceptível à infecção pelo *T. cruzi* e apresenta a evolução das fases aguda e crônica de maneira similar à infecção humana, sendo reproduzida a cardiopatia chagásica crônica (ANDRADE, 1984; TAFURI e cols., 1988; LANA e cols., 1988; 1992; CALIARI e cols., 1995; BAHIA e cols., 2002). Cães infectados com *T. cruzi* desenvolveram arritmias, ascite,

cardiomegalia e miocardite crônica difusa (ANSELMi e cols., 1965; LARANJA & ANDRADE, 1980). Andrade & Andrade (1980) inocularam 40 cães com 4×10^5 a 6×10^5 tripomastigotas/animal usando as cepas 12SF e Colombiana do *T. cruzi*, sendo observado ECG superponível ao humano nas fases aguda e crônica da doença de Chagas. Os animais apresentaram a forma indeterminada da doença, com infiltrados inflamatórios focais e rara fibrose no miocárdio. Caliarí e cols. (1995) observaram a forma cardíaca com intensa miocardite em cães infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, em contraste com cães inoculados com a cepa Berenice-62, que apresentaram focos discretos de inflamação e pequenos ninhos de amastigotas no coração.

Guedes e cols. (2002; 2004) demonstraram que o cão é um bom modelo para estudos de quimioterapia da doença de Chagas ao tratarem com Benznidazol e Alaconazol cães sem raça definida, infectados com as cepas Berenice-78, Y ou Colombiana do *T. cruzi*. Quando o tratamento com Bz foi realizado por 45 dias durante a fase aguda a percentagem de cura obtida foi de 62,5%; e semelhante ao observado em pacientes humanos, esses resultados oscilaram conforme a cepa do *T. cruzi*: (i) 87,5% de cura entre cães infectados com a cepa Berenice-78; (ii) 0% de cura entre animais infectados com a cepa Colombiana e (iii) 100% de cura entre os cães infectados com a cepa Y (GUEDES e cols., 2002). Entre os animais infectados com a cepa Berenice-78 e que foram tratados durante a fase crônica, Guedes e cols. (2002) observaram 37,5% de cura, um índice mais baixo do que aqueles (55,8% e 62%) obtidos com o tratamento de crianças, provavelmente devido ao período de tratamento utilizado, 45 dias para os cães e 60 dias para as crianças (ANDRADE e cols., 1996; SOSA-ESTANI e cols., 1998;). Adicionalmente, Guedes e cols. (2004), demonstraram que o tratamento com Bz, durante 60 dias, com início na fase aguda de cães infectados com a cepa Berenice-78, induziu 100% de cura parasitológica detectada por hemocultura, PCR e sorologia.

Outros estudos ainda utilizando o modelo cão foram realizados na avaliação da resposta imune humoral e celular verificada na infecção experimental com diferentes cepas do *T. cruzi* (GUEDES e cols., 2008; 2009; DINIZ e cols., 2010). Parâmetros da resposta imune celular tecidual também foram avaliados em associação a estudos de quimioterapia da doença de Chagas experimental (DINIZ e cols., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

A ausência de um medicamento que induza a cura parasitológica, principalmente na fase crônica da doença de Chagas, infelizmente ainda é uma realidade atual. Controvérsias permanecem a respeito da eficácia do tratamento com Bz na fase crônica. Os resultados de ensaios clínicos em pacientes chagásicos tratados com Bz durante a fase crônica são discordantes quanto aos índices de cura parasitológica, efeitos colaterais do fármaco e reais benefícios do tratamento no prognóstico do paciente.

A participação de componentes celulares e humorais na resistência à infecção tem sido estudada e demonstrada extensivamente nas últimas décadas como ferramentas do sistema imune para o controle da infecção pelo *T. cruzi*, assim como suas implicações no desenvolvimento dos mecanismos de formação de lesões e de resposta terapêutica. Entretanto, os processos imunológicos envolvidos na patogênese da doença de Chagas durante a fase crônica não estão bem estabelecidos. Desta forma, a identificação e a quantificação das lesões teciduais do coração, além do estudo dos mecanismos que as envolvem, como produção de imunoglobulinas da classe IgG e seus subtipos, além de fatores solúveis (citocinas, moléculas de adesão) que agem como sinalizadores para a realização de inúmeras funções celulares são essenciais ao entendimento da história natural da doença de Chagas. Ainda continuam escassos estudos que focalizem a correlação entre o desenvolvimento e a manutenção das diferentes formas clínicas em indivíduos chagásicos com o perfil de isotipos e subclasses de imunoglobulinas envolvidas na patogênese das lesões ou na proteção ao parasito.

Este estudo propõe investigar as consequências da utilização do Bz na fase crônica recente, assim como a sua influência na elaboração da resposta imune de um hospedeiro não chagásico, devido aos estudos controversos realizados em humanos sobre o benefício do tratamento nesta fase da doença.

Em cães tratados com Bz, foi pela primeira vez avaliada a progressão das alterações ecocardiográficas causadas pelo *T. cruzi*, logo após e um ano depois de encerrado o

tratamento administrado na fase crônica recente da infecção chagásica. Associadas aos dados ecocardiográficos de cães infectados tratados e não tratados e dos controles não infectados, somam-se as análises obtidas por eletrocardiograma nos mesmos animais e em igual período de avaliação. Pretendeu-se, dessa forma, conhecer o padrão das alterações cardíacas na evolução natural da doença e a interferência do tratamento na sua progressão, considerando-se as conseqüências da possibilidade de cura parasitológica em alguns casos, da falha terapêutica em outros, e também da relação natural entre populações sensíveis do parasito com o hospedeiro vertebrado portador de uma infecção crônica que não tenha sido submetido ao tratamento específico.

O modelo canino tem reproduzido as fases aguda e crônica da doença de Chagas o mais próximo do padrão observado na doença de Chagas humana. Estudos realizados pelo nosso grupo têm demonstrado que o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica fibrosante em cães infectados pelo *T. cruzi*, bem como os níveis de resposta terapêutica, têm apresentado resultados muito similares aos observados em pacientes chagásicos. A literatura demonstra que o cão seria, pois, dentre os animais de experimentação, aquele mais adequado, por ser o mais próximo ao modelo humano. Seu período de vida pode estender-se por 20 anos e é de fácil manuseio.

Devido a esses fatores o cão é utilizado como modelo experimental para este trabalho, no qual a infecção de cães sem raça definida com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, sensível ao Bz, é reprodutível e semelhante ao que ocorre em humanos infectados naturalmente com populações sensíveis do *T. cruzi*, e tratados com Bz na fase crônica recente da doença de Chagas. Desse modo, o estudo dos aspectos que envolvem a evolução da cardiopatia chagásica associada ao tratamento do hospedeiro vertebrado é relevante para a compreensão dos reais benefícios do tratamento específico, realizado durante a fase crônica, na prevenção da progressão das lesões teciduais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do tratamento com benznidazol, realizado durante a fase crônica da infecção, nos níveis de parasitismo sanguíneo e tecidual, no perfil de resposta imune e na evolução das lesões e da função cardíaca de cães infectados pelo *T. cruzi*.

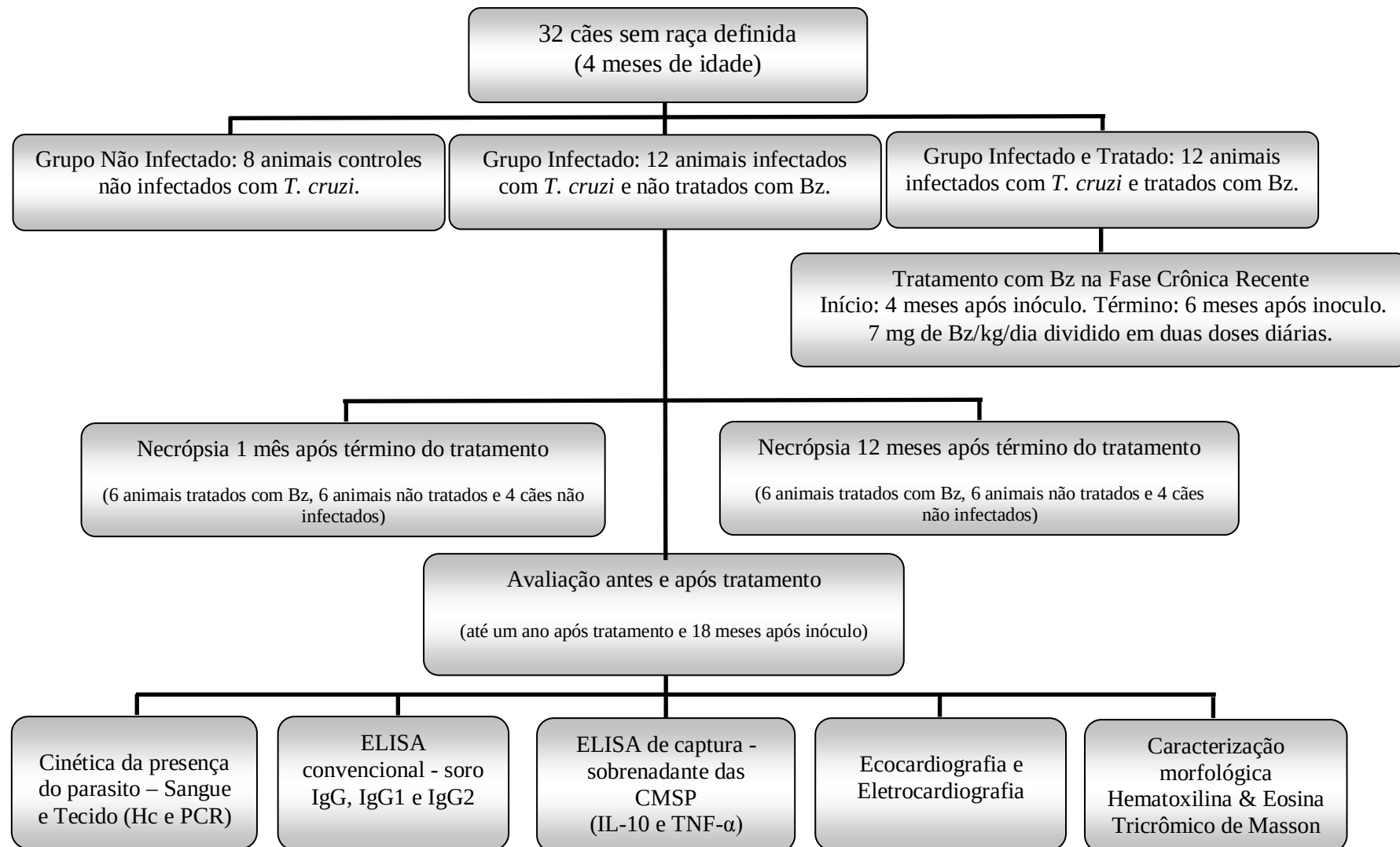
3.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar a influência do tratamento nos níveis do parasitismo sanguíneo, através dos testes de hemocultura e PCR realizados antes, no 1^o, 6^o e 12^o mês após o tratamento, sendo os resultados comparados aos do grupo controle infectado.
- 2- Avaliar a influência do tratamento nos níveis de parasitismo tecidual através da PCR realizada no tecido cardíaco (átrio direito) dos animais necropsiados no 1^o e no 12^o mês após o tratamento.
- 3- Avaliar a cinética de produção das imunoglobulinas G (IgG), e suas subclasses IgG1 e IgG2, por meio da reação *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), em cães tratados com benznidazol, comparativamente aos grupos controles infectado não tratado e não infectado.
- 4- Analisar a resposta imune celular por meio da quantificação de citocinas (IL-10 e TNF- α) no sobrenadante de cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico no 1^o e no 12^o mês após o tratamento.
- 5- Avaliar a intensidade do processo inflamatório e da fibrose no coração dos animais no 1^o e no 12^o mês após o tratamento.

- 6- Avaliar as alterações da função cardíaca monitoradas por eletro e ecocardiografia no 1º e no 12º mês após o tratamento; além da obtenção dos parâmetros de normalidade pela realização desses exames em cães com a mesma idade e não infectados com o *T. cruzi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental



4.2 Cepa do *Trypanosoma cruzi*

A cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, classificada como *T. cruzi* II, foi isolada, por meio de xenodiagnóstico, da paciente Berenice no Brasil em 1978. Este foi o primeiro caso clínico humano descrito da doença de Chagas. Esta cepa é considerada sensível à quimioterapia com Bz (VELOSO e cols., 2001).

4.3 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº 2008/08).

Foram utilizados 32 cães sem raça definida, de ambos os sexos e com quatro meses de idade. Os animais foram obtidos e mantidos no canil da Universidade Federal de Ouro Preto, sendo alimentados com ração comercial e água *ad libitum* do nascimento (após desmame) até eutanásia. Antes da inclusão no estudo, os cães foram tratados com anti-helmínticos (três doses administradas via oral aos 15, 30 e 45 dias de idade) e imunizados com a vacina Vanguard® HTLP 5/CV-L contra cinomose, adenovírus Tipo 2, coronavírus, parainfluenza, parvovirose e leptospirose canina (três doses administradas via intramuscular aos 42, 63 e 84 dias de vida).

4.4 Droga

Benznidazole, Bz - (N-benzyl-2- nitro-1-imidazolacetamide) sintetizado por Produtos Roche Q.F.S.A., Rio de Janeiro, Brasil).

4.5 Infecção dos animais

Os cães foram inoculados aos 120 dias de idade com 4×10^3 tripomastigotas sangüíneos da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*/kg de peso corporal, via intraperitoneal. A parasitemia foi avaliada diariamente, a partir do 10º dia de infecção, em sangue coletado da veia marginal da orelha dos animais e examinado ao microscópio (400×) para a contagem dos parasitos. A quantificação dos tripomastigotas foi realizada de acordo com a técnica descrita por Brener (1962) até 10 dias após a negatificação da parasitemia para a determinação do período pré-patente, do período de patência e da curva de parasitemia.

Nos animais com exame de sangue negativo a parasitemia foi confirmada pela hemocultura.

4.6 Tratamento

Os 24 animais inoculados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* foram divididos em dois grupos experimentais, sendo: (i) 12 tratados com Bz durante a fase crônica (120 dias de infecção), destes seis foram necropsiados no 1º e seis no 12º mês após o tratamento; (ii) 12 animais mantidos como grupo controle infectados e necropsiados no mesmo período dos animais tratados. Adicionalmente, foi incluído, neste estudo, o grupo controle não infectado, constituído de oito cães. Estes animais foram necropsiados com a mesma idade dos animais do grupo infectado.

Para o tratamento dos animais cada comprimido de 100mg de Bz foi macerado em gral e suspenso em 10 ml de água destilada, utilizando-se a goma arábica como agente suspensor. A suspensão foi administrada por via oral durante 60 dias consecutivos na dose de 7mg/Kg/dia, dividido em duas doses diárias, com a utilização de uma seringa de 10 ml sem agulha.

4.7 Avaliação do parasitismo sanguíneo e tecidual

A influência do tratamento nos níveis do parasitismo sanguíneo foi avaliada através da positividade dos testes de hemocultura e PCR realizados no sangue dos animais, antes, no 1^o, 6^o e 12^o mês após o tratamento com Bz, sendo os resultados comparados aos do grupo controle infectado. O parasitismo tecidual foi avaliado através da PCR realizada no tecido cardíaco (átrio direito) dos animais necropsiados no 1^o e no 12^o mês após o tratamento.

4.7.1 Hemocultura (Hc)

A hemocultura foi realizada segundo a técnica descrita por Chiari e cols. (1989) e modificada por Luz e cols. (1994). Foram coletados, assepticamente, 10ml de sangue através de punção da veia femural, utilizando-se a heparina como agente anti-coagulante.

O sangue coletado foi transferido para tubo estéril de 50ml e centrifugado a 300g por 10 min a 4°C. O plasma foi cuidadosamente removido para um tubo de 15ml contendo 5ml de meio de cultura “Liver Infusion Tryptose” (LIT) (CAMARGO, 1964). Este foi centrifugado a 900g por 30 min a 4°C. O tubo contendo as hemácias foi lavado com meio LIT e centrifugado a 300g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a camada leucocitária removida para um tubo de 15ml e suspensa em 5ml de meio LIT. Posteriormente, as hemácias foram igualmente distribuídas em dois tubos cônicos contendo 5ml de meio LIT cada. Estes tubos foram incubados em estufa a 28°C e homogeneizados suavemente uma vez por semana. Cada preparação foi examinada ao microscópio 30, 60, 90 e 120 dias depois de realizada a técnica, para a detecção de parasitos.

4.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Amostras de Sangue

Para a realização da PCR foram coletados 10ml de sangue de cada animal, através da punção da veia femural. O sangue foi transferido para tubos plásticos (Falcon) de 50ml, acrescido a igual volume de Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M (*Sigma Chemical Company, USA*) pH 8,0 (ÁVILA e cols., 1991) e fervidos por 15 min, após duas semanas (BRITTO e cols., 1993). As amostras foram estocadas à temperatura ambiente até o momento do uso.

A extração do DNA foi realizada em alíquotas de 200µl de cada amostra, transferidas para tubos de microcentrifugação de 1,5ml e misturadas a igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico 25:24:1 (*Sigma Chemical Company, USA*). Após a sua homogeneização e centrifugação por 5 min a 10.000g, o sobrenadante foi separado e esta etapa repetida novamente com o sedimento acrescido de 100µl de água deionizada estéril. Ambos os sobrenadantes foram misturados a 300µl de clorofórmio gelado, seguidos de nova homogeneização e centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e acrescido de 20µl de acetato de sódio 3M, pH 5,8 e dois volumes de etanol absoluto gelado. A mistura foi mantida em banho de gelo por 20 min, centrifugada a 10.000g por 15 min e descartada a camada líquida. Foi realizada uma lavagem adicional com 300µL de etanol 70%. Após 15 min de descanso no gelo, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 min, o sobrenadante descartado e o DNA obtido foi ressuspendido em 20µl de água deionizada estéril, o qual foi estocado a 4°C até o momento do uso.

A PCR foi processada utilizando 2µl da solução de DNA de cada amostra, MgCl₂ 50mM, água estéril, tampão 10X, KCl 750mM, dNTPs 2,5mM, 5 U/µl de Taq DNA polimerase, 25pmol de cada iniciador para um volume final de 11µl de reação.

Os iniciadores utilizados foram S35 (5'AAATAATGTACGGG (T/G)GAGATGCATGA3') e S36 (5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT3') descritos por Ávila

e cols. (1990). Estes iniciadores anelam-se às microrregiões conservadas do minicírculo do kDNA para amplificação dos fragmentos da região variável originando um produto de 330pb.

Foram realizados 35 ciclos de amplificação em um termociclador automático (*Biocycler*). As condições da reação foram: desnaturação do DNA a 95° C por 1 min (com etapa inicial mais longa por 5 min), anelamento dos iniciadores a 65°C por 1 min, extensão a 72° C por 1 min com etapa final de 10 min.

Nas etapas de preparo do DNA e mistura da reação da PCR sempre foram utilizados controles negativos com amostras de sangue de cães não infectados e controles positivos de cães infectados que se encontravam nas fases aguda e crônica da infecção.

Para evitar contaminações, as etapas de extração de DNA e da PCR e também a de revelação dos produtos amplificados foram realizadas em ambientes separados, destinados exclusivamente para cada etapa, utilizando reagentes previamente aliquotados em fluxo laminar onde não se manipula DNA. Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelados pela prata (SANTOS e cols., 1993). Foram realizadas até três extrações de DNA para cada amostra que apresentou resultados da amplificação persistentemente negativos.

4.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Amostras de Tecidos

Para a realização da PCR um fragmento de aproximadamente 10-20mg do átrio direito dos animais foi lavado exaustivamente com solução fisiológica estéril e armazenado em freezer -80°C até o momento da extração do DNA. Para a extração do DNA foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (*Catalog: A1125, Promega, USA*). Na etapa inicial da extração do DNA, os tecidos foram transferidos para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml contendo 600µL de solução de lise nuclear gelada, macerados individualmente em cada tubo e homogeneizados por 10 seg. Em seguida, foram incubados a 65°C por 30min. Para lise e

precipitação protéica das amostras foram adicionados 3µl de solução RNase ao lisado nuclear de tecido animal. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 min e após 5 min à temperatura ambiente, foram adicionados 200µl de solução de precipitação protéica. Depois de permanecerem 5 min em gelo, as amostras foram centrifugadas a 13.000g durante 4 min e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo contendo 600µl de isopropanol para precipitação do DNA extraído. Após lenta homogeneização e centrifugação a 13.000g por 1 min o sobrenadante foi descartado e adicionado ao pellet 600µl de etanol 70% à temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas várias vezes para lavar o DNA e após centrifugação a 13.000g por 1 min o etanol foi aspirado. Ao pellet seco adicionou-se 100µl de solução de re-hidratação do DNA.

O DNA extraído foi estocado à 4°C (VAGO e cols., 1996a; 2000). Para cada extração foram incluídos pelo menos um controle negativo e um controle positivo.

Os resultados foram verificados em extrações de DNA de até três fragmentos de tecidos. Foram utilizados tecidos de cães infectados com a cepa estudada e não tratados com Bz, como controles positivos da reação de PCR. As análises paralelas de tecidos/órgãos de cães não infectados foram utilizadas como controle negativo para as reações de amplificação.

Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelados pela prata (SANTOS e cols., 1993).

4.8 Avaliação da influência do tratamento específico na resposta imune

4.8.1 Avaliação da cinética de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2

A influência do tratamento nos níveis de anticorpos foi avaliada utilizando o teste sorológico ELISA em amostras de soro obtidas do sangue coletado dos animais antes, no 1º, 6º

e 12^o mês após o tratamento com Bz, sendo os resultados comparados aos realizados em amostras obtidas dos animais incluídos nos grupos controle infectado e não infectado.

A ELISA foi realizada de acordo com a técnica descrita por Voller e cols. (1976). Como antígeno foram utilizadas formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* crescidas em meio de cultura acelular (*Liver Tryptose Infusion-LIT*), após o tratamento com uma solução de NaOH 0,15M. A seguir, a solução foi neutralizada com HCl 0,15M (VITOR & CHIARI, 1987). As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry e cols. (1951) e posteriormente foi realizada a titulação em bloco visando definir a concentração mínima de proteínas para a sensibilização das placas plásticas de fundo chato com 96 poços (*Catalog number 2595, Costar, Cambridge, USA*). O conjugado utilizado para a dosagem da IgG total foi uma anti-imunoglobulina de cão do isotipo IgG obtida de soro imune de cabra e marcada com peroxidase (*Bethyl Laboratories, Montgomery, USA*). Para a dosagem das subclasses de IgG foram utilizados anticorpos anti-IgG canino das respectivas subclasses (IgG1 e IgG2) conjugados com peroxidase (*Bethyl Laboratories, Montgomery, USA*).

As placas foram sensibilizadas adicionando-se em cada poço 100µl do antígeno diluído em uma solução tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, seguida de incubação a 4^oC por 18h a 24h. Após a sensibilização, o excesso da solução antigênica foi removido por uma série de quatro lavagens com solução salina contendo *Tween-20* a 0,05% (PBS-T). Em seguida, após a adição da solução de bloqueio constituída por PBS a 5% de SFB, as placas foram incubadas a 37^oC por 30min e foram adicionados 100µl de cada soro a ser avaliado diluído em PBS-T na concentração de 1:80, e incubadas novamente a 37^oC por 45min. Após quatro lavagens foram adicionados 100µL do conjugado diluído em PBS-T (1:5000) e as placas incubadas a 37^oC por 45min. Essas foram novamente lavadas e, a partir de então, foram adicionados 100µL de tampão fosfato citrato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,03% de ortofenilenodiamino-OPD (*Sigma Chemical Company, St. Louis, USA*) e 0,012% de peróxido de hidrogênio como substrato. As placas foram incubadas por 20min a 37^oC no escuro e a reação interrompida com 32µL de uma

solução de ácido sulfúrico 2,5M. A leitura das reações foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 492nm e os resultados expressos em absorbância.

4.8.2 Avaliação dos níveis das citocinas IL-10 e TNF- α no sobrenadante da cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSC)

Esta avaliação foi realizada no 6^o e no 18^o mês de infecção (correspondente ao 1^o e 12^o mês após o tratamento). A obtenção das células mononucleares do sangue periférico foi realizada em 10ml de sangue estéril coletado assepticamente através de punção da veia femural, utilizando-se a heparina como agente anti-coagulante. Para separação do anel de linfócitos, ao sangue heparinizado foi adicionado Ficoll Hipaque (1:1) e centrifugado a $800 \times g$ por 40 min a 10⁰C. O anel de células foi coletado e após a adição de RPMI estéril, centrifugado a $110 \times g$ por 10 min a 15⁰C, sendo a seguir re-suspendidas novamente em 1ml de meio RPMI estéril para contagem e ajuste de concentração. As células obtidas foram contadas em câmara de *Neubauer* e ajustadas para a concentração de $1,0 \times 10^7$ /ml.

A cultura de CMSP para a dosagem de citocinas (IL-10 e TNF- α) foi realizada em placas de 48 poços. Para cada animal, dois poços foram estimulados com 25 μ l de antígeno de formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* e dois poços permaneceram sem estímulo. Em cada poço foram acrescentados 50 μ l de células a $1,0 \times 10^7$ /ml re-suspendidas em 450 μ l de meio CTCM com 20% SFB. O sobrenadante foi coletado no terceiro dia de cultivo e congelado a -80⁰C até realização de ELISA de captura para dosagem de citocinas.

Para a sensibilização das microplacas de 96 poços foi adicionado 100 μ l/poço dos anticorpos monoclonais (anti-IL-10/*Catalog*: MAB7351 e anti-TNF- α /*Catalog*: MAB1507, *R&D Systems Inc, Minneapolis, USA*) usando diferentes diluições em PBS, pH 7,4 e as placas incubadas por 12h a 16h em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram submetidas a três procedimentos de lavagem utilizando PBS, pH 7.4, 0,05% *Tween*. Em seguida, as placas

foram secadas com o auxílio de papel toalha e posteriormente bloqueadas utilizando PBS, pH 7.4, com 1% albumina bovina. Após adição de solução de bloqueio, as placas foram incubadas a temperatura ambiente durante 1h e realizados novamente três processos de lavagens. Após o bloqueio foram adicionados 100µl/poço das amostras e dos padrões (IL-10/*Catalog: 735-CL-010* e TNF-α/*Catalog: 1507-CT-025, R&D Systems Inc, Minneapolis, USA*) nas diferentes diluições e incubadas por 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizados mais três procedimentos de lavagem e adicionados 100µl/poço dos anticorpos de detecção biotinilados (anti-IL-10/*Catalog: BAF735* e anti-TNF-α/*Catalog: BAF1507, R&D Systems Inc, Minneapolis, USA*) usando diluições apropriadas em PBS, pH 7,4 com 1% de albumina bovina e incubadas durante 2h à temperatura ambiente, seguindo-se três procedimentos de lavagem. Em seguida foram adicionados 100µl/poço de estreptoavidina HRP (*Catalog: DY998, R&D Systems Inc, Minneapolis, USA*) em diluição de 1:200 em PBS 1% albumina bovina, e posterior incubação à temperatura ambiente durante 20min. As placas foram novamente lavadas por três vezes. A seguir, foram adicionados 100µl/poço da solução substrato (mistura diluída 1:1 de peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina/ *Catalog: DY999/R&D Systems Inc, Minneapolis, USA*) e incubadas durante 20-30min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida acrescentando 50µl/poço de H₂SO₄ 1M. A densidade óptica foi determinada utilizando-se um leitor de microplacas com filtro de 450nm.

A quantificação das citocinas presentes nas amostras foi determinada baseada na densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas das citocinas, analisadas pelo *software SOFTmax PRO 4.0* que realiza transformações em logaritmo.

4.9 Avaliação das lesões e da função cardíaca dos animais necropsiados no 1º e no 12º mês após o tratamento com benznidazol

4.9.1 Necrópsia e coleta do material

A metade dos animais de cada grupo sofreu eutanásia 30 dias após tratamento e os demais permaneceram vivos até 12 meses após o tratamento com Bz. Posteriormente à eutanásia foi realizada a necrópsia e avaliação macroscópica do coração. Para verificar a presença de cardiomegalia, o peso do órgão foi determinado e relacionado com o peso de cada animal obtendo-se um índice de peso (IP) $[(IP = \text{Peso do órgão(g)} \div \text{Peso do cão (kg)})]$.

4.9.2 Análise morfométrica do tecido cardíaco

A quantificação do número de células inflamatórias e da área ocupada pela fibrose foi realizada em fragmentos do átrio direito dos animais em cortes histológicos corados respectivamente pela Hematoxilina & Eosina (H&E) e por tricrômico de Masson.

A coloração por H&E foi realizada em fragmentos do tecido muscular estriado cardíaco para a avaliação qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório. Dois cortes seriados da parede atrial direita de cada cão, com 4µm de espessura, foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 min cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%), 10 min cada, e lavados em água corrente por 10 min e em PBS pH 7,2 por cinco minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina por 10 min, lavados em água corrente e diferenciados rapidamente em álcool acidulado, novamente lavados em água corrente e corados pela Eosina durante um minuto. Após o último processo de lavagem em água corrente, foram levados até a estufa à 56°C para secagem. Posteriormente

foram colocados em banho de xilol durante 30 min, e então, montadas as lâminas com auxílio de Entellan™.

A quantificação das células inflamatórias foi realizada em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida de $1,49 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). As imagens foram visualizadas em objetiva de 40× e digitalizadas através de microcâmera Leica DM 5000 no *software Leica Applications Suíte*. Todas as imagens obtidas foram avaliadas no analisador de imagens *Leica Q-Win plus VS*. A presença de miocardite foi determinada pela comparação dos valores obtidos na análise quantitativa dos núcleos celulares presentes nos tecidos dos animais infectados em relação aos não infectados. Neste caso, os animais infectados com o *T. cruzi* que apresentaram valores da quantificação celular maiores do que a média+desvio padrão dos valores determinados no tecido muscular estriado cardíaco dos animais não infectados foram considerados com inflamação cardíaca.

Para a análise quantitativa do tecido conjuntivo fibroso, os fragmentos cardíacos foram corados pela técnica de tricrômico de Masson. Após desparafinização e hidratação de dois cortes da parede atrial direita, estes foram corados com hematoxilina por dois min, lavados em água corrente e corados durante cinco min pela solução número 1 (90ml Sudam 1% em solução alcoólica, 10ml fucsina ácida 1% em solução aquosa e 1ml de ácido acético glacial). Posteriormente foram lavados em água corrente e corados durante 10 min pela solução número 2 (2,5g ácido fosfotúngstico, 2,5g ácido fosfomolibdico em 100ml de água destilada), novamente lavados. Em seguida foram corados por 5 min pela solução número 3 (2,5g azul de anilina, 2ml de ácido acético glacial em 100ml de água destilada), lavados e submetidos à solução de água acética 10% durante 5 min. Realizado o último processo de lavagem, os cortes foram desidratados, secos em estufa (56°C) e colocados em xilol por 30 min, seguindo-se a montagem das lâminas com auxílio de Entellan™.

Para a avaliação da área do miocárdio (átrio direito) ocupada por tecido fibroso foram obtidas 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1,49 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) de cada

corte histológico. As imagens visualizadas pela objetiva de 40× foram digitalizadas através de microcâmera do software *Leica Applications Suíte* e analisadas no software *Leica Q-win plus*. Utilizando a função de segmentação de imagens, todos os pixels com tons azuis (as fibras colágenas nesta coloração) foram selecionados para a criação de uma imagem binária e posterior cálculo da área total ocupada por fibrose nos cães infectados e pelo tecido conjuntivo fibroso normal nos cães controles. Foram considerados com relevante fibrose cardíaca aqueles animais infectados que apresentaram área de tecido conjuntivo fibroso superior à média acrescida a um desvio padrão das áreas de fibras colágenas detectadas em cães não infectados.

4.9.3 Avaliação da função cardíaca

Para avaliar a influência do tratamento com Bz, realizado durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, na evolução das alterações das funções fisiológicas cardíacas normais induzidas pela infecção com o *T. cruzi*, os animais foram avaliados pelo ecocardiograma e eletrocardiograma antes da infecção, no 1º e no 12º mês após o tratamento com Bz (aos seis e 18 meses depois da infecção).

4.9.3.1 Ecocardiografia

Para realização do exame ecocardiográfico, os cães infectados tratados e não tratados com Bz (IF e IF-T) e os animais controles não inoculados com o parasito (NI) foram anestesiados por via endovenosa com 0,5 ml/Kg de peso corporal de Tiopental sódico (0,03 g/ml de solução salina 0,9%) e em seguida foram posicionados em decúbito lateral direito, com os membros mantidos em ângulo de 90° em relação ao corpo, sobre uma superfície isolante elétrica.

A avaliação ecodopplercardiográfica foi realizada de forma sistematizada, por um só examinador experiente, utilizando-se aparelhagem de ecocardiografia portátil *Cypress* dotada dos modos Unidimensional, Bidimensional, *Doppler* pulsado, contínuo, mapeamento de fluxo em cores e adaptado para obtenção do Doppler tecidual. Utilizou-se transdutor multifrequencial de 3,0-3,5 MHz, com registro eletrocardiográfico simultâneo.

Utilizou-se a técnica convencional de exame, já estabelecida na literatura para avaliação humana (SAHN e cols., 1978; FEINGENBAUM, 1994), empregando-se as diversas modalidades do exame ecocardiográfico acima descrito. Os cortes ecocardiográficos foram realizados com o paciente posicionado em decúbito lateral esquerdo, inicialmente na posição paraesternal, onde foram obtidos os cortes longitudinais do ventrículo esquerdo e cortes transversais ao nível da valva mitral e músculos papilares e, em seqüência, na posição apical, onde foram obtidos os cortes de quatro, duas e cinco câmaras (OH e cols., 1995).

Através da análise combinada das técnicas Unidimensional, Bidimensional e *Doppler* foram avaliadas as dimensões cardíacas, a função sistólica e diastólica ventricular esquerda e a contratilidade global e segmentar do VE. Ao longo da sistemática do exame, procurou-se identificar a presença de trombos, aneurismas, regurgitações valvares, hipertensão pulmonar e alterações pericárdicas.

As medidas ao Unidimensional foram guiadas pela imagem ao Bidimensional e realizadas no pico da onda R, identificado através do registro eletrocardiográfico simultâneo de uma derivação. Foram seguidas as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia para obtenção das medidas ecocardiográficas. Foram mensurados os diâmetros diastólicos da raiz de aorta, do átrio esquerdo e do ventrículo esquerdo, a espessura diastólica do septo intraventricular, a espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo e o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. A partir dessas medidas e utilizando-se o sistema de cálculos automáticos do equipamento, foram calculados os parâmetros ecocardiográficos de avaliação da função sistólica ventricular esquerda ao Unidimensional, a fração de ejeção do ventrículo

esquerdo pela fórmula de Teichholz e cols. (1976) e o percentual de encurtamento sistólico. A massa ventricular esquerda foi calculada segundo recomendações da *American Society of Echocardiography*.

A avaliação ao Bidimensional envolveu a mensuração do volume sistólico e diastólico finais do ventrículo esquerdo, nos cortes apicais de duas e quatro câmaras, e utilizando-se da fórmula de Simpson biplanar para cálculo da fração de ejeção (WYATT e cols., 1980). Qualitativamente, foram também avaliadas, ao Bidimensional, ao *Doppler* e ao color *Doppler*, a morfologia e movimentação das valvas cardíacas, o grau de regurgitação valvar, a morfologia e dimensões das câmaras cardíacas, e espessura e textura miocárdicas. Avaliou-se, ainda, qualitativamente, a contratilidade global e segmentar das paredes do ventrículo esquerdo utilizando-se o modelo de subdivisão do ventrículo esquerdo em 16 segmentos, segundo proposto pela *American Society of Echocardiography* nas projeções paraesternal e apical (OH e cols., 1995), a presença de trombos, aneurismas e alterações pericárdicas. Sempre que possível obteve-se uma estimativa da pressão sistólica em artéria pulmonar através da mensuração da velocidade máxima da regurgitação tricúspide.

4.9.3.2 Eletrocardiografia

O eletrocardiograma constitui em registros instantâneos e consecutivos das forças eletromotrizes do coração enquanto projetadas a vários sítios da superfície corporal, delineados como uma escala em função do tempo. Foi realizado sistematicamente nos cães IF, IF-T e NI após administração endovenosa de 0,5 ml/Kg de peso corporal do anestésico Tiopental sódico (0,03 g/ml de solução salina 0,9%) por via endovenosa. Logo depois de anestesiados os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, com os membros mantidos em ângulos direitos em relação ao corpo e paralelamente um ao outro, sobre uma superfície isolante elétrica (ETTINGER & SUTER, 1970).

Foi utilizado o eletrocardiógrafo ECG 6, ECAFIX-FUNBEC, com padronização de 1mV/cm e velocidade de 50 mm/seg. Foram adaptadas agulhas metálicas 13 x 0,38mm nos eletrodos que foram introduzidos na pele dos animais durante o exame. Foram registradas as derivações periféricas bipolares clássicas (DI, DII, DIII) unipolares aumentadas (aVR, aVL, aVF) e as precordiais [V10 (CV10), rV2 (CV5RL), V2 (CV6LL) e V4 (CV6LU)]. Os traçados eletrocardiográficos foram inscritos no centro do papel termossensível e, no mínimo, 2 a 3 complexos foram obtidos por derivação. Para melhor análise, a sensibilidade do equipamento foi regulada pelo aumento ou diminuição da amplitude dos complexos inscritos (GARY e cols., 1975).

4.10 Análise estatística

O período patente e o pico máximo de parasitemia observados para os animais infectados com a cepa Berenice-78 e tratados ou não com Bz foram comparados por meio de análise de variância dos dados pelo teste de Tukey (SNEDECOR & COCHRAN, 1989). A comparação entre os níveis médios de citocinas detectadas no sobrenadante de cultura de CMSP, o número de células no tecido muscular cardíaco, a área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso no miocárdio e, as variáveis quantitativas analisadas na ecocardiografia dos cães infectados e tratados pelo Bz, dos animais infectados e não tratados e daqueles não infectados foram avaliados pelo teste de comparação múltipla Tukey, quando houve diferença ($p < 0,05$) pela Análise de Variância (ANOVA) previamente realizada.

Na realização das análises estatísticas foi utilizado o *software Prisma* versão 4.0. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 – Grupos experimentais – Curvas de parasitemia

Para este estudo 24 cães sem raça definida foram inoculados com 4.000 tripomastigotas/kg da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*. A infecção foi confirmada em 22 animais pelo exame de sangue a fresco, e em dois através da hemocultura realizada 30 dias após a inoculação. Os animais infectados foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, sendo: 12 animais tratados com Bz (IF-T) durante a fase crônica recente (120 dias de infecção) e 12 mantidos como grupo controle do tratamento, infectados e não tratados (IF). Os animais foram avaliados durante 18 meses após a infecção, sendo seis animais de cada grupo necropsiados no 6º e no 18º mês após a inoculação, que correspondem ao 1º e 12º mês após o término do tratamento. Adicionalmente, foi incluído no estudo o grupo controle não infectado (oito animais), sendo quatro necropsiados com 11 e quatro com 22 meses de vida, a mesma idade dos animais necropsiados após seis e 18 meses de infecção, respectivamente.

A parasitemia dos animais incluídos nos diferentes grupos experimentais foi avaliada diariamente pelo exame de sangue a fresco. Foi observado um período pré-patente variando entre 13 a 14 dias e o período de patência da parasitemia de 14 a 15 dias, mostrando a similaridade entre os dois grupos de animais. De forma semelhante, a curva de parasitemia foi similar entre os grupos experimentais (Gráfico 1), com picos ocorrendo no 19º e no 21º dia de infecção, no qual foram detectados uma média de 8.182 e 9.000 tripomastigotas/0,1 ml de sangue, nos grupos denominados infectado (IF) e infectado tratado (IF-T), respectivamente.

Não foi observada diferença significativa entre as médias da parasitemia detectada no sangue dos animais incluídos nos diferentes grupos experimentais ($p>0,05$).

A seguir, antes do início do tratamento com Bz (4 meses após a inoculação), foram realizados testes parasitológicos (PCR e hemocultura) e sorológicos (ELISA) no sangue dos

animais. Os testes parasitológicos foram positivos em 75% (18 em 24) e o teste sorológico em 95,8% (23 em 24) do total de animais infectados (Gráfico 2). Considerando que o animal que apresentou resultado negativo no teste sorológico também apresentou resultados negativos na hemocultura e na PCR, este foi excluído dos experimentos.

A metade dos animais infectados (12) recebeu o tratamento com 7mg de benznidazol/kg de peso corporal, dividido em duas doses diárias durante 60 dias, a partir do 4^o mês de infecção. Após o tratamento os animais foram divididos em dois grupos que foram necropsiados no 1^o e no 12^o mês após o tratamento.

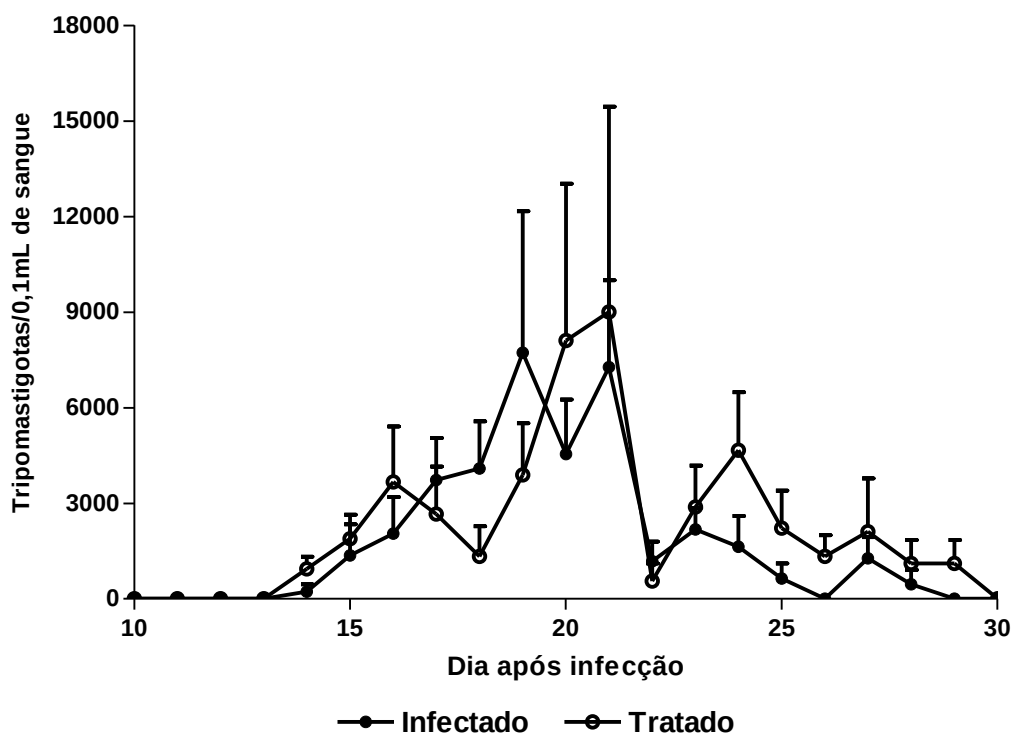


Gráfico 1: Curvas médias de parasitemia obtidas de grupos de 12 cães sem raça definida inoculados com 4.000 tripomastigotas /kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*. Os animais foram posteriormente tratados com benznidazol (IF-T) ou não (IF) na fase crônica recente (de 120 a 180 dias de infecção).

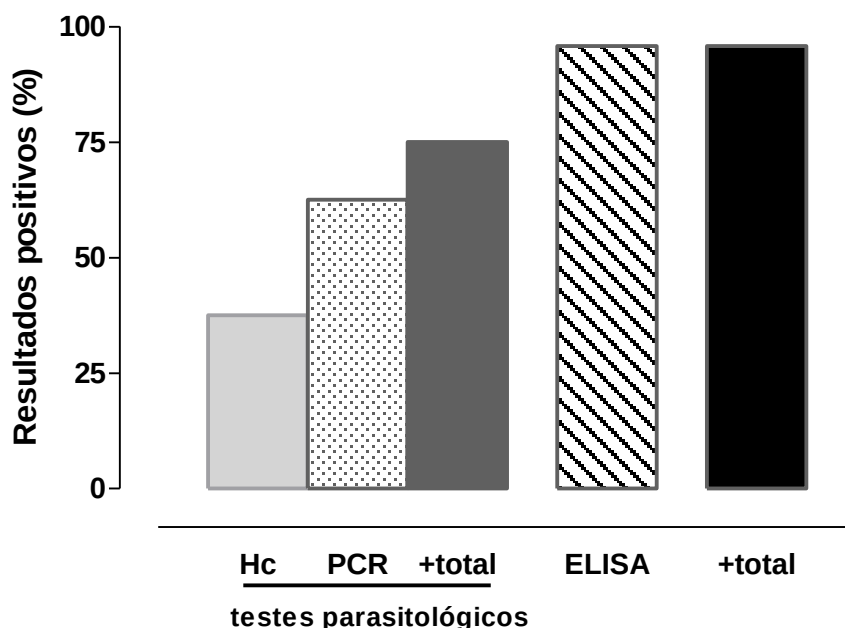


Gráfico 2: Percentual de resultados positivos em exames parasitológicos (PCR e hemocultura) e sorológicos (ELISA) realizados em amostras de sangue coletadas aos quatro meses após a infecção via intraperitoneal dos cães com 4.000 tripomastigotas/kg da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*.

5.2 - Avaliação da influência do tratamento com benznidazol nos níveis de parasitismo sanguíneo e tecidual

A influência do tratamento nos níveis do parasitismo sanguíneo foi avaliada através da frequência de resultados positivos dos testes de hemocultura e PCR realizados no sangue dos animais, antes, no 1^o, 6^o e 12^o mês após o tratamento com Bz, sendo os resultados comparados aos do grupo controle infectado.

O Gráfico 3 apresenta o percentual de resultados positivos detectados pelos testes de hemocultura e PCR realizados em amostras de sangue coletadas ao longo do período de avaliação. Pode ser observada uma similaridade entre os percentuais de positividade dos testes realizados antes do tratamento em ambos os grupos de animais infectados. O tratamento específico induziu uma drástica redução no parasitismo sanguíneo, detectado pela significativa redução na percentagem de testes parasitológicos positivos. Um mês após o

tratamento o parasito ou o seu kDNA foi detectado no sangue de apenas 16,67% (2/12) dos animais tratados e em 82,82% (9/11) dos animais controles infectados não tratados. Entretanto, após este período foi detectado um aumento progressivo na percentagem de testes positivos no sangue dos animais tratados. A percentagem de hemocultura e PCR positiva no sangue dos animais tratados foi de 40% e 60% nos ensaios realizados no 6^o e no 12^o mês após o tratamento, respectivamente. Nos animais incluídos no grupo controle a percentagem de testes positivos variou entre 80 e 100% em todo o período de avaliação.

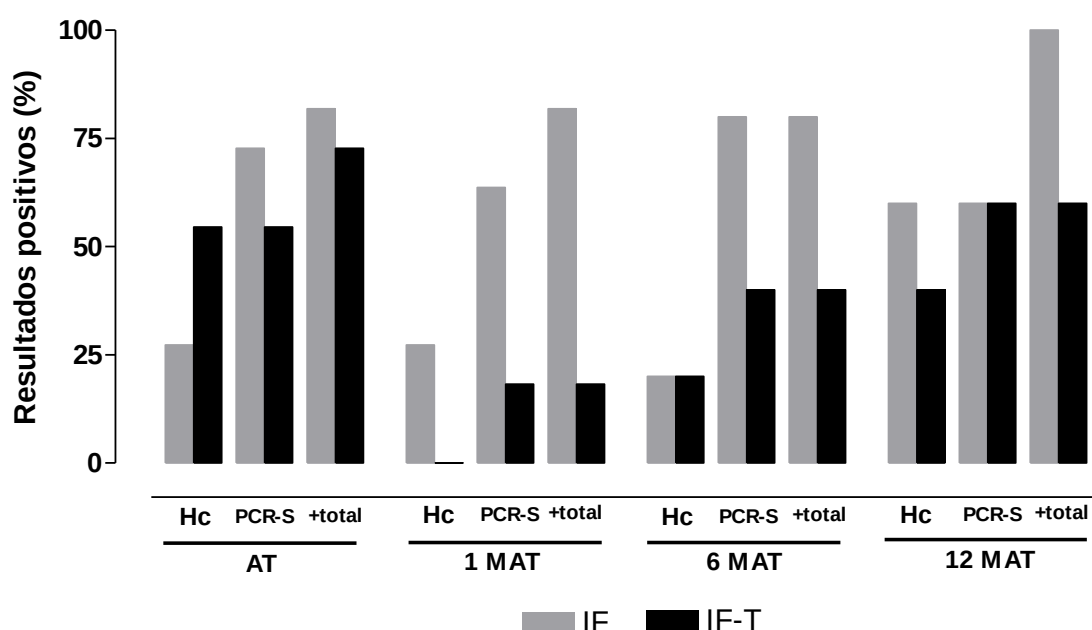


Gráfico 3: Percentual de resultados positivos da PCR e da hemocultura realizadas no sangue dos animais antes (AT- 4 meses de infecção) e no 1^o, 6^o e 12^o mês (MAT) após o tratamento com 7mg de benznidazol/kg de cães inoculados com 4.000 tripomastigotas /kg de peso, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, e dos animais do grupo controle infectado e não tratado.

Para avaliar a influência do tratamento no parasitismo tecidual foi realizada a PCR em amostras de DNA extraídas do tecido cardíaco (átrio direito) dos animais infectados (IF) e dos animais tratados (IF-T) após um mês e um ano do tratamento.

Pode ser observado no Gráfico 4, que um mês após o tratamento foram detectados resultados positivos na PCR do tecido em apenas 33,3% (2/6) dos animais tratados (IF-T), ao passo que no grupo controle infectado (IF) foi observado 100% de positividade por essa

mesma técnica (6/6). Neste momento, entre esses animais, foi detectado o parasito pela PCR do sangue somente no grupo controle infectado (83,3% - 5/6). Por outro lado, 12 meses após o tratamento o parasito foi detectado no tecido cardíaco de 80,0% (4/5) dos animais tratados, resultado similar ao observado no tecido dos animais do grupo controle. Da mesma forma, após 12 meses do tratamento, foi observado um aumento no percentual de resultados positivos na PCR realizada no sangue dos animais tratados, com níveis similares nos cães controles infectados não tratados, ou seja, o k-DNA do parasito foi detectado no sangue de 60% (3 de 5) dos animais de ambos os grupos experimentais.

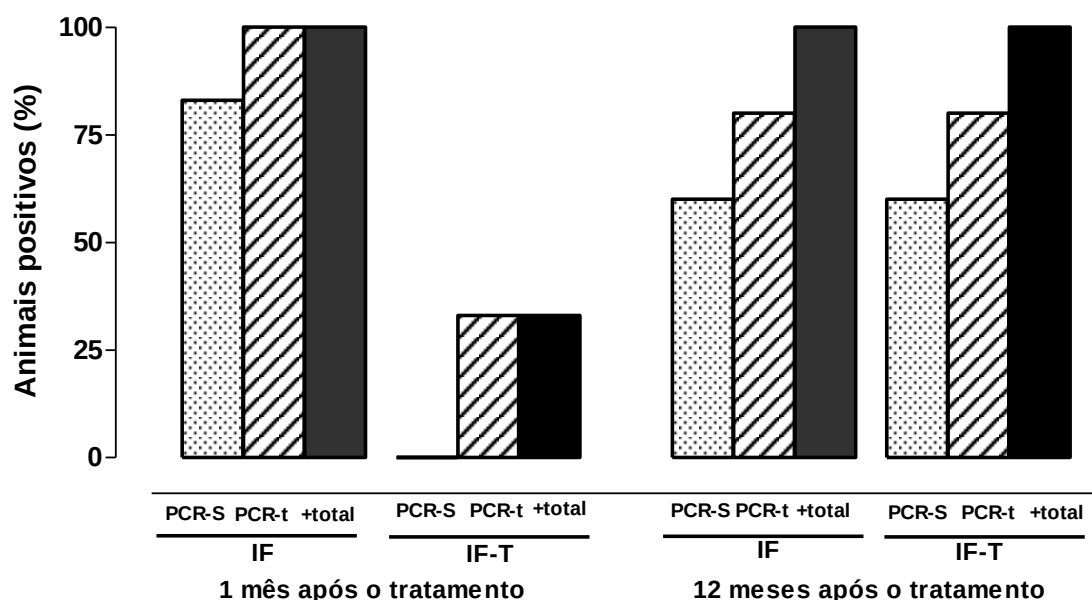


Gráfico 4: Percentual de resultados positivos da reação de PCR realizada no sangue e no tecido cardíaco no 1º e no 12º mês após o tratamento com 7mg de benznidazol/kg de peso corporal (IF-T) de cães inoculados com 4.000 tripomastigotas /kg de peso, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, e dos animais do grupo controle infectado e não tratado (IF).

A Figura 1 ilustra os fragmentos do kDNA do *T. cruzi* (extraídos de tecido ou sangue do animal) que foram visualizados no total de animais do grupo tratado. Não foi detectada a presença do kDNA do parasito pela PCR em cinco dos 12 animais tratados, sendo que quatro

desses foram necropsiados um mês após tratamento e um animal faleceu subitamente antes do período estipulado para sua necrópsia, a qual seria realizada um ano após o tratamento.

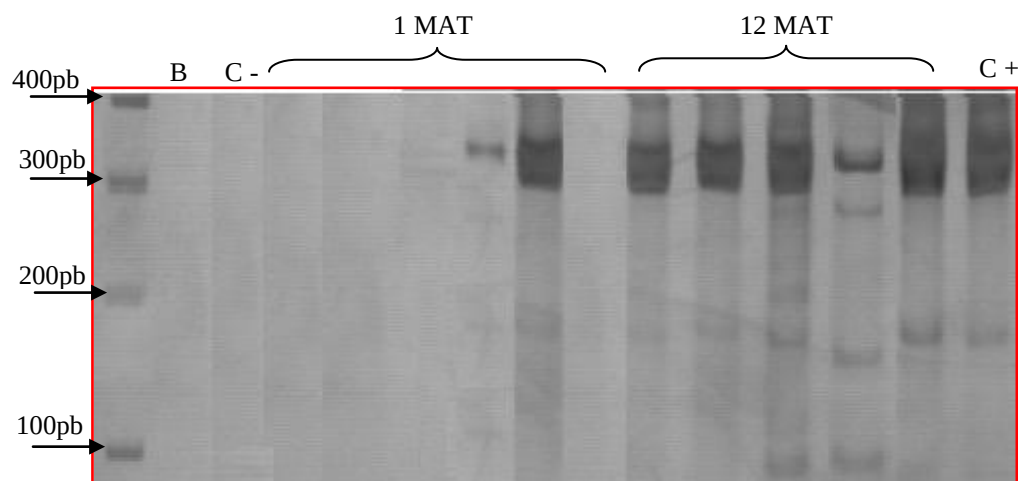


Figura 1: Gel de poliacrilamida com revelação dos fragmentos de 330pb do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em amostras extraídas do tecido cardíaco (seis animais) e sangue (um animal) de cães sem raça definida inoculados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com 7mg de benznidazol/kg de peso na fase crônica da doença de Chagas experimental. Os fragmentos de átrio direito foram coletados nos animais necropsiados no 1º (1 MAT) e no 12º (12 MAT) mês após o tratamento. B = Branco; C- = Controle Negativo; C+ = Controle positivo.

5.3 - Avaliação da influência do tratamento com benznidazol nos níveis de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG 1 e IgG2

Para verificar a influência do tratamento específico com Bz na evolução dos níveis de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG 1 e IgG 2 o soro dos animais foi coletado antes da infecção e no 1º, 4º, 6º, 12º e 18º mês após a inoculação. O tratamento dos animais foi realizado do 4º ao 6º mês de infecção; desta forma o 6º, 12º e o 18º mês de infecção correspondem ao momento considerado até o 1º, 6º e 12º mês após o término do tratamento. O Gráfico 5 mostra que os níveis de anticorpos da classe IgG foram similares entre os diferentes grupos experimentais ($p>0,05$) até o início do tratamento, ou seja, quatro meses após a inoculação dos animais. Nas dosagens realizadas nas amostras de soro coletadas no 1º,

6^o e 12^o mês após o término do tratamento os níveis de anticorpos detectados no soro dos animais tratados foram significativamente menores do que o observado no soro dos animais incluídos no grupo controle infectado e não tratado. Entretanto, os níveis de anticorpos dos animais tratados foram significativamente maiores do que o observado nos animais do grupo controle não infectado. Apenas um animal incluído no grupo tratado apresentou níveis de anticorpos similares ao dos animais não infectados na dosagem realizada 12 meses após o término do tratamento, ou seja, abaixo da absorbância discriminante.

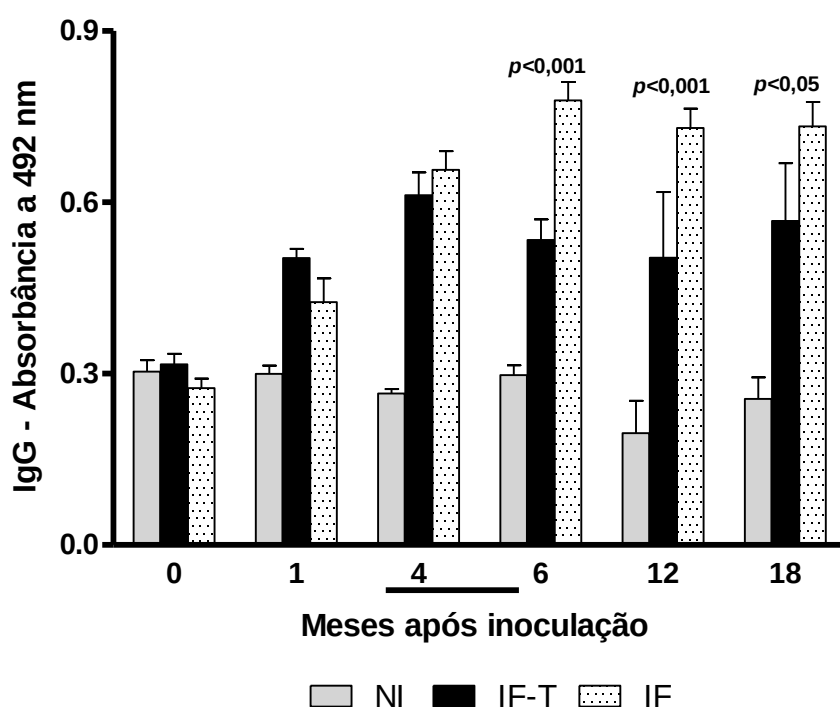


Gráfico 5: Anticorpos específicos da classe IgG anti-*T. cruzi* determinados por ELISA no soro de cães coletados antes, no 1^o, 4^o, 6^o, 12^o e 18^o mês de infecção com 4×10^3 tripomastigotas /kg por via intraperitoneal da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os animais foram divididos em grupos: controle não infectado (NI), controle infectado (IF) e infectado e tratado com 7mg de benznidazol/kg (IF-T). $p < 0,05$ indica diferença significativa entre os grupos.

— : indica o período de tratamento com benznidazol. Absorbância discriminante = 0,369.

De forma interessante, o tratamento interferiu marcadamente na cinética dos anticorpos da subclasse IgG1 (Gráfico 6). Os animais tratados com Bz apresentaram níveis de anticorpos similares aos detectados no soro dos animais não infectados nas dosagens

realizadas do 1^o ao 12^o mês após o término do tratamento, sendo estes níveis significativamente menores do que aqueles detectados no soro dos animais infectados e não tratados a partir do 6^o mês após o tratamento ($p < 0,05$). Os níveis de IgG1 foram abaixo do discriminante em 50% (6 de 12) dos animais tratados, sendo 3 dos animais necropsiados no 1^o mês e 3 dos animais necropsiados no 12^o mês após o término do tratamento.

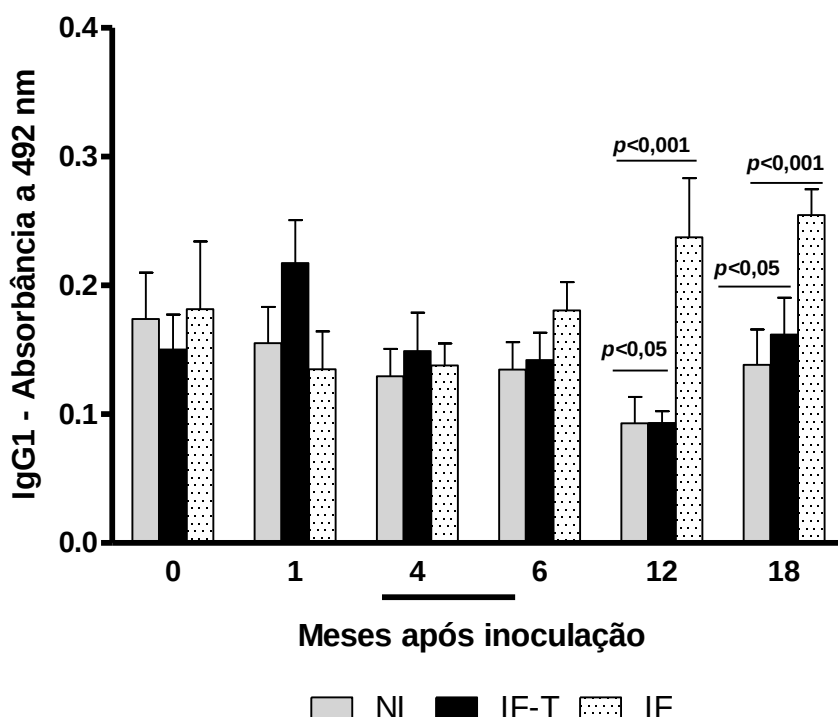


Gráfico 6: Anticorpos específicos da subclasse IgG 1 anti-*T. cruzi* determinados por ELISA no soro de cães coletados antes, no 1^o, 4^o, 6^o, 12^o e 18^o mês de infecção com 4×10^3 tripomastigotas/kg por via intraperitoneal da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os animais foram divididos em grupos: controle não infectado (NI), controle infectado (IF) e infectado e tratado com 7mg de benznidazol/kg (IF-T). $p < 0,05$ indica diferença significativa entre os grupos.

— : indica o período de tratamento com benznidazol. Absorbância discriminante = 0.199.

Os resultados da dosagem de anticorpos da classe IgG2 foram similares aos detectados na dosagem de anticorpos IgG, sendo os níveis de anticorpos detectados no soro dos animais tratados significativamente menores dos que o observado nos animais infectados (Gráfico 7), porém maiores do que no grupo de animais não infectados. Os níveis de absorbância foram abaixo da discriminante apenas no soro coletado de um dos animais tratados com benznidazol no 12^o mês após o término do tratamento.

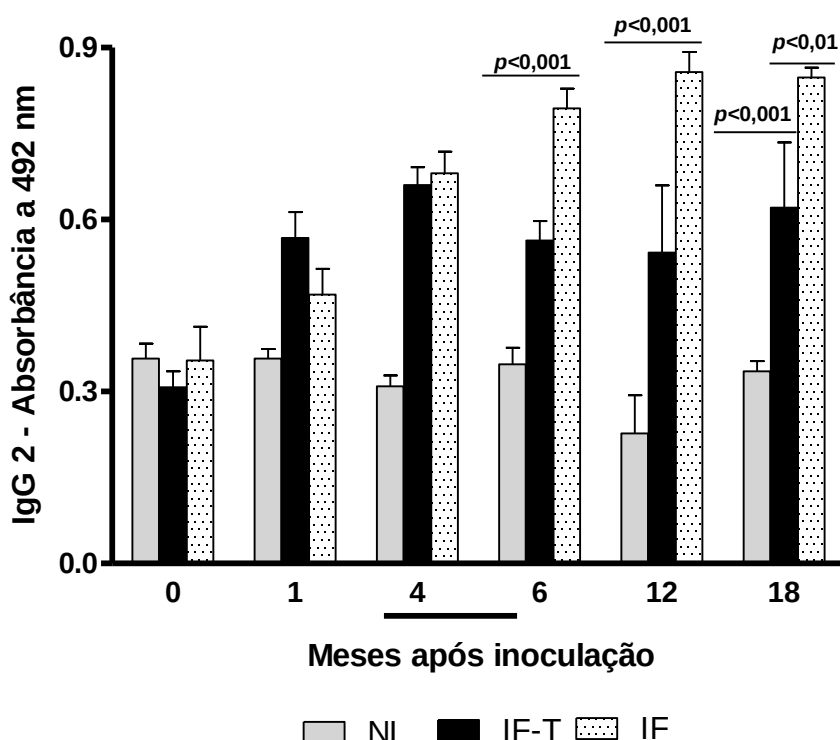


Gráfico 7: Anticorpos específicos da subclasse IgG 2 anti-*T. cruzi* determinados por ELISA no soro de cães coletados antes, no 1º, 4º, 6º, 12º e 18º mês de infecção com 4×10^3 tripomastigotas/kg por via intraperitoneal da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os animais foram divididos em grupos: controle não infectado (NI), controle infectado (IF) e infectado e tratado com 7mg de benznidazol/kg (IF-T). $p < 0,05$ indica diferença significativa entre os grupos.

— : indica o período de tratamento com benznidazol. Absorbância discriminante = 0,462.

5.4 Avaliações do prognóstico cardíaco dos animais necropsiados no 1º e no 12º mês após o tratamento com benznidazol

5.4.1 Avaliação da presença de cardiomegalia

A correlação entre o peso do coração e o peso dos animais foi realizada para verificar a ocorrência de cardiomegalia nos animais tratados com benznidazol (IF-T) em comparação àqueles animais incluídos nos grupos controles do tratamento (IF) e da infecção (NI).

Pode ser observado, no Gráfico 8, que aos seis meses de infecção pelo *T. cruzi* (1 mês após o tratamento), todos os grupos de cães (NI, IF e IF-T) apresentaram níveis semelhantes

do peso relativo do coração. Aos 18 meses de infecção pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, os grupos de cães infectados (tratados ou não) apresentaram uma significativa elevação no peso do coração mensurado pelo índice de cardiomegalia (peso coração/ peso cão). Este fato não ocorreu com o grupo de animais não infectados.

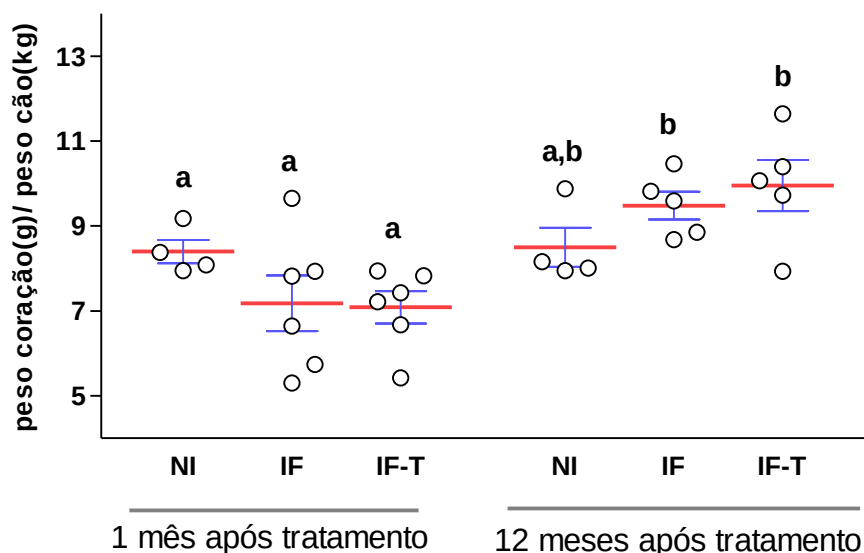


Gráfico 8: Correlação entre o peso do coração e o peso do animal realizada no 1º e no 12º mês após o tratamento com benznidazol, ao 6º e 18º mês após inóculo de cães sem raça definida com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. IF = animal infectado; IF-T = animal infectado e tratado com benznidazol; NI - animal não infectado.

Letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,05$) e letras iguais para ausência de diferença significativa ($p > 0,05$). Dados individuais expressos com a média $\pm$ 1 desvio padrão dos resultados apresentados pelo grupo.

5.4.2 – Avaliação da presença de inflamação e fibrose no tecido cardíaco

Para a avaliação histopatológica foram realizadas análises morfométricas computadorizadas (*Leica Applications Suíte/Leica Q-win plus*) para quantificação de células inflamatórias e da área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso.

A quantificação de células inflamatórias no tecido muscular estriado cardíaco dos animais realizada no 1º mês após o tratamento específico mostrou que nos animais tratados (IF-T) foi observada cerca de 20% a menos de células inflamatórias que no grupo controle infectado não tratado (IF). Foram detectados $69,48 \pm 26,94$; $117,03 \pm 64,50$ e $95,82 \pm 30,81$

células inflamatórias no miocárdio dos grupos NI, IF e IF-T. Resultado similar foi obtido ao ser realizada a quantificação da área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso, tendo sido observado uma redução de 36% na deposição intrafascicular de colágeno nos animais que receberam o tratamento (IF-T) em relação àqueles infectados que não foram tratados (IF). Foram verificados $877,87 \pm 383,59$; $2.750,44 \pm 2.369,27$ e $1.017,57 \pm 368,95$ de área com deposição de colágeno no miocárdio dos animais dos grupos NI, IF e IF-T, respectivamente. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre o número de células e na área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso quando os resultados dos diferentes grupos experimentais foram avaliados (Gráfico 9; Figura 2).

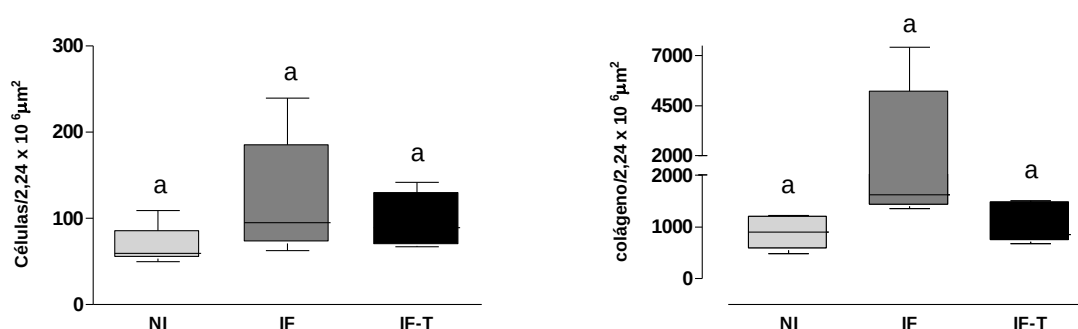


Gráfico 9: Celularidade (A) e fibrose (B) no miocárdio de cães infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e necropsiados 1 mês após o tratamento com 7mg de benznidazol /kg de peso (IF-T) durante a fase crônica recente da infecção, comparativamente aos grupos controle infectado (IF) e não infectado (NI). Letras iguais indicam diferença não significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

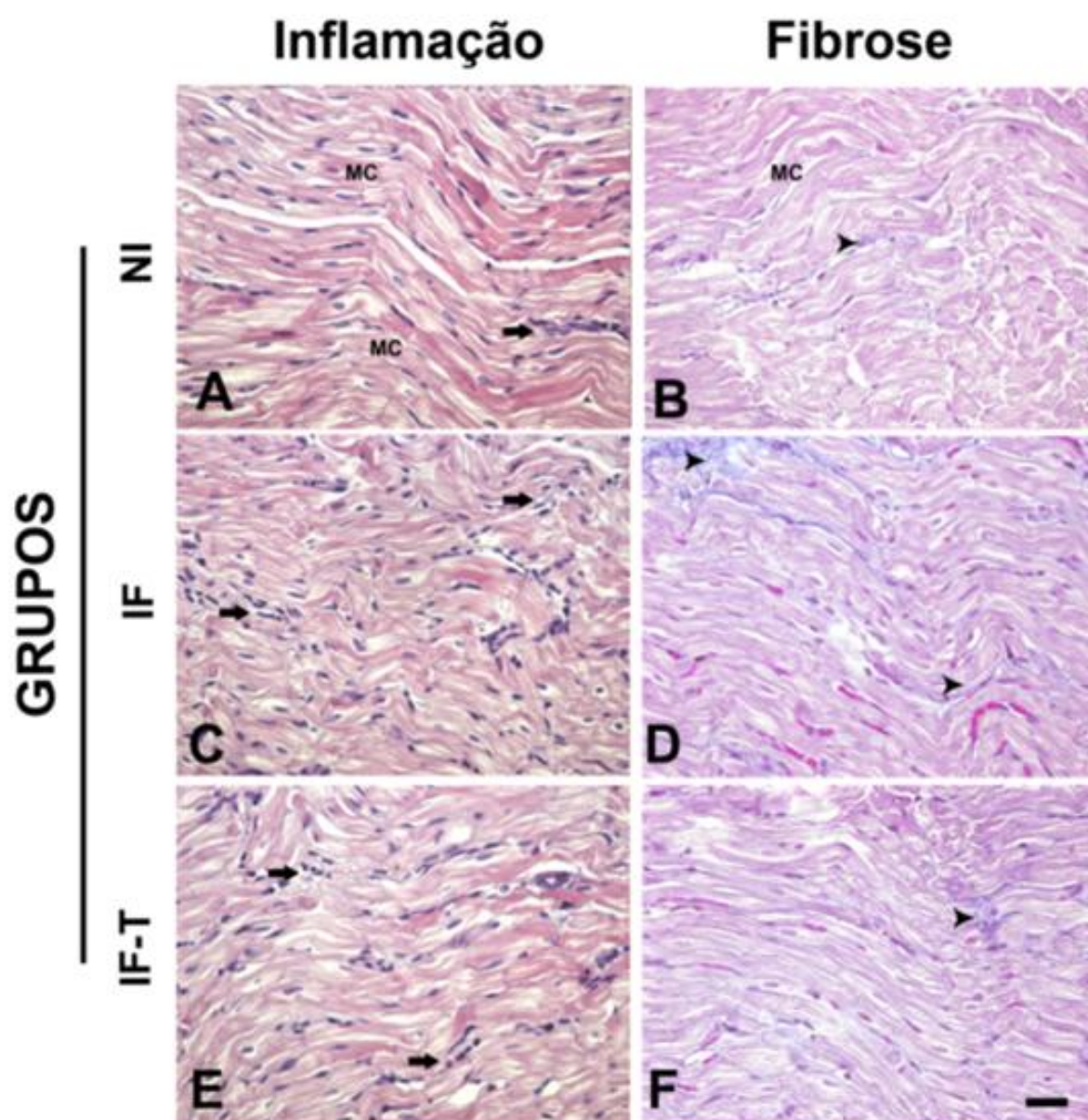


Figura 2: Fotomicrografias de cortes histológicos do átrio direito do coração de cães controles não infectados (NI) eutanaziados com a mesma idade dos animais infectados pela cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* (IF) e de cães tratados (IF-T) com 7mg de benznidazol/kg de peso. Os animais foram necropsiados no 1º mês após o tratamento (seis meses após a inoculação). A, C e E – cortes histológicos corados pela Hematoxilina & Eosina; B, D e F – cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Masson. Aumento de 40X e — de 10µm.

A mesma avaliação foi realizada no miocárdio dos animais necropsiados 12 meses após o tratamento (18 meses de infecção). Neste momento foi observado um número significativamente maior de células no miocárdio dos animais do grupo IF em relação aos animais não infectados – NI (Gráfico 10). Nos animais do grupo IF-T o número de células (média = $192,18 \pm 13,45$) foi intermediário entre o detectado nos grupos IF (média = $230,42 \pm 88,25$) e NI (média = $120,53 \pm 45,68$), embora não tenha sido observada diferença significativa em relação a estes grupos de animais. Adicionalmente, a área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso foi similar entre os animais dos grupos IF-T e IF ($p > 0,05$) e significativamente maior do que a detectada no miocárdio dos animais do grupo NI ($p < 0,05$) (Gráfico 10 e Figura 3).

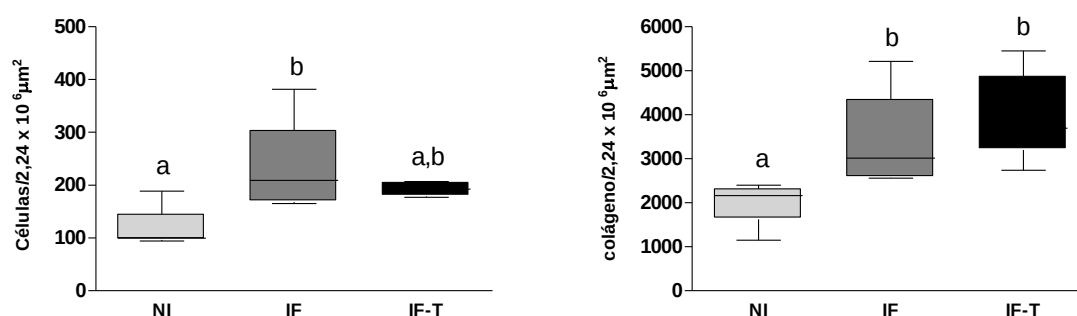


Gráfico 10: Celularidade (A) e fibrose (B) no miocárdio de cães infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados 12 meses após o tratamento com 7mg de benznidazol/kg de peso (IF-T) durante a fase crônica recente da infecção, comparativamente aos grupos controle infectado (IF) e não infectado (NI).

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) e letras iguais para ausência de diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

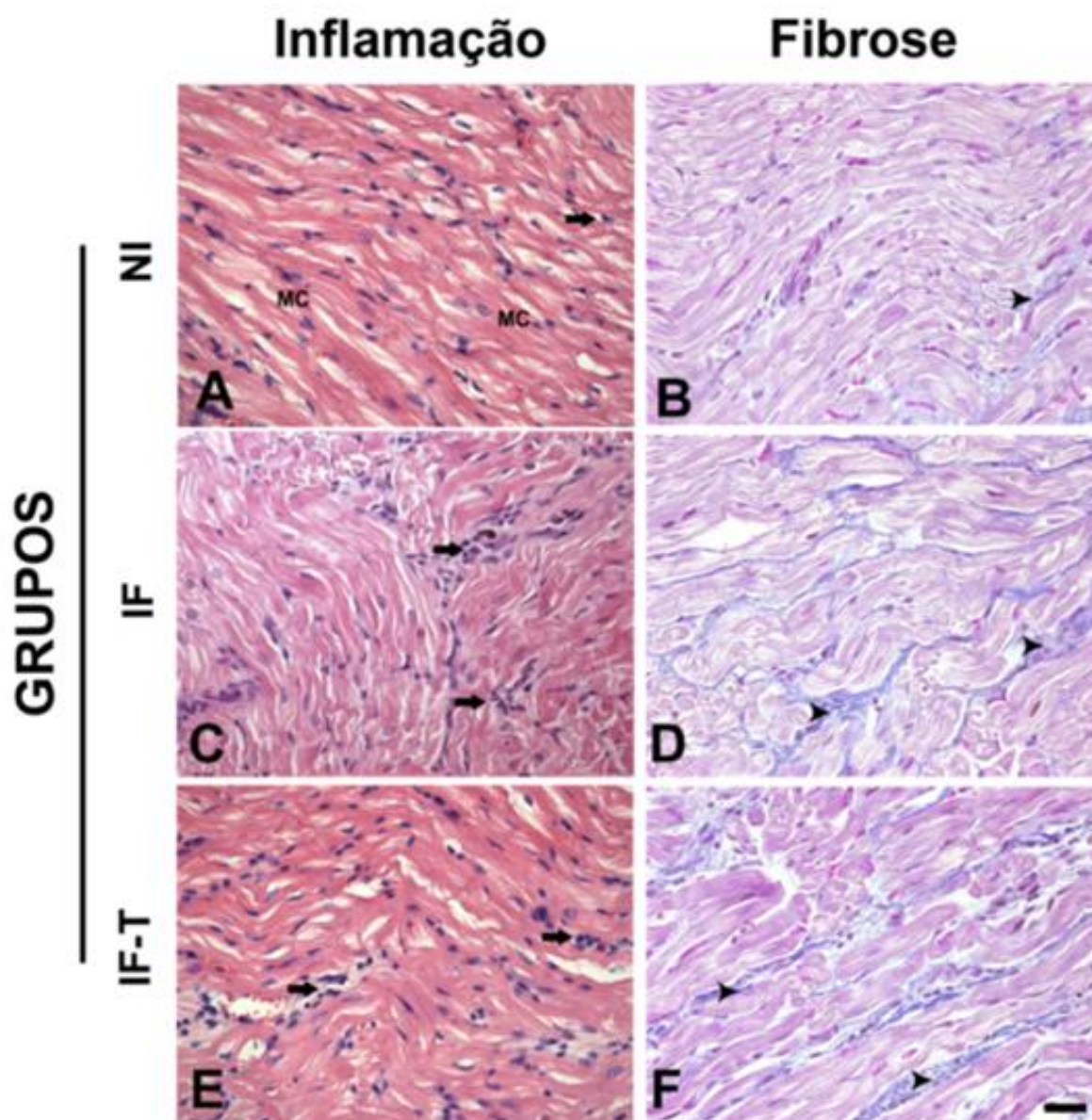


Figura 3: Fotomicrografias de cortes histológicos do átrio direito do coração de cães controles não infectados (NI) eutanaziados com a mesma idade dos animais infectados pela cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* (IF) e de cães tratados (IF-T) com 7mg de benznidazol/kg de peso. Os animais foram necropsiados no 12^o mês após o tratamento (18 meses após a inoculação). A, C e E – cortes histológicos corados pela Hematoxilina & Eosina; B, D e F – cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Masson. Aumento de 40X e ─ de 10µm.

Considerando os resultados descritos, foi realizada uma comparação individual do índice de cardiomegalia, do número médio de células inflamatórias e da área ocupada pelo tecido fibroso de cada animal dos grupos IF e IF-T com a média+desvio padrão destes dados detectados no grupo de animais não infectados. Os animais que apresentaram valores acima do observado no grupo não infectado foram considerados portadores de cardiomegalia.

No 6^o mês de infecção pelo parasito, na avaliação realizada nos animais necropsiados no 1^o mês após o tratamento com Bz, havia: (i) apenas 17% dos animais do grupo infectado não tratado (IF) e 0% de animais do grupo IF-T com índice de peso do coração maior que a média+desvio padrão dos valores apresentados no grupo NI; (ii) 67% e 33% dos animais dos grupos IF e IF-T, respectivamente, considerados com inflamação no tecido cardíaco; (iii) 83% e 16% de animais dos grupos IF e IF-T com área de fibrose maior do que a média+desvio padrão do valor detectado no miocárdio dos animais do grupo NI.

Após um maior tempo da infecção chagásica, todos os parâmetros avaliados (índice de cardiomegalia, inflamação e fibrose) tiveram um elevado aumento entre os animais infectados de ambos os grupos, IF e IF-T. Porém, diferente do 1^o mês após tratamento, em que os níveis destes parâmetros foram mais elevados entre os animais do grupo IF, após 12 meses do término do tratamento a percentagem de animais com inflamação e fibrose no tecido muscular cardíaco foi similar entre os animais incluídos nos grupos IF e IF-T, e o índice de cardiomegalia foi ligeiramente maior entre os animais do grupo IF-T (Tabela 1).

Tabela 1: Número de animais inoculados com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* necropsiados no 1^o e no 12^o mês após o tratamento com Benznidazol que apresentaram índice de cardiomegalia (peso coração/ peso cão), número de células e área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso no miocárdio maior do que a média somada a um desvio padrão dos parâmetros observados nos animais não infectados.

	1 mês após tratamento		12 meses após tratamento	
	IF	IF-T	IF	IF-T
Índice de Cardiomegalia	1/6 (17%)	0/6 (0%)	3/5 (60%)	4/5 (80%)
Inflamação	4/6 (67%)	2/6 (33%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)
Fibrose	5/6 (83%)	1/6 (16%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)

IF= grupo de animais inoculados com *T. cruzi* que não receberam tratamento com Bz.

IF-T = grupo de animais inoculados com *T. cruzi* e tratados com Bz na fase crônica recente da infecção.

Para verificar se a ocorrência das lesões teciduais, com a quantidade de células inflamatórias e deposições de colágeno, poderiam ser relacionadas com o perfil de citocinas produzidas por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi realizada a dosagem de IL-10 (citocina regulatória) e TNF- α (citocina inflamatória) obtidas dos animais após o 6^o e o 18^o mês de infecção pelo *T. cruzi*, respectivamente no 1^o e 12^o mês depois de encerrado o tratamento.

O Gráfico 11 apresenta os níveis de IL-10 detectados por ELISA de captura no sobrenadante das células mononucleares obtidas do sangue periférico de todos os animais após o 1^o e o 12^o mês do tratamento. Na avaliação realizada no 1^o mês após o tratamento com Bz foram detectados níveis significativamente maiores de IL-10 ($p < 0,01$) no sobrenadante das CMSP nos grupos de animais infectados (submetidos ou não ao tratamento específico) em relação aos animais do grupo controle não infectado. Por outro lado, quando a mesma avaliação foi realizada 12 meses após o tratamento, os níveis de IL-10 foram similares em todos os grupos de animais. Entretanto, a comparação realizada em cada grupo de animais mostrou que nos grupos IF e IF-T foi observada uma normalização da IL-10 com a significativa redução de seus níveis ($p < 0,01$) na dosagem realizada no 12^o mês após tratamento em relação à realizada no 1^o mês.

A análise dos níveis de TNF- α realizada nos mesmos períodos revelou um resultado inverso, ou seja, foi verificado um aumento significativo nos níveis desta citocina no sobrenadante de CMSP obtidas dos animais infectados ($p < 0,01$), submetidos ou não ao tratamento específico, no 12^o mês após o tratamento, em relação aos animais não infectados. É importante ressaltar, que ainda não era possível verificar diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os níveis de TNF- α no sobrenadante das CMSP quando extraídas de todos os animais no 1^o mês depois de encerrado o esquema terapêutico (Gráfico 12).

As diferenças detectadas nos níveis de IL-10 e TNF- α nos grupos de animais infectados (IF e IF-T) com relação ao grupo de animais não infectado ocorreram apenas

quando ambas as citocinas avaliadas foram sintetizadas por CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de formas tripomastigotas (Gráficos 11A e 12A).

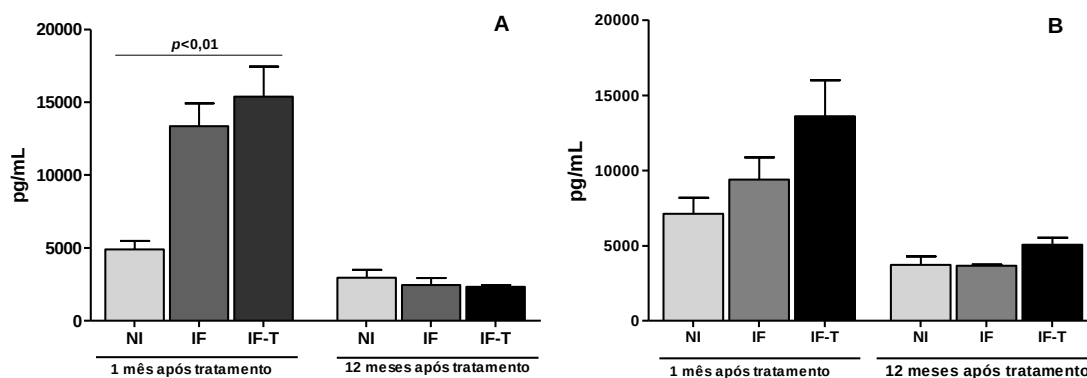


Gráfico 11: Quantificação de IL-10, por ELISA de captura, no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) obtidas de animais infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e de animais controles não infectados (NI). CMSP extraídas no 1º e 12º mês após o tratamento. Os resultados mostram a média±desvio padrão de seis animais por grupo. Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. **A:** CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de formas tripomastigotas; **B:** CMSP não estimuladas com o antígeno do parasito.

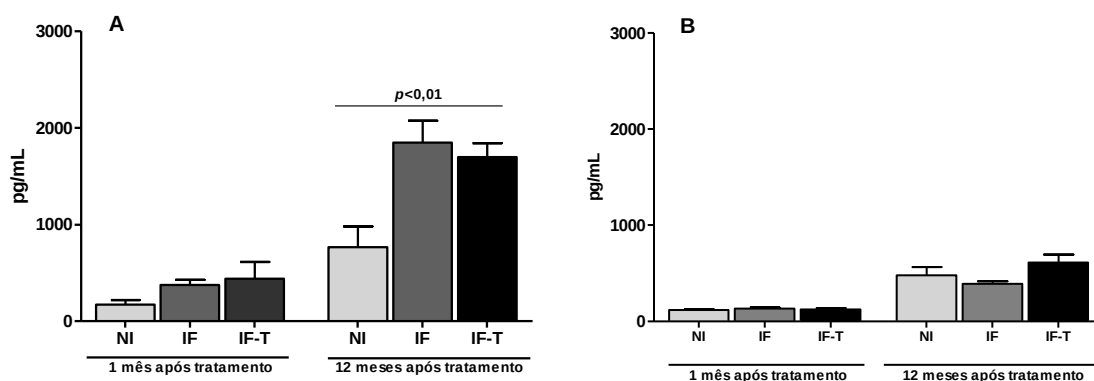


Gráfico 12: Quantificação de TNF-α, por ELISA de captura, no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) obtidas de animais infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* submetidos (IF-T) ou não (IF) ao tratamento com benznidazol e de animais controles não infectados (NI). CMSP extraídas no 1º e 12º mês após o tratamento. Os resultados mostram a média±desvio padrão de seis animais por grupo. Diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey. **A:** CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de formas tripomastigotas; **B:** CMSP não estimuladas com o antígeno do parasito.

5.4.3 Avaliação da função cardíaca

Os parâmetros ecocardiográficos que avaliam a dilatação cardíaca, possivelmente associada à ocorrência de fibrose e inflamação, corroboram os dados obtidos para o índice de peso do coração (Gráficos 15, 16, 17 e 18). Para avaliação da função cardíaca sistólica foram mensuradas por ecocardiograma a Fração de Ejeção e Fração de Encurtamento, ambos índices que avaliam a função sistólica do Ventrículo Esquerdo (VE) (Gráficos 13 e 14). Entre as medições realizadas para a avaliação de dilatação cardíaca, encontra-se o Volume do Átrio Esquerdo, o qual pode ser correlacionado à função diastólica do VE (Gráfico 18).

Os dados obtidos por eletrocardiograma possibilitaram a avaliação da propulsão do impulso elétrico pelas cavidades cardíacas, de modo a serem evidenciadas as alterações comuns na cardiopatia chagásica, além de serem explicitadas em uma escala de valores de intensidade todas as alterações eletrocardiográficas detectadas nos diferentes grupos de cães (NI, IF e IF-T) no 1º e 12º mês após o tratamento específico (Tabelas 2 e 3).

Os exames eco e eletrocardiográficos foram realizados em todos os animais antes da infecção (aos quatro meses de idade) e no momento anterior à eutanásia dos mesmos, no 1º ou 12º mês após o tratamento, respectivamente no 6º ou 18º mês de infecção.

5.4.3.1 Fração de Ejeção

A medida da Fração de Ejeção (FE) é de grande relevância na avaliação da função sistólica ventricular esquerda. No Gráfico 13 podem ser observados os valores da FE obtidos pelo ecocardiograma realizado em todos os grupos de animais, antes, no 6º e no 18º mês após a inoculação (no 1º e 12º mês após o tratamento). No 1º mês após tratamento não foi observada diferença significativa na FE mensurada entre os diferentes grupos ($p > 0,05$). Porém, no 12º mês após tratamento foi verificada uma significativa redução na fração de

ejeção no grupo infectado não tratado (IF) em relação ao grupo NI ($p<0,01$) e aos animais tratados (IF-T) ($p<0,05$). Estes resultados demonstram que o coração dos animais infectados que não receberam o tratamento específico com Bz (IF) ficou nitidamente mais fraco para ejetar o sangue, em comparação aos animais NI e IF-T.

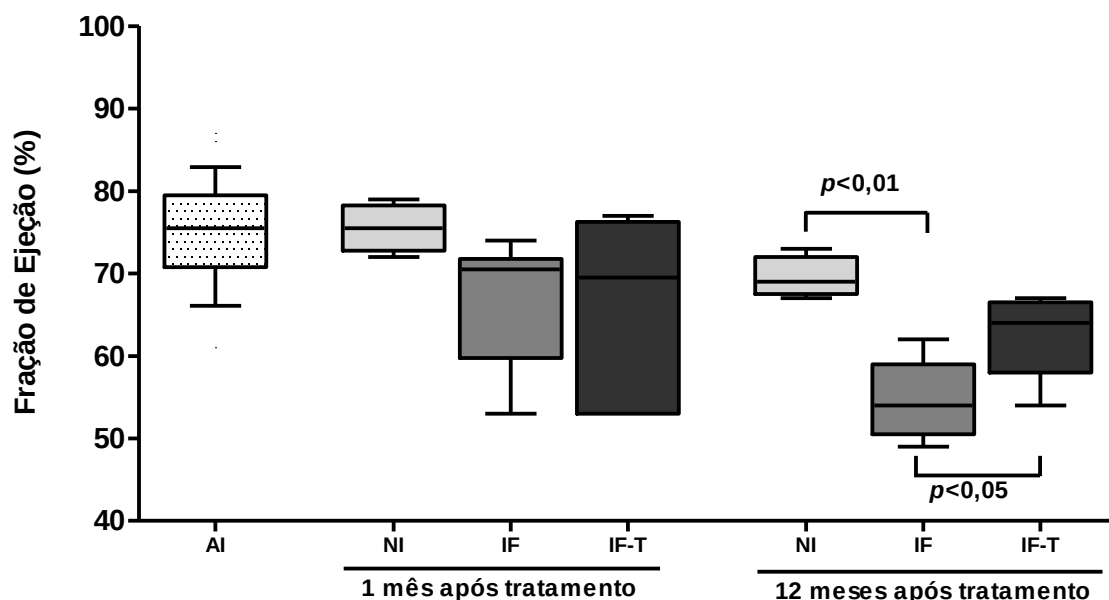


Gráfico 13: Fração de Ejeção de cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI). A avaliação foi realizada antes, no 6º e no 18º mês após a inoculação (no 1º e 12º mês após o tratamento). Dados expressos com a mediana, valores mínimos e máximos dos resultados apresentados pelo grupo.

5.4.3.2 Fração de encurtamento

A Fração de Encurtamento (FEt) é um índice de performance cardíaca comumente utilizado na avaliação da função sistólica do VE. No Gráfico 14 são demonstrados os valores médios $\pm$ um desvio padrão da FEt mensurada entre os animais dos grupos NI, IF e IF-T antes da infecção chagásica (AI) e no 1º e 12º mês após realização do tratamento naqueles que receberam o medicamento na fase crônica. No 1º mês após tratamento todos os grupos de cães apresentaram valores médios de FEt similares à média encontrada para todos os cães antes da infecção (AI), de modo que também não foram detectadas diferenças entre os grupos ($p>0,05$). Contudo, após 12 meses do tratamento, os animais infectados não tratados (IF)

apresentaram uma significativa redução da FEt em relação aos animais NI ($p<0,001$) e IF-T ($p<0,05$). De modo interessante, os níveis de FEt permaneceram similares ($p>0,05$) entre os animais não infectados e àqueles infectados que receberam o tratamento com Bz. Os dados demonstram uma evidente deterioração da capacidade sistólica do VE nos animais IF em função da infecção chagásica na ausência do tratamento, quando comparados aos grupos NI e IF-T.

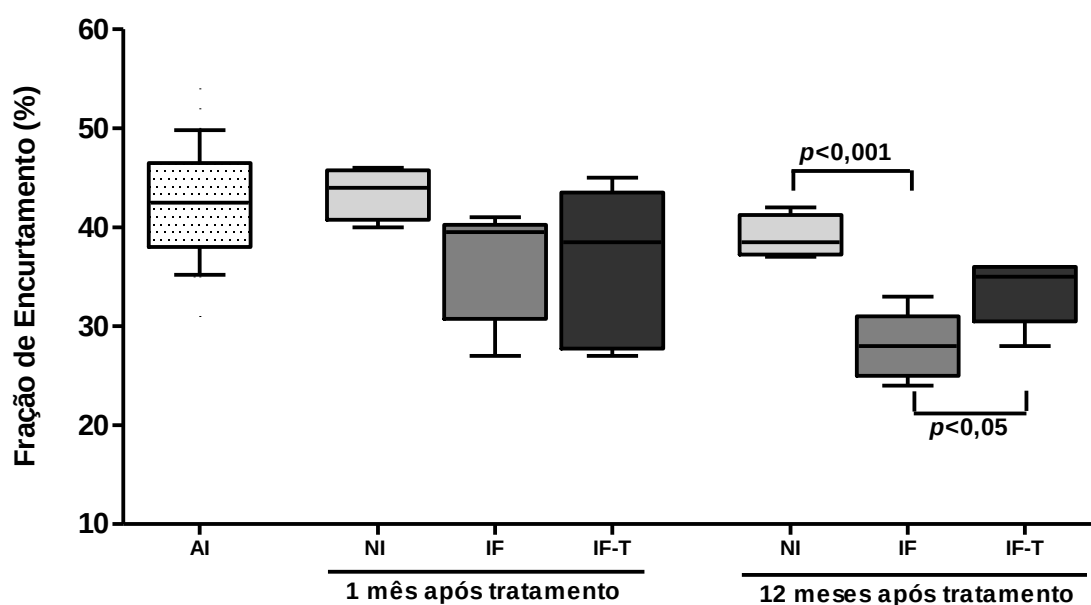


Gráfico 14: Fração de Encurtamento mensurada por ecocardiografia em cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI). A avaliação foi realizada antes, no 6º e no 18º mês após a inoculação (no 1º e 12º mês após o tratamento). Dados expressos com a mediana, valores mínimos e máximos dos resultados apresentados pelo grupo.

5.4.3.3 Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo

A variável Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo (IMVE) reflete uma dilatação cardíaca, possivelmente associada a um grau de hipertrofia e fibrose.

No Gráfico 15 pode ser observado que um mês após tratamento, os níveis médios do IMVE foram semelhantes entre os grupos NI, IF e IF-T pelo ecocardiograma realizado após seis meses de infecção com o *T. cruzi* ($p>0,05$). Esta mesma análise realizada aos 18 meses de infecção, um ano após esquema terapêutico, mostrou um aumento significativo do IMVE

nos grupos IF e IF-T em relação aos animais do grupo NI ($p < 0,05$). Contudo, pode ser observado que o tratamento não ocasionou alterações no IMVE entre os grupos infectados IF e IF-T ($p > 0,05$). Este dado indica um aumento da área cardíaca nos animais infectados.

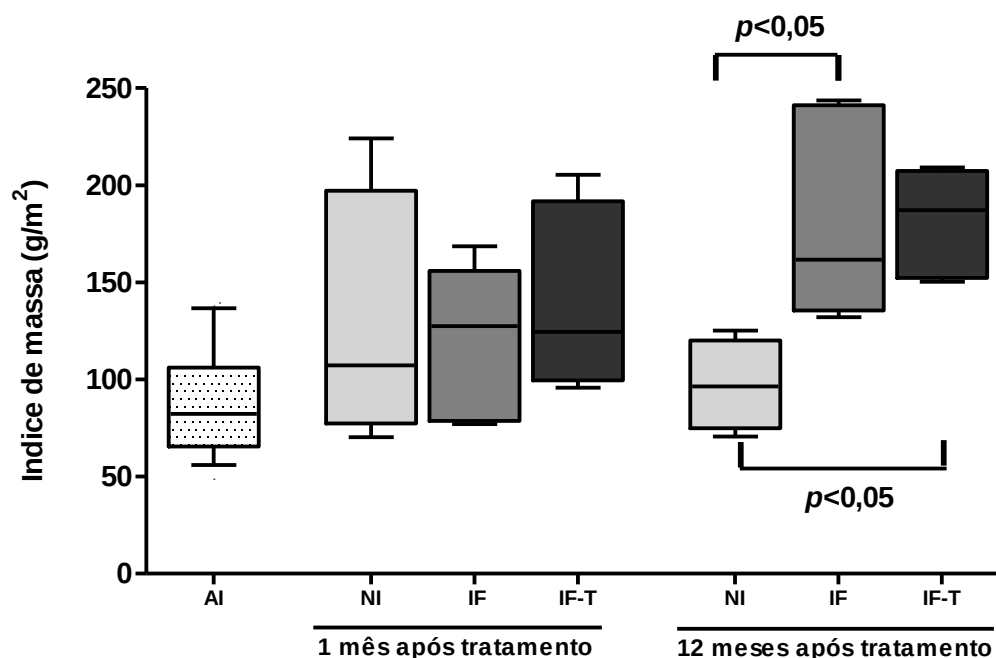


Gráfico 15: Índice de Massa do Ventrículo Esquerdo mensurado por ecocardiograma de cães sem raça definida infectados via intraperitoneal com 4.000 tripomastigotas/kg, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI). A avaliação foi realizada antes, no 6º e no 18º mês após a inoculação (no 1º e 12º mês após o tratamento). Dados expressos com a mediana, valores mínimos e máximos dos resultados apresentados pelo grupo.

5.4.3.4 Volume do Ventrículo Esquerdo

A medida do Volume do Ventrículo Esquerdo (VTE) corrobora com o IMVE, de modo que a elevação de seus valores acima dos níveis normalmente esperados, e devidamente corrigidos para a superfície corporal do animal, pode estar associada a um grau aumentado de hipertrofia e fibrose do tecido cardíaco.

Após seis meses de infecção pelo *T. cruzi* e um mês do término do tratamento, não houve diferença significativa entre o VTE medido entre os diferentes grupos de cães (Gráfico 16). Contudo, decorridos 18 meses da infecção o VTE aumentou significativamente entre os

animais inoculados com o *T. cruzi* incluídos nos grupos IF ($p<0,05$) e IF-T ($p<0,01$) quando comparados aos animais controles não infectados – NI. Por outro lado, não foi observada diferença ($p>0,05$) no VTE entre os animais infectados tratados (IF-T) e não tratados (IF) neste mesmo período de avaliação, quando se completava um ano de encerramento do tratamento específico (Gráfico 16).

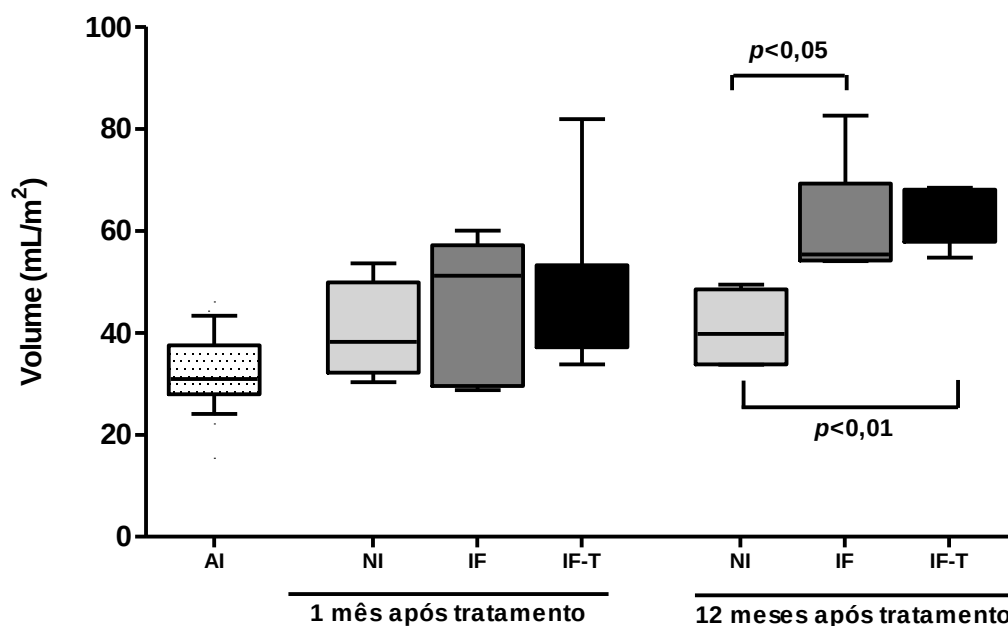


Gráfico 16: Volume do Ventrículo Esquerdo obtido pelo ecocardiograma de cães sem raça definida infectados via intraperitoneal com 4.000 tripomastigotas/kg, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI). A avaliação foi realizada antes, no 6º e no 18º mês após a inoculação (no 1º e 12º mês após o tratamento). Dados expressos com a mediana, valores mínimos e máximos dos resultados apresentados pelo grupo.

5.4.3.5 Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo

O Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo (DSVE) é uma dimensão mensurada ao final da sístole ventricular esquerda e a elevação em seus valores é um indicativo da ocorrência de cardiomiopatia dilatada.

Pode ser observado que com seis meses de infecção (no 1º mês após tratamento) ainda não era possível visualizar alterações no DSVE propiciadas pela cardiopatia chagásica. Contudo, aos 18 meses de infecção (12 meses após tratamento) foi observado um aumento significativo no DSVE nos animais infectados e não tratados ($p<0,01$) em relação ao grupo

não inoculado com o *T. cruzi*. De modo interessante, o tratamento impediu um abrupto aumento nos níveis médios do DSVE dos animais infectados e tratados com Bz (IF-T), os quais se apresentaram intermediários e com semelhança estatística ($p>0,05$) aos demais grupos NI e IF (Gráfico 17).

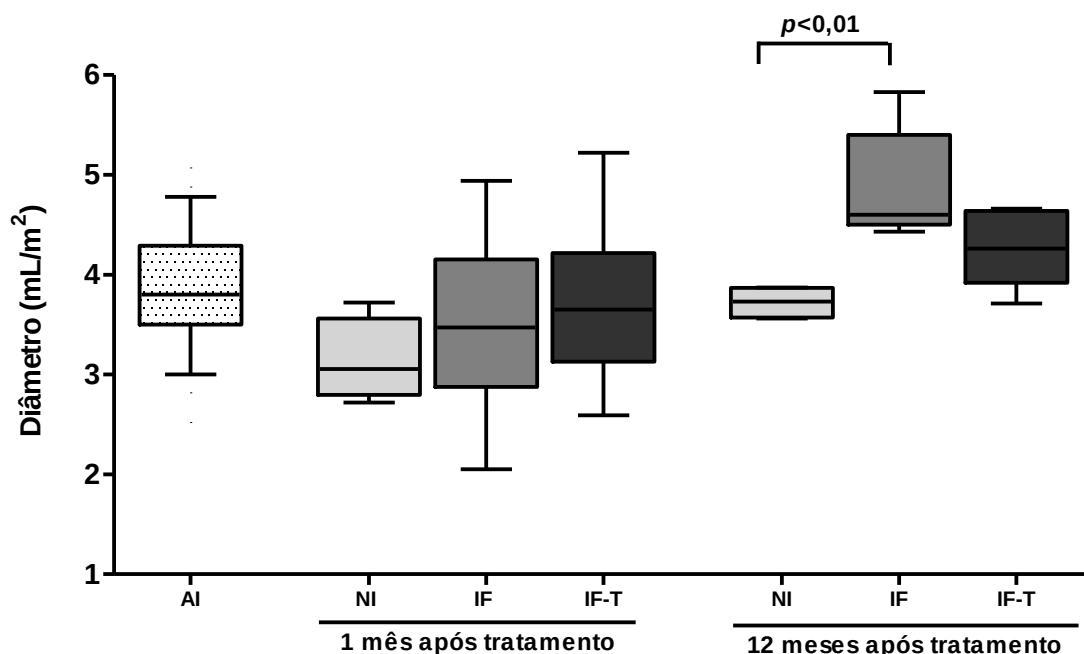


Gráfico 17: Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo obtido pelo ecocardiograma de cães sem raça definida infectados via intraperitoneal com 4.000 tripomastigotas/kg, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI). A avaliação foi realizada antes, no 6º e no 18º mês após a inoculação (no 1º e 12º mês após o tratamento). Dados expressos com a mediana, valores mínimos e máximos dos resultados apresentados pelo grupo.

5.4.3.6 Volume do Átrio Esquerdo

A medida do Volume do Átrio Esquerdo, mais correlacionada à avaliação da função diastólica do VE, foi realizada pelo método uniplanar de Simpson, ao final da sístole, na projeção apical de quatro câmaras.

Pode ser observado no Gráfico 18 que após seis meses de infecção pelo *T. cruzi* e um mês do tratamento com Bz, as medidas do VAE nos diferentes grupos de cães foram similares ($p>0,05$). Contudo, após 18 meses da infecção e um ano do tratamento, os valores obtidos desse importante marcador da função diastólica foram significativamente mais elevados nos grupos IF ($p<0,01$) e IF-T ($p<0,05$) em relação aos cães não infectados. A relevante

deterioração da função diastólica demonstrada pelo VAE em ambos os grupos de cães infectados, ou seja, IF e IF-T, ocorreu de modo semelhante entre esses grupos ($p>0,05$), de forma que o tratamento com Bz não exerceu influência significativa neste perfil.

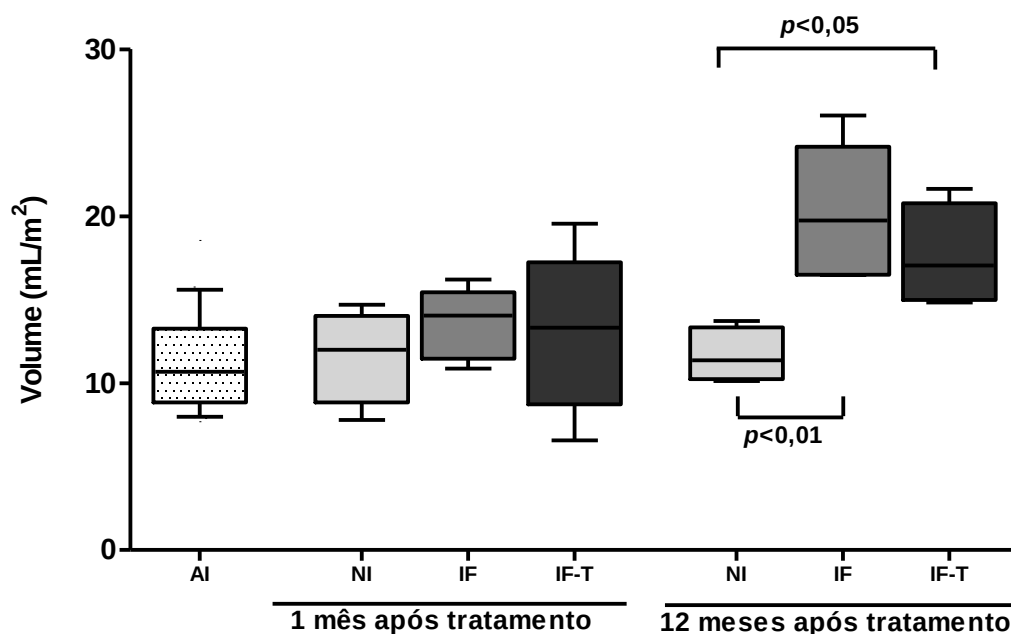


Gráfico 18: Medida do Volume do Átrio Esquerdo pelo método de Simpson, após realização do ecocardiograma de cães sem raça definida infectados com 4.000 tripomastigotas/kg, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados (IF-T) ou não (IF) com benznidazol (7mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção. Animais não infectados foram utilizados como parâmetros de normalidade (NI). A avaliação foi realizada antes, no 6º e no 18º mês após a inoculação (no 1º e 12º mês após o tratamento). Dados expressos com a mediana, valores mínimos e máximos dos resultados apresentados pelo grupo.

Os parâmetros ecocardiográficos analisados aos seis meses de infecção (um mês após tratamento) mostraram-se semelhantes entre os animais infectados (IF e IF-T) e não infectados (NI). Contudo, após um maior período de avaliação na fase crônica, as variáveis ecocardiográficas que refletem a função cardíaca sistólica (FE e FEt) revelaram uma piora clínica no grupo IF, não evidenciada no grupo IF-T. Os demais parâmetros avaliados também neste momento demonstraram uma significativa e similar ocorrência de cardiomegalia em ambos os grupos de animais infectados, IF e IF-T. Associado a estes dados, o VAE mostrou deterioração da função cardíaca diastólica com similar relevância nos grupos IF e IF-T um ano após o tratamento.

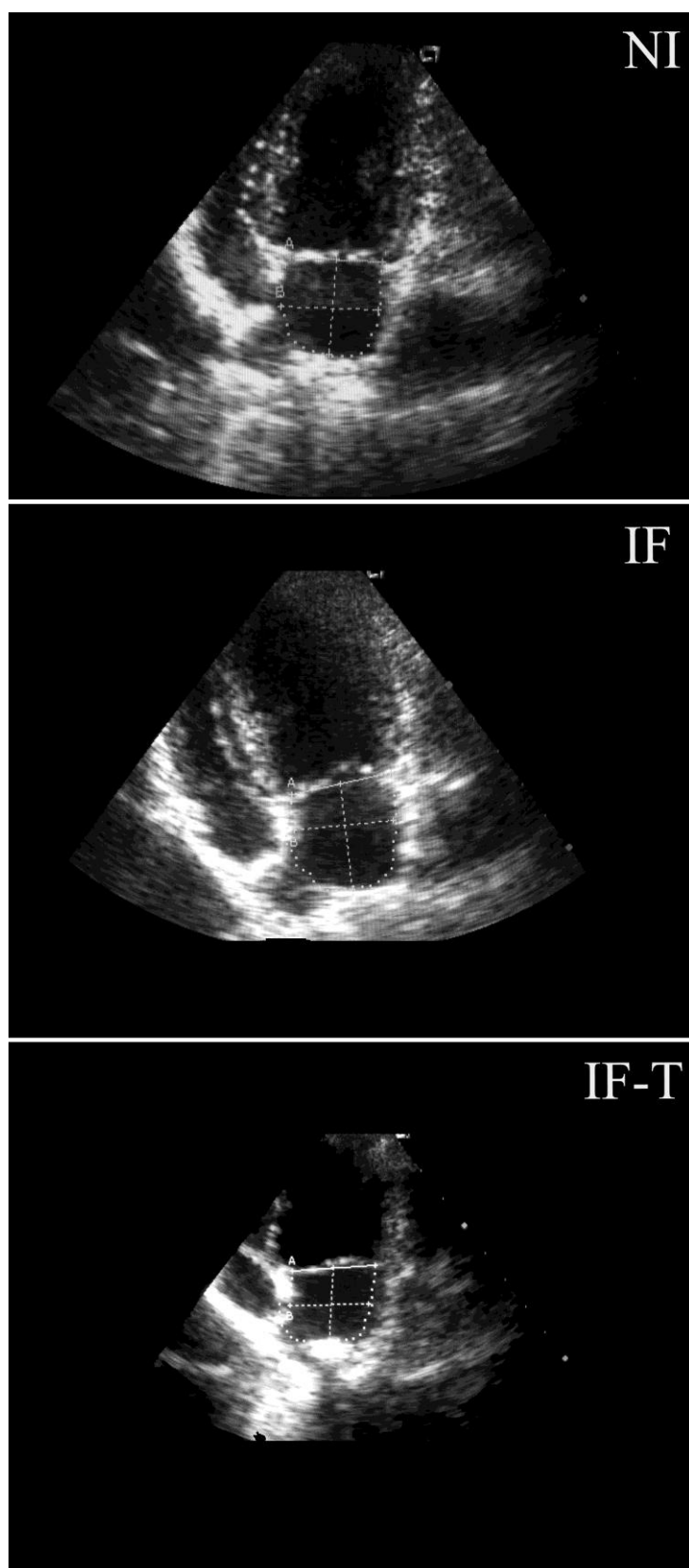


Figura 4: Volume do Átrio Esquerdo mensurado em imagem ecocardiográfica bidimensional do coração. NI: Cão não infectado; IF: Cão infectado com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e não tratado com benznidazol; IF-T: Cão inoculado com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e tratado com benznidazol. Exame realizado um ano após o tratamento específico.

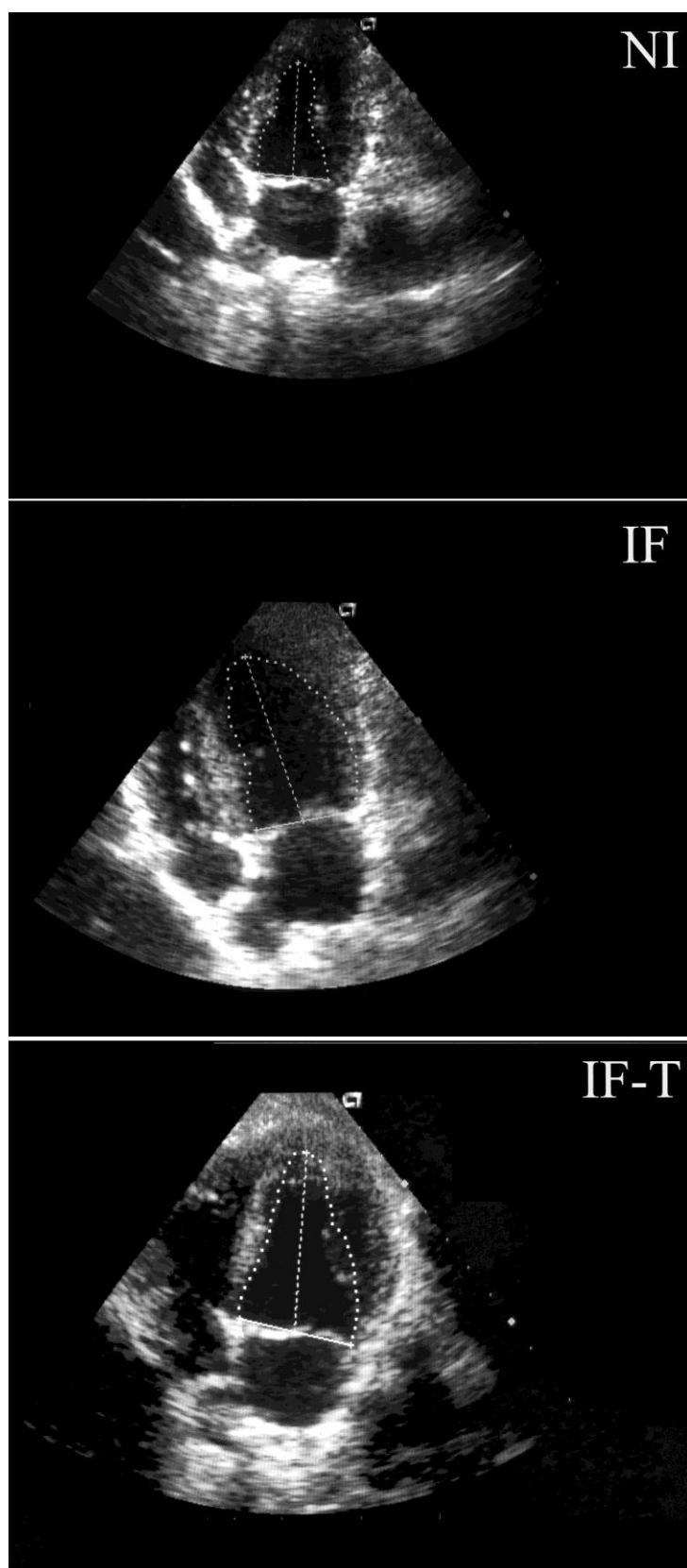


Figura 5: Volume do Ventrículo Esquerdo mensurado em imagem ecocardiográfica bidimensional do coração. NI: Cão não infectado; IF: Cão infectado com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e não tratado com benznidazol; IF-T: Cão inoculado com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e tratado com benznidazol. Exame realizado um ano após o tratamento específico.

5.4.4 Alterações eletrocardiográficas

O estudo das alterações eletrocardiográficas foi realizado com o objetivo de detectar a presença de sobrecargas atriais e ventriculares, ocorrência de bloqueios de condução do impulso elétrico, arritmias e demais intercorrências eventualmente visualizadas na doença de Chagas. Na Tabela 2 são demonstradas as alterações eletrocardiográficas verificadas em cada cão, grupo experimental e período de avaliação, que foram consideradas como sendo características da cardiopatia chagásica.

O bloqueio átrio-ventricular de 1º grau (BAV de 1º grau), um importante e característico acometimento eletrocardiográfico comumente encontrado em períodos iniciais do desenvolvimento da cardiopatia chagásica, foi evidenciado em 22,7% (5 de 22) dos animais infectados, sendo que desses cinco animais infectados, três haviam sido tratados com Bz e manifestaram essa alteração posterior aos animais que não receberam o tratamento. Por sua vez, o bloqueio completo do ramo direito (BCRD) e a extra-sístole ventricular polimórfica foram verificados em 4,5% (1 de 22) dos animais infectados, sendo que ambas essas alterações foram apresentadas por diferentes cães tratados quando avaliados após um ano do tratamento. A sobrecarga biventricular foi determinada em dois animais de ambos os grupos infectados e em similar momento de avaliação (Tabela 2).

Tabela 2: Número de animais com a presença de alterações eletrocardiográficas comumente evidenciadas na cardiopatia chagásica.

Alterações	NI	IF	IF-T
Extra-sístole ventricular polimórfica	0	0	1 (6MAI)
BAV 1º grau	0	2 (6MAI)	2 (18MAI)
BAV 1º grau + BCRD	0	0	1 (18MAI)
Sobrecarga Biventricular	0	1 (6MAI) 1 (18MAI)	1 (6MAI) 1 (18MAI)

MAI= Meses Após a Infecção; NI= Grupo Não Infectado; IF= Grupo Infectado e Não Tratado; IF-T= Grupo Infectado e Tratado.

Para análise de qualquer alteração eletrocardiográfica detectada foi elaborada uma escala de 0 a 3, com evolução de acordo com a gravidade dos achados, previamente definidos pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (SVS, 2005). Na Tabela 3 são descritas todas as alterações eletrocardiográficas evidenciadas e seus respectivos níveis de intensidade e gravidade, além do número de alterações detectadas entre os diferentes grupos (NI, IF e IF-T) nos três momentos de avaliação: antes da infecção, no 1º e 12º mês após o tratamento.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3 observa-se um número mais elevado de cães com nível 0 ou sem alterações eletrocardiográficas visualizadas antes da infecção e após o 6º e 18º mês da inoculação. Além desta elevada inexistência de modificações no eletrocardiograma, também se pode observar que muitas das alterações eletrocardiográficas detectadas são classificadas como inespecíficas ou quando associadas à doença de Chagas, são comumente evidenciadas em estágios iniciais da cardiopatia chagásica (sobrecarga biventricular e bloqueio átrio-ventricular de 1º grau).

Antes da inoculação foi verificada a ocorrência de sobrecarga do ventrículo direito em 2 animais (alteração nível 1 não correlacionada à infecção chagásica quando em ocorrência isolada, mas sim quando antes ocorre a presença de sobrecarga do ventrículo esquerdo). Os demais 28 animais apresentaram exame eletrocardiográfico isento de alterações (nível 0) neste estágio da avaliação. Após 6 meses da infecção, foi detectada alteração eletrocardiográfica de níveis 1 e 2 em 8 animais infectados, 3 tratados e 5 não tratados, sendo que nenhum dos animais do grupo não infectado apresentou modificação no exame eletrocardiográfico realizado neste momento da avaliação. Aos 18 meses de infecção, as alterações eletrocardiográficas de níveis 1 e 2 foram evidenciadas em 7 animais: (i) em três animais infectados e tratados; (ii) em três animais infectados não tratados e (iii) em um animal não infectado, o qual apresentou uma extra-sístole ventricular monomórfica caracteristicamente presente em condições diversas, tal como um elevado nível de estresse frente à injeção do anestésico.

Modificações consideradas um pouco mais graves (classificação nível 3) foram verificadas no exame eletrocardiográfico de animais infectados tratados com Bz, sendo detectada uma grave arritmia, classificada como extra-sístole ventricular polimórfica, em um cão tratado aos 6 meses de infecção, e um bloqueio completo do ramo direito do feixe de Hiss em um outro animal tratado aos 18 meses de infecção. Considerando o total de alterações apresentadas no decorrer do período de infecção (no 6^o e 18^o mês após infecção), foram observados 72,7% (16 dos 22) de modificações no eletrocardiograma entre os animais infectados. Desses 16 animais infectados que demonstraram tais alterações, oito (50% - 8/16) haviam sido tratados e os outros oito (50% - 8/16) pertenciam ao grupo infectado não tratado.

Tabela 3: Classificação das alterações eletrocardiográficas.

Classificação	Acometimento	Grupos experimentais								
		Não Infectado			Infectado			Tratado		
		AI	6 M	18M	AI	6M	18M	AI	6M	18M
Grau 0	* Sem alterações.	8/8	4/4	3/4	9/11	1/6	2/5	11/11	2/6	1/5
Grau 1	* Presença isolada e inespecífica de uma sobrecarga atrial e/ou ventricular.	0	0	0	2	2	2	0	0	1
Grau 2	* Duas ou mais alterações de sobrecargas atriais e/ou ventriculares; Extra-sístole ventricular monomórfica; Bloqueio Átrio-Ventricular de 1º grau (BAV 1º grau);	0	0	1	0	3	1	0	3	2
Grau 3	Extra-sístole ventricular polimórfica; Bloqueio Completo do Ramo Direito (BCRD).	0	0	0	0	0	0	0	1	1

AI = Antes da Infecção; 6M = 6 Meses Após a Infecção; 18M = 18 Meses Após a Infecção.

6. DISCUSSÃO

Uma doença antiga (descrita pela primeira vez há mais de 100 anos - CHAGAS, 1909) e um medicamento antigo (disponibilizado em 1972 pela Roche – PÉREZ-MOLINA e cols., 2009) permanecem coexistindo – a doença de Chagas e o Benznidazol. Entretanto, apesar de serem conhecidos os baixos índices de cura parasitológica induzidos pelo Bz quando o tratamento é realizado na fase crônica da infecção, ainda existem controvérsias sobre a eficácia do tratamento com Bz em induzir um efeito benéfico na evolução da doença crônica. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a influência do tratamento com Bz, realizado durante a fase crônica, na progressão da cardiopatia chagásica de cães infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*.

A eficácia do tratamento em suprimir ou reduzir o parasitismo foi avaliada através dos testes de hemocultura e PCR realizados no sangue dos animais no 1^o, 6^o e 12^o mês após o tratamento, sendo os resultados comparados com aqueles obtidos pela PCR realizada no tecido cardíaco dos animais sacrificados no 1^o e no 12^o mês após o tratamento. Os resultados dos testes parasitológicos (hemocultura e PCR) realizados no 1^o mês após o tratamento revelaram uma drástica redução do parasitismo sanguíneo, sendo o parasito detectado apenas em 18% (2 de 11) dos animais tratados. Em contraste, os resultados destes testes foram positivos em 81% (9 de 11) dos animais infectados e não tratados. Resultado semelhante foi observado em relação ao parasitismo tecidual, sendo o kDNA do *T. cruzi* detectado apenas em 33% (2 de 6) dos animais tratados e necropsiados um mês após o tratamento, e em 100% (5 de 5) dos animais do grupo controle infectado. Entretanto, foi detectado um aumento gradativo na positividade dos testes parasitológicos, o que foi relacionado ao tempo transcorrido após o término do tratamento. Assim, 40% (2 em 5) dos animais avaliados até um ano depois do tratamento apresentaram testes parasitológicos positivos no 6^o mês e 60% (3 em 5) no 12^o mês após o tratamento. Este aumento do parasitismo sanguíneo foi

relacionado com o aumento do parasitismo tecidual, pois o k-DNA do *T. cruzi* passou a ser detectado em 80% (4 de 5) dos animais necropsiados 12 meses após o tratamento. Por outro lado, nos animais infectados e não tratados os níveis de positividade nos testes parasitológicos e moleculares realizados no sangue e no tecido foram semelhantes ao longo do período avaliado, com 80% a 100% de resultados positivos.

Os distintos resultados da eficácia terapêutica com Bz na redução ou supressão da parasitemia que são descritos para as fases aguda e crônica da infecção chagásica, podem ser explicados em decorrência de vários fatores relacionados ao hospedeiro e/ou ao parasito, mas também às diferenças metodológicas utilizadas para avaliação da eficácia terapêutica (VIOTTI e cols., 1994; FRAGATA-FILHO e cols., 1995; de ANDRADE e cols., 1996; SOSA-ESTANI e cols., 1998; 1999; GALVÃO e cols., 2003; ANDRADE e cols., 2004; BRAGA e cols., 2000; CANÇADO, 2002; YUN e cols., 2009).

Técnicas de diagnóstico parasitológico convencionais, como xenodiagnóstico e hemocultura, quando aplicadas no controle de cura da doença de Chagas em indivíduos ou animais tratados na fase crônica, apresentaram 60% a 87,5% de resultados negativos (FRAGATA-FILHO e cols., 1995; GUEDES e cols., 2002). Ao realizar o xenodiagnóstico logo após o tratamento de 71 pacientes chagásicos crônicos com 5 mg de Bz/kg/dia durante 60 dias, Fragata-Filho e cols. (1995) detectaram 60% de negatificação dos exames. Por sua vez, Guedes e cols. (2002) ao tratarem cães infectados com a cepa Berenice-78 com 7mg de Bz/kg/dia durante 45 dias na fase crônica da infecção, detectaram 100% e 87,5% de exames negativos na hemocultura realizada no 1º e 6º mês após o tratamento. Contudo, resultados adicionais obtidos pela PCR do sangue nestes mesmos animais em período similar à hemocultura, revelaram um aumento nos níveis de detecção do parasito, de modo que apenas 37,5% dos animais permaneceram com exames negativos aos seis meses após tratamento (GUEDES e cols., 2002).

De modo semelhante, os nossos resultados da hemocultura realizada no 1^o, no 6^o e no 12^o mês após o tratamento de cães demonstraram respectivamente 100%, 80% e 60% de resultados negativos nos testes realizados nos animais tratados. Quando são acrescentados os resultados obtidos pela PCR realizada no sangue desses mesmos animais em igual momento da avaliação, também se observa uma redução nos percentuais de exames negativos para 81,8%, 60% e 40% respectivamente após o 1^o, 6^o e 12^o mês do tratamento específico.

Por sua vez, ao utilizar essa ferramenta molecular considerada mais sensível que os exames parasitológicos de hemocultura e xenodiagnóstico, Braga e cols. (2000) demonstraram 0% de cura pela PCR realizada com o DNA proveniente de 10ml de sangue coletados 10 anos após o tratamento com Bz de 17 indivíduos na fase crônica da doença de Chagas. Contudo, dados de cura mais expressivos foram obtidos por Galvão e cols. (2003) ao realizarem a PCR em amostras de sangue extraídas de crianças chagásicas após três anos do tratamento com Bz, sendo observados 60,4% de resultados negativos em crianças tratadas comparativamente à apenas 35,8% de exames negativos entre aquelas que não receberam o tratamento específico.

De modo semelhante aos resultados de Galvão e cols.(2003) e diferente do observado por Braga e cols. (2000) os resultados descritos no presente estudo revelaram índices negativos da PCR nas amostras de sangue de 40% dos animais tratados e de apenas 20% dos animais controles infectados, um ano após o tratamento com Bz. De modo interessante, os dados deste estudo, também apontaram uma importante conclusão: quanto maior o tempo transcorrido após o término do tratamento, maiores foram os percentuais de detecção do parasito, expressos por ambas as ferramentas parasitológicas e/ou moleculares. Foram crescentes os níveis de positividade: (i) da hemocultura (0%, 20% e 40%); (ii) da PCR do sangue (18,18%; 40% e 60%) e (iii) da PCR do tecido cardíaco (33,33% e 80%) detectados nos animais tratados ao longo do período de observação, ou seja, de um a 12 meses após o tratamento.

Os resultados discrepantes, principalmente relacionados aos resultados da PCR, que são descritos na literatura para o controle de cura na doença de Chagas, tais como os estudos de Braga e cols. (2000) e Galvão e cols. (2003), também podem ser explicados pelas características genéticas das populações do *T. cruzi* e pelas oscilações entre os níveis de parasitemia ao longo do curso da infecção chagásica, de modo que não se pode garantir que resultados negativos da reação de PCR realmente expressem cura parasitológica (GALVÃO e cols., 2003). Segundo Coura e cols. (1984) diversas linhagens genéticas do *T. cruzi* estariam presentes nas diferentes regiões endêmicas da doença de Chagas, o que poderia influir na positividade dos testes usados no controle de cura, pois é bem determinado que a sensibilidade dos testes parasitológicos e moleculares para detecção do parasitismo sangüíneo é variável de acordo com as características genéticas da população do *T. cruzi* (MIYAMOTO e cols., 2006; VELOSO e cols., 2008).

Neste estudo também foi realizada a detecção de anticorpos específicos da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 para avaliação da interferência do tratamento com Bz na resposta imune humoral de cães inoculados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com Bz induziu uma significativa redução dos níveis de anticorpos de todas as classes e subclasses avaliadas. Entretanto, uma resposta variável foi observada quando foi considerada cada classe ou subclasse de anticorpos. O tratamento específico induziu a uma redução significativa dos níveis de anticorpos da classe IgG e da subclasse IgG2, mas os níveis de anticorpos permaneceram acima do discriminante (apenas em um dos animais tratados foi detectada a soroconversão negativa). O tratamento específico influenciou mais marcadamente a cinética dos anticorpos da subclasse IgG1, tendo sido detectada uma maior redução dos níveis destes anticorpos, além da soroconversão negativa em 50% dos animais.

Semelhantes resultados de decréscimo dos níveis de anticorpos IgG, após quimioterapia com Bz realizada na fase aguda da infecção experimental de cães e

camundongos também inoculados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, foram demonstrados por Guedes e cols. (2002, 2004) e por Caldas e cols. (2008a). Inclusive, ao serem analisados os perfis de anticorpos das subclasses IgG 1, IgG 2a e IgG 2b, Caldas e cols. (2008a) também detectaram níveis mais reduzidos dessas imunoglobulinas em camundongos, aos seis meses após o tratamento, naqueles animais que apresentaram testes negativos de HC e PCR do sangue. Neste contexto, Fernández e cols. (2010) verificaram uma significativa redução nos níveis de IgG 1 em camundongos inoculados com a população RA do *T. cruzi* e tratados com Bz na fase aguda da infecção. De modo inusitado, os autores não observaram diferenças entre os níveis de IgG 2a detectados nos soros dos animais tratados e naqueles que não receberam o medicamento (FERNÁNDEZ e cols., 2010).

Na infecção chagásica humana, também foi evidenciada uma redução dos níveis de anticorpos específicos da classe IgG após realização do tratamento com Bz (ANDRADE e cols., 2004; SOSA-ESTANI e cols., 1998; 1999). Na avaliação da eficácia terapêutica em crianças e adolescentes tratados com Bz no Brasil, Andrade e cols. (2004) verificaram 84,7% de soroconversão a índices negativos de IgG total pela ELISA realizada após seis anos do tratamento específico. De modo similar, Sosa-Estani e cols. (1998, 1999) verificaram 62% a 69% de absorbância negativa de IgG total na ELISA avaliada após quatro e sete anos do tratamento com Bz em crianças chagásicas na Argentina. Segundo os autores, após quatro anos do tratamento, a queda dos títulos de anticorpos ocorreu entre os pacientes que receberam Bz independente do resultado do tratamento, fato não observado entre aqueles que não foram tratados (SOSA-ESTANI e cols., 1998).

De acordo com Galvão e cols., 1993, a sorologia convencional pode permanecer um longo período positiva mesmo após um tratamento bem sucedido. Neste estudo, foi observada a soroconversão negativa dos anticorpos da classe IgG em um dos animais tratados, 12 meses após o tratamento. Neste mesmo animal, todos os testes realizados com amostras de sangue (HC e PCR) ao longo do período de avaliação depois do tratamento apresentaram resultados

negativos. De forma interessante, o kDNA do parasito foi detectado no tecido muscular estriado cardíaco deste animal pela reação de PCR. Resultado similar foi observado por Martins e cols. (2008) na infecção mista de diferentes combinações de genótipos do parasito no modelo murino, sendo evidenciado o kDNA do *T. cruzi* no tecido dos animais tratados que apresentaram resultados negativos nos testes parasitológicos sangüíneos e na sorologia convencional após três meses do tratamento com Bz.

Entretanto, embora a PCR realizada no tecido cardíaco seja sensível para a detecção do kDNA do *T. cruzi* após o tratamento específico, dificilmente poderia ser utilizada na rotina como controle de cura em ensaios clínicos, por ser um exame extremamente invasivo. Nestes casos são muito utilizadas as técnicas sorológicas altamente sensíveis e menos específicas, ou exames parasitológicos indiretos de elevada especificidade e baixa sensibilidade, os quais consistem no enriquecimento da amostra de sangue para possibilitar a multiplicação do parasito existente (PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003). Outra opção ainda é a demonstração do kDNA do parasito pela PCR em amostras de sangue do paciente (BRAGA e cols., 2000). Diante dessa limitação e impasse para um adequado critério de cura, é possível observar que pela utilização de testes sorológicos por um período de avaliação variável de 3 a 13 anos após o tratamento de indivíduos chagásicos crônicos, diferentes trabalhos descreveram índices de pelo menos 8% até 84,7% de negatização dos títulos de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (VIOTTI e cols., 1994; de ANDRADE e cols., 1996; SOSA-ESTANI e cols., 1998; 1999; CANÇADO, 2002; ANDRADE e cols., 2004).

Nesses estudos os percentuais mais elevados de negatização dos exames sorológicos foram evidenciados no tratamento com Bz de crianças e/ou adolescentes, ambos considerados na fase crônica recente da doença de Chagas, com índices de testes negativos variando de 55,8% a 84,7% após três a sete anos do tratamento específico (de ANDRADE e cols., 1996; SOSA-ESTANI e cols., 1998; 1999; ANDRADE e cols., 2004). Considerando estes resultados, Sosa-Estani e cols. (1999) propõem o tratamento com Bz de toda a criança

infectada com o *T. cruzi* que habite nas áreas rurais endêmicas ou em suas proximidades. Contudo, mais recentemente Yun e cols. (2009) observaram uma elevada variação de resultados negativos em testes sorológicos realizados aos 18 e 36 meses após o tratamento com Bz de crianças em diferentes regiões endêmicas na América do Sul: 0-5% na Bolívia, 58% na Guatemala e 87% em Honduras. Nesse caso, as diferenças regionais implicando na provável variabilidade genética em cepas do *T. cruzi* prevalentes em distintas localidades geográficas (COURA e cols., 1984), pode ser novamente um fator relevante e que justifique esses resultados.

Neste sentido, no presente trabalho, procurou-se eliminar um pouco a influência da variabilidade genética do parasito na resposta terapêutica ao ser utilizada apenas a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, considerada sensível ao Bz na fase aguda e com tropismo cardíaco (VELOSO e cols. 2001; MELO & BRENER, 1978; LANA & CHIARI, 1986; CALIARI e cols., 2002). Com o intuito de melhor avaliar os resultados do tratamento com Bz na fase crônica recente da infecção, tal como os estudos realizados em crianças e/ou adolescentes considerados neste estágio da doença, foi utilizado o modelo canino infectado com uma única cepa do *T. cruzi*. A fase crônica recente, período em que teve início o tratamento dos cães, foi considerada aos 120 dias de infecção, momento em que estudos anteriores com diversas cepas do *T. cruzi* neste modelo experimental não mais visualizaram parasitemia patente por exame de sangue a fresco (LANA e cols., 1992; GUEDES e cols., 2004; VELOSO e cols., 2008).

Considerando que os objetivos do tratamento contra a infecção do *T. cruzi* não seria apenas eliminar o parasito, mas também diminuir a probabilidade do desenvolvimento da doença (SOSA-ESTANI, 1993), é importante avaliar a influência do tratamento na fase crônica recente na redução e/ou real interrupção na progressão das lesões cardíaca, e não apenas alcançar a cura parasitária. Para melhor responder essa questão, foi realizada a avaliação da função e das lesões cardíacas em dois momentos após quimioterapia com Bz na fase crônica recente da infecção chagásica no modelo canino: um mês e um ano.

Inicialmente foi avaliada a ocorrência de cardiomegalia, determinada pelo peso relativo do coração (peso do coração/peso do animal). Quando foram comparados os diferentes grupos de animais não foi detectada diferença significativa no peso relativo do coração em nenhum momento da avaliação, ou seja, no 1^o e no 12^o mês após o tratamento dos animais. Entretanto, quando o de peso relativo do coração de cada animal foi comparado com a média+1 desvio padrão dos valores observados nos animais não infectados foi possível determinar que no 1^o mês após o tratamento apenas 16% (1 de 6) dos animais infectados e não tratados apresentaram aumento da área cardíaca. Em contraste, 12 meses após o tratamento foi observado aumento do índice de cardiomegalia em 60% (3 de 5) e em 80% (4 de 5) dos animais infectados não tratados e dos infectados tratados, respectivamente. Neste sentido, de acordo com Chapadeiro (1967), o peso do coração sofre marcada influência da intensidade do infiltrado inflamatório miocárdico e da fibrose que o acompanha. Da mesma forma, Tavares-Neto (1990) demonstraram que os corações de indivíduos portadores de cardiopatia chagásica crônica, avaliados após a autópsia, apresentaram-se mais pesados proporcionalmente ao aumento do infiltrado inflamatório e da presença de ninhos de amastigota no coração. Estes dados estão de acordo com os nossos resultados, que demonstraram uma maior presença do parasito pela elevação nos percentuais de testes de PCR positivos, tanto no tecido cardíaco quanto no sangue, realizados 12 meses após o tratamento.

Para verificar se as alterações do peso relativo do coração poderiam ser relacionadas com a intensidade do processo inflamatório e da fibrose no tecido muscular estriado cardíaco foi realizada a análise morfométrica nos mesmos períodos. Os resultados demonstraram que na avaliação realizada no 1^o mês após o tratamento os níveis de inflamação e fibrose detectados no tecido cardíaco dos animais tratados foram próximos ao detectado naqueles não infectados. Ao passo que, neste mesmo momento, níveis maiores de inflamação e fibrose foram detectados no tecido cardíaco dos animais infectados e não tratados, embora esta diferença não tenha sido confirmada estatisticamente. Esses dados estão de acordo com os

estudos realizados por Garcia e cols. (2005) e por Bustamante e cols. (2007), que demonstraram a redução das lesões cardíacas em camundongos tratados com Bz.

Considerando a possibilidade e o prolongamento do tempo na evolução da doença crônica, um grupo de animais foi avaliado até 12 meses após o tratamento específico. Na detecção das lesões cardíacas realizadas neste período foi observado um aumento do número de células e área de fibrose nos animais tratados em relação aos não infectados. Nesta avaliação, a quantificação do processo inflamatório e da área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso detectado no átrio direito dos animais foi semelhante entre todos os animais infectados, tratados ou não, e significativamente mais intensos do que o detectado nos animais não infectados. É curioso observar que o aumento da intensidade do processo inflamatório e da fibrose foi coincidente com o aumento dos índices de detecção do parasito no sangue e no tecido cardíaco dos animais infectados e tratados. Por sua vez, Caldas e cols. (2008a) ao tratarem camundongos inoculados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* durante a fase aguda, observaram uma redução das lesões cardíacas dos animais sacrificados 10 meses após o tratamento. Esse fato pode ser explicado pela maior eficácia do tratamento precoce, que foi também demonstrada pela negatificação dos testes sorológicos e parasitológicos ou moleculares (HC e PCR) realizados em amostras de sangue coletadas seis meses após o tratamento (CALDAS e cols., 2008a). Esta hipótese é reforçada pelos resultados de Guedes e cols. (2004) que observaram 100% de cura, também demonstrada pela negatificação dos testes sorológicos, parasitológicos e moleculares, de cães infectados pela cepa Berenice-78 do *T. cruzi* tratados com Bz durante a fase aguda da infecção. Adicionalmente, foi demonstrado por Caldas e cols. (2008b) que o tratamento precoce com Bz de cães infectados com a cepa Berenice-78 previne o aparecimento de lesões cardíacas durante a fase crônica da doença. Nossos dados, avaliados de forma conjunta, mostram que no primeiro mês após o tratamento foi detectada a redução do parasitismo (sanguíneo e tecidual), sendo, também, o índice de peso do coração e a intensidade das lesões cardíacas semelhantes aos dos animais não

infectados. Por outro lado, 12 meses após o tratamento foi detectado um aumento da carga parasitária, do índice de peso do coração e da intensidade das lesões cardíacas, que foram similares ao observado nos animais infectados e não tratados.

A participação do *T. cruzi* na indução da resposta imune que culmina na gênese do infiltrado inflamatório e lesões teciduais, com a remodelação do órgão e detecção das crescentes áreas de fibrose miocárdicas, tem sido cada vez mais demonstrada. Schijman e cols. (2004) observaram uma maior detecção do kDNA do *T. cruzi* no coração de pacientes chagásicos que apresentavam falência cardíaca (90%) e maiores graus de fibrose e inflamação (100% de ambos), em relação àqueles em que não havia sido detectada a falência prévia do órgão (45%) e possuíam níveis mais brandos de inflamação e fibrose (15% e 33%, respectivamente). Xueqing e cols. (2010) demonstraram que cardiomiócitos humanos sintetizam óxido nítrico e TNF- α em resposta à infecção pelo *T. cruzi*, o que pode contribuir para a gênese das lesões teciduais e disfunções anatômicas descritas na cardiopatia chagásica crônica.

Desse modo, além do estudo das lesões teciduais e detecção do *T. cruzi* sob a influência do tratamento com Bz na fase crônica da doença de Chagas no modelo cão, foram analisados os níveis de citocinas regulatória (IL-10) e inflamatória (TNF- α) sintetizadas pelas células mononucleares do sangue periférico no 1^o e no 12^o mês após o tratamento. Os resultados obtidos demonstraram que um mês após o tratamento, os animais infectados (tratados ou não com Bz) apresentavam níveis médios de IL-10 significativamente mais elevados que os animais não infectados; mas 12 meses após o tratamento foi detectada uma normalização da IL-10 nos animais infectados, tratados ou não. Um perfil inverso foi observado com os níveis médios de TNF- α : após um mês do tratamento não havia diferença significativa na quantificação dessa citocina entre os grupos de cães. Contudo, 12 meses após o tratamento ambos os grupos infectados com o *T. cruzi* (tratados ou não) passaram a apresentar níveis significativamente mais elevados de TNF- α em relação ao grupo de animais

não inoculados com o parasito. Estes resultados estão de acordo com a intensidade do processo inflamatório e da área ocupada pelo tecido fibroso detectada no tecido cardíaco dos animais, que foram mais intensos nas avaliações realizadas 12 meses após o tratamento, momento em que os níveis de IL-10 foram menores e os de TNF- α mais elevados. Também utilizando o cão como modelo experimental, Guedes e cols. (2009) verificaram que os baixos índices de IL-10 associados a uma elevada síntese de IFN- γ e TNF- α pelas células mononucleares do sangue periférico estão relacionados com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. Da mesma forma, em indivíduos chagásicos crônicos os níveis de TNF- α são relacionados com o desenvolvimento da cardiopatia, sendo que níveis mais elevados foram detectados no soro dos indivíduos sintomáticos (FERREIRA e cols., 2003; TALVANI e cols., 2004). Mas, segundo D'Ávila e cols.(2009) não são apenas os elevados níveis de citocinas inflamatórias, mas sim a ausência de equilíbrio entre a produção de citocinas regulatórias e inflamatórias que conduzem para a cardiopatia chagásica crônica. Situação de equilíbrio entre a síntese de IFN- γ e de IL-4 foi descrita em crianças chagásicas, sendo esse perfil condizente com a ausência dos sinais e sintomas específicos na forma indeterminada da fase crônica da doença de Chagas (SAMUDIO e cols., 1998). Dessa forma, é interessante observar que no presente estudo a elevação da citocina inflamatória TNF- α foi acompanhada pela redução dos níveis detectados da citocina regulatória IL-10, no momento em que os animais infectados (tratados ou não) apresentaram os mais acentuados graus de lesões cardíacas, aos 18 meses após a inoculação.

A progressão da cardiopatia chagásica crônica foi também avaliada por ecocardiograma e eletrocardiograma, utilizando parâmetros que mensuram a área cardíaca, bem como a função sistólica e diastólica do órgão. De acordo com BESTETTI, (2001) a ecocardiografia é uma importante ferramenta para avaliar os fatores preditivos de um prognóstico desfavorável na evolução da doença. Neste sentido, os exames ecocardiográficos realizados em dois momentos principais (no 1º e 12º mês após tratamento) possibilitaram

observar que após um mês do tratamento específico, não foram detectadas alterações importantes pelas variáveis analisadas. Por outro lado, a mesma avaliação realizada 12 meses após o tratamento evidenciou importantes alterações nos exames ecocardiográficos nos animais infectados (tratados ou não). Entretanto, as alterações da função sistólica foram evidenciadas apenas no ecocardiograma realizado nos animais infectados e não tratados. De acordo com Viotti e cols. (2004) em estudo realizado com pacientes chagásicos sem falência cardíaca evidente, a ecocardiografia foi útil para caracterizar e determinar o prognóstico da cardiopatia chagásica crônica. Do mesmo modo, o eletrocardiograma também é uma ferramenta importante para avaliar a evolução do acometimento cardíaco na doença de Chagas, além de apresentar um baixo custo e facilidade de ampla cobertura em áreas endêmicas (LARANJA e cols., 1949; LARANJA e cols., 1956; DIAS, 2002; TORRES e cols., 2007).

De acordo com as variáveis ecocardiográficas analisadas para avaliação das disfunções cardíacas, foi significativamente detectado aos 18 meses da infecção nos grupos inoculados com o parasito (12 meses após tratamento): (i) o aumento no volume do ventrículo esquerdo; (ii) aumento do índice de massa do ventrículo esquerdo e (ii) elevação no volume do átrio esquerdo; em relação aos animais controles não infectados. As demais alterações verificadas aos 18 meses após a inoculação ocorreram apenas no grupo de animais infectados que não foram tratados com Bz, em relação aos animais controles não infectados, sendo: (i) uma redução na fração de ejeção; (ii) redução da fração de encurtamento e (iii) aumento do volume sistólico do ventrículo esquerdo. Na avaliação realizada 12 meses após o tratamento foi observada uma significativa redução na fração de ejeção e fração de encurtamento dos animais que não foram tratados em relação àqueles tratados com Bz. Estes resultados indicam que o tratamento foi eficaz em prevenir as alterações de função cardíaca sistólica que foram avaliadas neste estudo. É importante ressaltar, que as alterações na função cardíaca passaram a ser detectadas nos animais infectados apenas nos exames realizados 18 meses após a

infecção (12 meses após o tratamento). Esses dados estão de acordo com a evolução clínica descrita para a cardiopatia chagásica – uma miocardite com processo inflamatório clinicamente silencioso na fase aguda, mas que aumenta com o avançar da fase crônica, na qual são evidenciados mecanismos patogênicos de hipoperfusão miocárdica contribuindo com a característica disfunção do ventrículo esquerdo (ANDRADE e cols., 1997; MARIN-NETO e cols., 2007). Os parâmetros de melhora da função cardíaca sistólica dos animais tratados com Bz aos 18 meses de infecção e um ano após tratamento, também são condizentes com outros achados, tais como aqueles obtidos por Viotti e cols. (2006) ao analisarem por ecocardiografia os parâmetros fração de ejeção e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo em indivíduos chagásicos crônicos tratados com Bz comparativamente àqueles não tratados.

Estudos anteriores demonstraram que o desenvolvimento de disfunção do ventrículo esquerdo é a característica mais comum e consistente fator de risco associado à morte de cardiopatas chagásicos crônicos (NUNES e cols., 2008; VIOTTI e cols., 2005). Segundo RASSI Jr. e cols. (2007) a disfunção sistólica do ventrículo esquerdo é considerada a alteração mais marcante da cardiopatia chagásica, bem como o principal fator de risco preditivo de morte. Neste sentido, as variáveis: fração de ejeção, fração de encurtamento e diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, mensuradas no presente trabalho, corroboram para a avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo.

A fração de ejeção reflete o percentual do fluxo sanguíneo resultante do movimento sistólico, de modo que o decréscimo de seus valores observados após 18 meses da infecção nos animais infectados não tratados pode ser associado à disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, fato que não foi observado nos demais grupos de animais: não infectado e infectado tratado. Bestetti (2001), em estudo com pacientes chagásicos, definiu a presença de disfunção ventricular esquerda quando a fração de ejeção se encontrava abaixo de 55%, o que foi evidenciado em 44 dos 74 indivíduos avaliados. Para Huang e cols. (2009) a falência cardíaca sistólica foi definida por valores da fração de ejeção menores que 50%, sendo os percentuais

mais reduzidos dessa variável associados à maior ocorrência de mortalidade cardiovascular entre os 650 pacientes chagásicos avaliados ($p=0,001$).

A fração de encurtamento é uma variável comumente utilizada na avaliação da função cardíaca que pode se apresentar diminuída em casos de cardiomiopatia dilatada e intensa sobrecarga de volume (TILLEY & GOODWIN, 2002). Nossos dados obtidos para a fração de encurtamento corroboram os dados de fração de ejeção, demonstrando uma nítida redução na capacidade sistólica no bombeamento do sangue nos animais infectados que não foram tratados com Bz, quando comparados àqueles que receberam o tratamento específico.

O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo é mensurado ao final da sístole ventricular esquerda e seus valores aumentam em doenças que causam sobrecarga de volume e cardiomiopatia dilatada (SISSON & SCHAEFFER, 1991). No presente estudo, foi observado o significativo aumento deste diâmetro apenas nos animais infectados que não foram tratados, após 18 meses da infecção e evolução natural da cardiopatia chagásica na ausência de tratamento específico. De acordo com Viotti e cols. (2004) o aumento da dimensão sistólica do ventrículo esquerdo, correlacionada à elevação nas medidas das variáveis volume e índice de massa desta cavidade cardíaca, também foi considerado um bom índice preditivo da mortalidade de 16 dos 849 indivíduos chagásicos avaliados, juntamente com a redução na fração de ejeção.

Por sua vez, parâmetros ecocardiográficos mensurados para avaliação das dimensões ventriculares, tais como volume e índice de massa do ventrículo esquerdo, também são importantes para monitor a evolução das sobrecargas e dilatações cardíacas (ACQUATELLA, 2007; TILLEY & GOODWIN, 2002;). Segundo Acquatella (2007) o aumento das dimensões ventriculares associados a alterações na função sistólica, possui valor significativo no desenvolvimento da morbidade e mortalidade da cardiopatia chagásica. Neste sentido, a significativa elevação nos valores do volume e índice de massa do ventrículo esquerdo evidenciados após 18 meses da infecção, em ambos os grupos infectados, independente da

ocorrência do tratamento com Bz, quando comparados aos animais não infectados, refletem o similar acometimento da cardiopatia chagásica sem a ocorrência de interrupções ou alterações pelo tratamento específico.

O volume do átrio esquerdo, também representa um marcador prognóstico na evolução da cardiopatia chagásica (TORRES, 2004). Torres (2004) ao avaliar os fatores relacionados com o aumento do volume do átrio esquerdo em pacientes chagásicos cardiopatas, detectou uma associação significativa entre o maior volume do átrio esquerdo e a elevação da massa e volume diastólico final. Desse modo, verificou-se que o volume do átrio esquerdo, um marcador da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo, é também uma variável importante no prognóstico de pacientes com a cardiopatia chagásica. Nossos dados revelaram que a infecção pelo *T. cruzi* induziu a uma elevação significativa do volume do átrio esquerdo 18 meses após a inoculação, independente da ocorrência de prévio tratamento específico. Dessa forma, também se evidenciou indícios do acometimento de disfunção diastólica associadas às alterações sistólicas do ventrículo esquerdo após 18 meses da infecção, e conseqüente um ano após o tratamento dos cães.

De modo interessante, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de cães infectados com o *T. cruzi* (tratados ou não com Bz) quando analisadas as variáveis ecocardiográficas que refletem as dimensões cardíacas, mensuradas no ventrículo esquerdo, e na variável volume do átrio esquerdo, a qual pode ser correlacionada à função diastólica do ventrículo esquerdo. Por sua vez, foi detectada uma significativa alteração na função sistólica do ventrículo esquerdo (avaliadas pelos dados da fração de ejeção e fração de encurtamento) nos animais infectados que não foram tratados, quando comparados aos animais infectados tratados e aqueles não infectados. Estes resultados demonstram que o tratamento com Bz na fase crônica foi capaz de prevenir a disfunção cardíaca sistólica, mas não impediu o desenvolvimento da cardiopatia chagásica e as alterações de função cardíaca diastólica. Dados um pouco discordantes, com um pior risco de evolução da cardiopatia em indivíduos não

tratados com Bz, foram demonstrados por Viotti e cols. (2005) ao analisarem durante oito anos com exames eletrocardiográficos, ecocardiograma e raio X, a evolução da cardiopatia em 856 pacientes com sorologia positiva para o *T. cruzi* mas que ainda não apresentavam evidências de falência cardíaca no início do estudo. Dentre os 856 pacientes avaliados, 486 haviam sido tratados com Bz e 370 não tinham recebido tratamento etiológico antes de iniciarem o estudo. Uma pior evolução clínica da cardiopatia chagásica foi detectada em 74 indivíduos, sendo que 25,7% dos mesmos (19 dos 74) haviam sido tratados com Bz e 74,3% (55 de 74) não haviam recebido o tratamento específico. Associado aos resultados obtidos, os autores afirmaram que em 137 dos 856 pacientes iniciais não foi possível finalizar o trabalho, por mudanças de endereço ou outros acontecimentos que inviabilizaram a coleta de dados nestes pacientes (VIOTTI e cols., 2005).

As anormalidades eletrocardiográficas detectadas nos animais avaliados neste estudo que normalmente são correlacionadas à cardiopatia chagásica foram: a sobrecarga das cavidades cardíacas, presença de arritmias com extra-sístole ventricular monomórfica e extra-sístole ventricular polimórfica, bloqueio átrio-ventricular de 1º grau (BAV de 1º grau) e bloqueio completo de ramo direito (BCRD). Avaliações eletrocardiográficas realizadas em pacientes chagásicos demonstram a importância da detecção de BCRD como um acometimento prevalente e indicador de mau prognóstico na evolução da cardiopatia (ANDRADE e cols., 1998; VIOTTI e cols., 2005). Nossos dados demonstraram a ocorrência de BCRD em 4,6% (1 de 22) dos animais aos 18 meses da infecção com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, sendo este animal previamente tratado com Bz. Além do BCRD, ocorreu a detecção do BAV de 1º grau em 22,7% (5 de 22) dos cães infectados, tendo sido o tratamento realizado em três dos mesmos. Dados semelhantes foram descritos por Lana e cols. (1992) na fase crônica (dois a quatro anos de infecção) de cães inoculados com a cepa Berenice-78 ou Berenice-62 do *T. cruzi*, com prevalência de BCRD em 8,3% e BAV de 1º grau em 33,3% dos animais.

Entretanto, apenas agora foi realizada a avaliação da influência do tratamento com Bz na fase crônica da infecção no modelo canino para a evolução dos acometimentos eletrocardiográficos da cardiopatia chagásica. Nossos dados demonstraram que as alterações eletrocardiográficas evidenciadas não são consideradas as mais graves e com pior prognóstico cardíaco, de acordo com o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005. Associado a este fator, a prevalência das alterações foi similar entre os grupos de animais infectados, de modo que o tratamento não impediu o desenvolvimento das iniciais anormalidades na condução dos impulsos elétricos no coração, uma vez que oito dos 16 animais que apresentaram alterações eletrocardiográficas desencadeadas pelo *T. cruzi* foram tratados com Bz. O BAV de 1º grau, uma alteração característica e prevalente nos estágios iniciais da forma cardíaca na doença de Chagas, foi evidenciada em 27,3% (três de 11) dos animais tratados e em 18,2% (dois de 11) daqueles que não receberam o tratamento específico. Por sua vez, alterações no eletrocardiograma consideradas um pouco mais graves e correlacionadas a um pior prognóstico na cardiopatia chagásica foram evidenciadas apenas em animais infectados tratados: um BCRD após um ano do tratamento em um cão e uma extra-sístole ventricular polimórfica após um mês do tratamento em outro animal infectado tratado.

Nossos dados analisados de forma conjunta demonstraram que o tratamento específico com benznidazol realizado durante a fase crônica da doença foi eficiente em reduzir a carga parasitária e lesões cardíacas logo após o término do tratamento e em prevenir a disfunção cardíaca sistólica quando percorrido um maior período de tempo para evolução natural da cardiopatia chagásica crônica na ausente pressão tripanocida. Futuras avaliações sobre os efeitos do benznidazol em animais infectados com cepas do *T. cruzi* mais resistentes ainda são necessárias, uma vez que os parâmetros elucidados no presente estudo foram realizados em animais infectados unicamente com a cepa Berenice-78, considerada sensível ao medicamento.

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1. O tratamento com Bz na fase crônica da doença de Chagas reduz a carga parasitária sanguínea e tecidual. Mas este efeito tripanocida não foi estável, apresentando um contínuo aumento da detecção do parasito no decorrer da evolução da doença crônica e conseqüente tempo após encerramento do tratamento.
2. A intensidade do processo inflamatório e da fibrose no miocárdio é relacionada ao tempo de infecção e acometimento da cardiomegalia, sendo que o tratamento com Bz não foi eficaz em prevenir o desenvolvimento dessas lesões cardíacas em longo prazo.
3. A evolução da cardiomegalia e lesões cardíacas são acompanhadas por alterações na síntese de citocina regulatória (IL-10) e inflamatória (TNF- α), sendo detectados níveis mais elevados de TNF- α e mais reduzidos de IL-10 com o avançar do desenvolvimento da cardiopatia chagásica, independente do tratamento com Bz.
4. O tratamento com Bz foi capaz de prevenir alterações da função cardíaca sistólica, não sendo efetivo em prevenir a disfunção diastólica monitorada de acordo com os parâmetros deste estudo.
5. O avançar do tempo de infecção pelo *T. cruzi* pode causar uma lenta formação de sobrecargas e bloqueios na condução do impulso elétrico nas cavidades cardíacas, não sendo a administração do benznidazol na fase crônica recente uma alternativa eficiente para impedir o desenvolvimento dessas alterações.

8. Referências Bibliográficas

ACOSTA, A.M.; SANTOS, B. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation*, v.71, p.1255-1261, 1985.

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas Heart Disease. *Circulation*, v.115, p.1124-1131, 2007.

AGUILAR, H.M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J.C.P.; JUNQUEIRA, A.C.V.; COURA, J.R. Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.102(1), p.47-55, 2007.

ANDRADE, A.L.; ZICKER, F. Chronic malnutrition and *Trypanosoma cruzi* infection in children. *J. Trop. Pediatr.* v.41, p.112-115, 1995.

ANDRADE, A.L.S.S., F. ZICKER, R.M. OLIVEIRA, S.A. SILVA, A. LUQUETTI, L.R. TRAVASSOS, I.C. ALMEIDA, S.S. ANDRADE, J.G. ANDRADE, AND C.M.T. MARTELLI. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.*, v.348, p.1407–1413, 1996.

ANDRADE, A.L.S.S., F. ZICKER, F.; RASSI, A.; RASSI, A.G.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, S.A.; ANDRADE, S.S.; C.M.T. MARTELLI. Early Electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi* seropositive children. *Am J Trop Med Hyg.*, v.59(4), p. 530-534, 1998.

ANDRADE, A. L. S. S.; MARTELLI, C. M. T.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; AIRES, A. I. S.; SOUSSUMI, L. M. T.; COVAS, D. T.; SILVA, L. S.; ANDRADE, J. G.; TRAVASSOS, L. R.; ALMEIDA, I. C. Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi* infected adolescents after a six-year follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 71(5), p. 594-597, 2004.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A.; SADIGURSKY, M.; MAGUIRE, J.H. Experimental Chagas' disease in dogs. A pathologic and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* v.105, p.460-464, 1981.

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L. Therapy of the chronic phase of the experimental infection by *Trypanosoma cruzi* with benznidazole and nifurtimox. *Rev Soc Bras Med Tropical*, v.22(3), p.113-118, 1989.

ANDRADE, S.G.; RASSI, A.; MAGALHÃES, J.B.; FILHO, F.F.; LUQUETTI, A.O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 86, p. 624-626, 1992.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. Pathology of experimental Chagas disease in dogs *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.75 (Suppl.3), p.77-95, 1980.

ANDRADE, Z.A. The canine model of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.79, p.77-83, 1984.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M.; WENTHOLD Jr, R.J.; HILBERT, S.L.; FERRANS, V.J. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg.*, v.57, p.328-336, 1997.

AÑEZ, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALES, N.; PERCOCO, E.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg*, v.60, p.726-732, 1999.

ANSELMÍ, A.; PIFANO, F.C.; SUAREZ, J.A.; DOMINGUEZ, A.; VAZQUEZ, A.O.; ANSELMÍ, G. Experimental *Schizotrypanum cruzi* myocarditis. Correlation between histopathologic and eletrocardiografic findings in experimental Chagas' heart disease. *Am. Heart. J.*, v.70 (Suppl.4), p.638-656, 1965.

ANSELMÍ, A.; PIFANO, F.C.; SUAREZ, J.A.; GURDIEL, O. Miocardiopathy in Chagas' disease. Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas myocarditis. *Am. Heart. J.*, v.72 (Suppl.4), p.469-481, 1966.

ÁVILA, H.; GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR – amplified minicircle variable region sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 42, p. 175-188, 1990.

ÁVILA, H. A.; SIGMAN, D. S.; COHEN, L. M.; MILLIKAN, R. C.; SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolation from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 40, p. 211-222, 1991.

BAHIA, M.T.; TAFURI, W.L.; CALIARI, M.V., VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; COELHO, G.L.; LANA, M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.35(4), p.339-345, 2002.

BARBOSA, A.J.A.; GOBBI, H.; LINO, B.T.; LAJES SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; TEIXEIRA, V.P.A.; ALMEIDA, H.O. Estudo comparativo entre o método convencional e o método peroxidase antiperoxidase na pesquisa do parasitismo tissular na cardiopatia chagásica crônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.28, p.91-96, 1986.

BARRETTO, A.C.; IANNI, B.M. The undetermined form of Chagas' heart disease: concept and forensic implications. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.113, p.797-801, 1995.

BELLOTTI, G.; BOCCHI, E.A.; HIGUCHI, M.L.; BARBERO-MARCIAL, M.; SOSA, E.; ESTESVES-FILHO, A.; KALIL, R.; WEISS, R.; JATENE, A.; PILEGGI, F. *In vivo* detection of antigens in heart of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J.* 131: 301-307, 1996.

BENCHIMOL-BARBOSA, P.R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol.*, v.112, p.132-133, 2006.

BESTETTI, R.B. Predictors of unfavourable prognosis in chronic Chagas' disease. *Trop Med Int Health*, v.6(6), p.476-483, 2001.

BIOLO, A.; RIBEIRO, A.L.; CLAUSELL, N. Chagas Cardiomyopathy – Where Do We Stand After a Hundred Years? *Progress Cardio Diseases*, v.52, p.300-316, 2010.

BRAGA, M. S.; LAURIA-PIRES, L.; ARGANARAZ, E. R.; NASCIMENTO, R. J.; TEIXEIRA, A. R. L. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo*, v. 42, p. 157-161, 2000.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.4, p.389-396, 1962.

BRENER, Z. Immune response and immunopathology in *Trypanosoma cruzi* infection. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E., Rassi, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. *São Paulo ISBT BRAZIL – SBHH*, p.31-47, 1992b.

BRENER, Z. Chagas disease and the nervous system. *PAHO Scientific Publ*, v.547, p. 30-46, 1994.

BRENER, Z. & GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v.114, p.103-110, 1997.

BRIERE, F.; SERVET-DELPRATE, C.H.; BRIDON, J.M. Human interleukin 10 induces nave surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 e IgG3. *J Exp Med.*, v.179, p.757-762, 1994.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; WINCKER, P. & MOREL, C. M. A simple protocol for cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood sample and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 88, p. 171-172, 1993.

BUSTAMANTE, J.M.; Lo PRESTI, M.S.; RIVAROLA, H.W.; FERNÁNDEZ, A.R.; ENDERS, J.E.; FRETES, R.E.; PAGLINI-OLIVA, P. Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. *Int J Atimicrob Agent.*, v.29, p.733-737, 2007.

CALDAS, S.; SANTOS, F.M.; LANA, M.; DINIZ, L.F.; MACHADO-COELHO, G.L.; VELOS, V.M.; BAHIA, M.T. *Trypanosoma cruzi*: Acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. *Exp Parasitol.*, v.118(3), p.315-318, 2008.

CALDAS, I.S.; TALVANI, A.; CALDAS, S.; CARNEIRO, C.M.; LANA, M.; GUEDES, P.M.M.; BAHIA, M.T. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res.*, v.103, p.403-421, 2008a.

CALDAS, I.S. *Avaliação da eficácia do tratamento específico com Benznidazol na progressão da doença de Chagas experimental e a correlação entre a eficácia do tratamento nos modelos canino e murino*. Dissertação. Ouro Preto, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2008b.

CALIARI, M.V.; LANA, M.; LEITE, V. H.; TAFURI, W. L. Morphological and morphometric study of atrial specific granules and other secretory components in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 76(4), p. 299-307, 1995.

CALIARI, M.V.; MACHADO, R.P.; LANA, M.; CAJÁ, R.A.F.; CARNEIRO, C.M.; BAHIA, M.T.; SANTOS, C.A.B.; MAGALHÃES, G.A.; SAMPAIO, I.B.M.; TAFURI, W.L. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.44(5), p.273-278, 2002.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 12, p. 93-100, 1964.

CANÇADO, J.R. & BRENER Z. Terapêutica. In: Brener, Z. & Andrade, Z.A. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. pp. 362-424, 1979.

CANÇADO, J.R. Terapêutica específica. In Dias, J.C.P.; Coura, J.R. (eds), *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*, p. 323-351, 1997.

CANÇADO, J.R. Evolution of knowledge on the etiological diagnosis of chagasic infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (I): 283-284, 1999.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas' disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 44, p. 29-37, 2002.

CARRASCO, H.A.; PARADA, H.; GUERRERO, L.; DUQUE, M.; DURÁN, D.; MOLINA, C. Prognostic implications of clinical, electrocardiographic and hemodynamic findings in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol.*, v. 43, p. 27-38, 1994.

CERBAN, F.M.; GEA, S.; MENSÓ, E.; VOTTERO-CIMA, E. Chagas' Disease: IgG Isotypes against *Trypanosoma cruzi* Cytosol Acidic Antigens in Patients with Different Degrees of Heart Damage. *Clin Immunol Immunopathol.*, v. 67(1), p. 25-30, 1993.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.1, p.159-218, 1909.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.3, p.219-275, 1911.

CHAPADEIRO, E. Peso do coração e intensidade do processo inflamatório na cardiopatia crônica. *Bol Ofic Sanit Panamer.* v.63, p.236, 1967.

CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M. & CHIARI, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 22, p. 19-23, 1989.

COSSIO, P.M.; DIEZ, D.; SZARFMAN, A.; ARANA, R. M. Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, v.49, p.13-21, 1974.

COURA, J.R.; ABREU, L.L.; DUBOIS, L.E.G.; CORREIA-LIMA, F.; ARRUDA, J.R.E.; WELLCOX, H.P.F.; ANUNZIOTO, N.; PESTANA, W. Morbidade da doença de Chagas. II

– Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.79, p.121-124, 1984.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.102(1), p.113-122, 2007.

CROFT, S.L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94(2), p. 215-220, 1999.

CUÑA, W.R. & CUÑA, C.R Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.90, p.503-507, 1995.

D'ÁVILA, D.A.; GUEDES, P.M.M.; CASTRO, A.M.; GONTIJO, E.D.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C. Immunological imbalance between IFN- γ and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.104(1), p.100-105, 2009.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico-epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982. Tese. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 384p., 2002. In: Torres, R.M. e cols. (2007). Manual de Interpretação das alterações eletrocardiográficas na cardiopatia chagásica. *Ministério da Saúde, Brasil*, 2007.

DIAS, J.C.P. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad Saúde Pública.*, v.16 (Suppl.2), p.43-59, 2000.

DIAS DE TORANZO, E.G.; CASTRO, J.Á; FRANKE DE CAZZULO, B.M.; CAZZULO, J.J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and Kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experimentia*, v. 44, p. 880-891, 1988.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunology*, v.17, p.451-458, 1995.

DINIZ, L.F.; CALDAS, I.S.; GUEDES, P.M.; CREPALDE, G.; LANA, M.; CARNEIRO, C.M.; TALVANI, A.; URBINA, J.A.; BAHIA, M.T. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.54(7), p.2979-2986, 2010.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact.*, v.73, p.1-27, 1990.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K.J.; PINTO-DIAS, J.C.P.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO-PARRA, J.F. Cytokine mRNA Profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Individuals with *Trypanosoma cruzi* Chronic Infection. *Scand J Immunol.*, v.45, p.74-80, 1997.

ETTINGER, S.J. AND SUTER, P.F. Canine Cardiology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1970.

FABRO De SUASNÁBAR, D.; ARIAS, E.; STREIGER, M.; PIACENZA, M.; INGARAMO, M.; Del BARCO, M.; AMICONE, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic Chagasic patients. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.42, p.99-110, 2000.

FEIGENBAUM, H. Echocardiography. 5th ed Malvem: Lea & Febiger, 695p., 1994.

FERNÁNDEZ, M.C.; GONZÁLEZ-CAPPA, S.M.; SOLANA, M.E. *Trypanosoma cruzi*: Immunological predictors of benznidazole efficacy during experimental infection. *Exp Parasitol.*, v.124, p.172-180, 2010.

FERREIRA, H.O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com Nifurtimox e Benzonidazol. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.23, p.209-211, 1990.

FERREIRA, R.C.; IANNI, B.M.; ABEL, L.C.J.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Increased Plasma Levels os Tumor Necrosis Factor- α in Asymptomatic/“Indeterminate” and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.98(3), p.407-411, 2003.

FORÉS, R.; SANJUÁN, I.; PORTERO, F.; RUIZ, E.; REGIDOR, C.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; LINARES, M.; GIL, S.; OJEDA, E.; KRSNIK, I.; BAUTISTA, G.; VALLEJO, C.; GARCÍA-MARCO, J.; FERNÁNDEZ, M.N.; CABRERA, J.R. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v.39, p.127-128, 2007.

FRAGATA FILHO, A.A.; da SILVA, M.A.; BOAINAIN, E. Ethiological treatment of acute and chronic Chagas' Disease. *São Paulo Med J.*, v.113(2), p.867-872, 1995.

GALVÃO, L.M.C.; NUNES, R.M.B.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z.; KRETTLI, A.U. Lytic antibody titer as a means of assessing cure after treatment of Chagas' disease. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.*, v.87, p.220-223, 1993.

GALVÃO, L.M.C.; CHIARI, E.; MACEDO, A.M.; LUQUETTI, A.O.; SILVA, S.A.; ANDRADE, A.L.S.S. PCR Assay for Monitoring *Trypanosoma cruzi* Parasitemia in Childhood after Specific Chemotherapy. *J Clin Microbiol.*, v.41(11), p.5066-5070, 2003.

GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F.V.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M.M.; CAMPOS-de-CARVALHO, A.C.; RIBEIRO-dos-SANTOS, R.; SOARES, M.B.P. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. *Antimicrob Agent and Chem.*, v.49(4), p.1521-1528, 2005.

GARY, R.; BOLTON, D.V.M. Handbook of Canine Electrocardiography. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1975.

GARZÓN, S.A.C.; LORGA, A.M.; NICOLAU, J.C. Eletrocardiografia na cardiopatia chagásica. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, v.4, p.133-143, 1994.

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *TRENDS in Parasitology*, v.19 (1), p.19-22, 2003.

GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R.; PENA, S. D. J.; GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for Detection in Human Blood. *Exp. Parasitol.*, v. 88, p. 28-33, 1998.

GUEDES, P.M.M.; VELOSO, V.M.V.; TAFURI, W.L.; GALVÃO, L.M.C.; CARNEIRO, C.M.; LANA, M.; CHIARI, E.; SOARES, K.A.; BAHIA, M.T. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Tropica*, v.84, p.9-17, 2002.

GUEDES, P.M.M.; URBINA, J.A.; LANA, M.; AFONSO, L.C.; VELOSO, V.M.; TAFURI, W.L.; MACHADO-COELHO, G.L.; CHIARI, E.; BAHIA, M.T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. *Antimicrob Agents Chemother.* v.48(11), p.4286-4292, 2004.

GUEDES, P.M.M. Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado, UFMG, Belo Horizonte. 105 pp., 2006.

GUEDES, P.M.M.; VELOSO, V.M.; GOLLOB, K.J.; AFONSO, L.C.C.; CALDAS, I.S.; VIANNA, P.; LANA, M.; CHIARI, E.; BAHIA, M.T.; GALVÃO, L.M.C. IgG isotype profile is correlated with cardiomegaly in Beagle dogs infected with distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *Vet Immunol and Immunop.*, v.124, p.163-168, 2008.

GUEDES, P.M.M.; VELOSO, V.M.; AFONSO, L.C.C.; CALIARI, M.V.; CARNEIRO, C.M.; DINIZ, L.F.; MARQUES-DA-SILVA, E.A.; CALDAS, I.S.; DO VALLE MATTA, M.A.; SOUZA, S.M.; LANA, M.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C.; BAHIA, M.T. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. *Vet Immunol and Immunophatol.*, v.130, p.43-52, 2009.

GUSMÃO, R. D'A.; REZENDE, J.M.; RASSI, A.; GAM, A.A.; NEVA, F.A. Antibody levels to *Trypanosoma cruzi* in infected patients with and without evidence of chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 452-458, 1982.

HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* and myocardial infiltrate in chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.*, v.2, p.101-106, 1993.

HIGUCHI, M.L. O parasito e a patogenia da forma crônica da doença de Chagas. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.64, p.251-254, 1995.

HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; REIS, M.M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiol Research*, v. 60, p.96-107, 2003.

HUANG, H.C.; LIN, L.Y.; YU, H.Y.; HO, Y.L. Risk stratification by T-wave morphology for cardiovascular mortality in patients with systolic heart failure. *Europace*, v. 11, p.1522-1528, 2009.

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; MCCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.*, v.48, p.348-357, 1993.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol Rev.*, v.12, p.210-223, 1999.

KIRCHHOFF, L.V. American trypanosomiasis. *Gastroenterol Clin North Am.*, v.25, p.517-533, 1996.

KÖEBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol*, v.6, p.63-116, 1968.

KOWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol*, v.153, p.4948-4958, 1994.

KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* v.129, p.2009-2012, 1982.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L.E.; MACEDO, A. M.; PENA, S.D.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65 (Supl.5), 435-441, 2001.

LANA, M.; CHIARI, C.A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 81(3), p.247-253, 1986.

LANA, M.; TAFURI, W.L.; CALIARI, M.V.; BAMBIRRA, E.A.; CHIARI, C.A.; RIOS LEITE, V.H.; BARBOSA, A.J.A.; TOLEDO, M.J.O.; CHIARI, E. Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanossomíase cruzi experimental no cão. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, (Suppl.3), p.113-121, 1988.

LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L. Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.87 (Suppl.1), p.59-71, 1992.

LARANJA, F.S. Evolução dos conhecimentos sobre a cardiopatia da doença de Chagas. Revisão crítica da literatura. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.47, p.607-649, 1949.

LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NOBREGA, G., *et al.* Chagas' disease: a clinical, epidemiological and pathologic study. *Circulation*, v.14, p.1035-1060, 1956.

LARANJA, F.S.; ANDRADE, Z.A. Chronic cardiac form of Chagas' disease in dogs. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.35 (Suppl.5), p.377-380, 1980.

LAURIA-PIRES, L., BRAGA, M.S., VEXENAT, A.C., NITZ, N., SIMÕES-BARBOSA, A., TINOCO, D.L., TEIXEIRA, A.R. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg.*, v.63, p.111-118, 2000.

LEON, J.S.; GODSEL, L.M.; WANG, K.; ENGMAN, D.M. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas heart disease. *Infect. Immun.*, v.69, p.5643-5649, 2001.

LIENDO, A., K. LAZARDI, AND J. A. URBINA. In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.41, p.197-205, 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

LUZ, Z. M.; COUTINHO, J. R.; CANÇADO, J. R.; KRETTLI, A. U. Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, p. 143-148, 1994.

MAGUIRE, J.H; HOFF, R.; SHERLOCK, I.; GUIMARÃES, A.C.; SLEIGH, A.C.; RAMOS, N.B.; MOTT, K.E.; WELLER, T.H. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. *Circulation*, v.75, p.1140-1145, 1987.

MARCILI, A.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SILVA, F.M.; PINTO, A.Y.N.; NAIFF, R.D.; CAMPANER, M.; COURA, J.R.; CAMARGO, E.P.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol*, v.39, p.615-623, 2009.

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E. MACIEL, B.C.; SIMÕES, M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.*, v.115, p.1109-1123, 2007.

MARIN-NETO, J.A.; RASSI Jr, A.; AVEZUM Jr, A.; MATTOS, A.C.; RASSI, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104(1), p. 319-324, 2009.

MARTIN-DAVILA, P.; FORTUN, J.; LOPEZ-VELEZ, R.; NORMAN, F.; MONTES de OCA, M.; ZAMARRÓN, P.; GONZÁLEZ, M.I.; MORENO, A.; PUMAROLA, T.; GARRIDO, G.; CANDELA, A.; MORENO, S. Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. *Clin Microbiol Rev*, v.21, p. 60-96, 2008.

MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, M.E.S.; CARVALHO, J.F.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.*, v.2, p.569-573, 1995.

MARTINS, H.R.; FIGUEIREDO, L.M.; VALAMIEL-SILVA, J.C.O.; CARNEIRO, C.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; VITELLI-AVELAR, D.M.; BAHIA, M.T.; MARTINS-FILHO, O.A.; MACEDO, A.M.; LANA, M. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J Antimicrob Chemoth.*, v.61, p.1319-1327, 2008.

MELO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol.*, v. 64(3), p.475-482, 1978.

MIYAMOTO, C.T.; GOMES, M.L.; MARANGON, A.V.; ARAÚJO, S.M.; BAHIA, M.T.; LANA, M.; TOLEDO, M.J.O. *Trypanosoma cruzi*: Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. *Exp Parasitol.*, v.112(3), p.198-201, 2006.

MOLINA, J.T.; BRENER, Z.; URBINA, J.A.; ROMANHA, A.J. Activity of TAK-187 triazole on mice infected with *Trypanosoma cruzi* stains differently susceptible to benznidazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.95, p.304-308, 2000a.

MOLINA, J.T.; MARTINS-FILHO, O.A.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J.A. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.44, p.150-155, 2000b.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94(1), p. 401-404, 1999.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98(5), p. 577-591, 2003.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104(1), p. 17-30, 2009.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* v.7, p.145-173, 1989.

MURTA, S.M.F.; GAZZINELLI, R.T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 93, p. 203-214, 1998.

NÓBREGA, A.A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W.N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infec Dis.*, v.15(4), p.653-655, 2009.

NUNES, Mdo C.; ROCHA, M.O.; RIBEIRO, A.L., COLOSIMO, E.A.; REZENDE, R.A.; CARMO, G.A.; BARBOSA, M.M. Right ventricular dysfunction is an independent predictor of survival in patients with dilated chronic Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol.*, v.127, p.353-359, 2008.

OH, J.K.; SEWARD, J.B.; TASJICK, A.J. The Echo Manual. 2th ed. Boston: Little, Brown and Company. *Mayo Clin Proc.*, 252p., 1995.

ORGANIZACIPÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas, Montevideo, Uruguay. OPS/HDM/CD/425, 2006.

PALACIOS-PRU, E.; CARRASCO, H.; SCORZA, C.; ESPINOZA, R. Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg*, v.41 (1), p.29-40, 1989.

PALOMINO, S.A.; AIELLO, V.D.; HIGUCHI, M.L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol.*, v.94, p.571-579, 2000.

PARADA, H.; CARRASCO, H.A.; ANEZ, N.; FUENMAYOR, C.; INGLESSIS, I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol*, v.60, p.49-54, 1997.

PEREIRA, K.S.; SCHMIDT, F.L.; GUARALDO, A.M.; FRANCO, R.M.; DIAS, V.L.; PASSOS, L.A. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot.*, v. 72(2), p.441-446, 2009.

PEREZ de AYALA, A.; PÉREZ-MOLINA, J.A.; NORMAN, F. *et al.* Chagasic cardiomyopathy in immigrants from Latin America to Spain. *Emerg Infect Dis.*, v. 15, p.607-608, 2009.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; PÉREZ-AYALA, A.; SANTIAGO MORENO, M.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, C.; ZAMORA, J.; LÓPEZ-VELEZ, R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chem.*, v.9, p.1-9, 2009.

PINTO, A.Y.N.; VALENTE, S.A.; VALENTE, V.C.; FERREIRA, A.G.; COURA, J.R. Fase aguda da doença de Chagas brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Brasil Med Trop*, v. 41(6), p.602-614, 2008.

PINTO, A.Y.N.; FERREIRA, A.G.; VALENTE, V.C.; HARADA, G.S.; VALENTE, S.A.S. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica*, v.25 (1), p.77-83, 2009.

PORTELA-LINDOSO, A.A.B. & SHIKANAI-YASUDA, M.A. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saúde Pública*, v.37(1), p. 107-115, 2003.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, v.1, p.92-100, 2001.

PROGRAMA DE SALUD HUMANA. *Nomenclatura y Criterios de Diagnóstico Electrocardiográfico*. Buenos Aires, Universidad Del Salvador, 28p., 1985.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R.M.; KHAN, I.A.; NAVARRO, V.S.; VASAVADA, B.C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol*, v.115, p.279-283, 2007.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W.H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*, v.29(10), p.1611-1614, 1979.

RAAFLAUB, J. The bioavailability of orally administered drugs with special regard to the liver as a filter for foreign matter. *Schweiz Med Wochenschr.*, v.110(10), p.354-362, 1980.

RASSI, A. Clínica: Fase aguda. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., cap. 7, p.249-264, 1979

RASSI, JR. A.; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol.* v.23(12), p.883-889, 2000.

RASSI, JR. A.; RASSI, S.G.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.*, v.76, p.75-96, 2001.

RASSI, JR. A. ; RASSI, A. ; RASSI, S.G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*, v.115, p.1101-1108, 2007.

REED, S.G.; SCOTT, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr Opin Immunol.* v.5(4), p.524-31, 1993.

REIS, M.M.; HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; AIELLO, V.D.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R⁺ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v.83 (Supl.2), p.165-172, 1997.

RIBEIRO, A.L.P.; ROCHA, M.O.C. Indeterminate form of Chagas' disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.31(3), p.301-314, 1998.

RIBEIRO, A.L.; CAVALVANTI, P.S.; LOMBARDI, F.; NUNES, Mdo C.; BARROS, M.V.; ROCHA, M.O. Prognostic value of signal-averaged electrocardiogram in Chagas disease. *J Cardiovasc Electrophysiol.*, v.19, p.502-509, 2008.

ROCHA, M.O.C.; RIBEIRO, A.L.P.; TEIXEIRA, M.M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci.* v.8, p. e44-e54, 2003.

ROMAGNANI, S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res.* v.21(2), p.152-158, 1991.

ROSSI, M.A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. *Am Heart J.*, v.120, p.233-236, 1990.

ROSSI, M.A.; BESTETTI, R.B. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology*, v.86, p.1-7, 1995.

ROWLAND, E.C.; LUO, H.; MCCORMICK, T. Infection characteristics of an Ecuadorian *Trypanosoma cruzi* strain with reduced virulence. *J Parasitol.*, v.81, 123-126, 1995.

SAHN, D.J.; DeMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantification in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*, v.58, p.1072-1083, 1978.

SALGADO, J.A.; GARCEZ, P.M.; OLIVEIRA, C.A.; GALIZZI, J. Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito da doença de Chagas. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* v. 4, p.330-337, 1962.

SALGADO, J.A. O centenário de Carlos Chagas e a menina Berenice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.75(1), p.193-195, 1980.

SAMUDIO, M.; MONTENEGRO-JAMES, S.; CABRAL, M.; MARTINEZ, J.; ROJAS DE ARIAS, A.; JAMES, M.A. Cytokine responses in *Trypanosoma cruzi* – infected children in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 58(1), p.119-121, 1998.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.J.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet*, v.90, p.655-656, 1993.

SCHIJMAN, A.G.; VIGLIANO, C.A.; VIOTTI, R.J.; BURGOS, J.M.; BRANDARIZ, S.; LOCOCO, B.E.; LEZE, M.I.; ARMENTI, H.A.; LEVIN, M.J. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.*, v.70(2), p.210-220, 2004.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of internacional migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102(1), p.75-85, 2007.

SCHOFIELD, C. J. Tiatominae: Biologia y Control. p.5-30, 1994.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, BRASIL. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38 (Supl.III), p.1-29, 2005.

SEGURA, M.A.; MOLINA de RASPI, E.; BASOMBRIIO, M.A. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanocidal treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.89(2), p.213-216, 1994.

SILVEIRA, A.C. Mortalidade por doença de Chagas no Brasil, 1977/1983. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, p.81-70, 1986.

SISSON, D.; SCHAEFFER, D. Changes in linear dimensions of the heart, relative to body weight, as measured by M-mode echocardiography in growing dogs. *Am J Vet Res.*, v.52, p.1591, 1991.

SOSA-ESTANI, S. Tratamiento específico anti-*T. cruzi*. In R Madoeri, C Madoeri & MI Cámara (eds), *Actualización en Enfermedad de Chagas*, Grafiquil, Organización Congreso Facultad de Medicina, Buenos Aires, 1993.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L.; RUIZ, A. M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B. M.; YAMPOTIS, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, v. 59(4), p. 526-529, 1998.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E.L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines of treatment in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.94 (1), p.363-365, 1999.

SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E.L. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Infec Dis*. V.19(6): p.583-587, 2006.

STOPPANI, A.O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Problemática de la enfermedad de Chagas. *Sim. Int. Acad. Nac. Med., Buenos Aires*, v. 59(supl II), p. 147-165, 1999.

STREIGER, M.; Del BARCO, M.; FABBRO, D.; ARIAS, E.; AMICONE, M. Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.37, p.365-375, 2004.

TAFURI, W.L. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. *Am J Trop Med Hyg.* v.19(3), p.405-417, 1970.

TAFURI, W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, v.29, p.194-199, 1987.

TAFURI, W.L.; LANA, M.; CHIARI, E.; CALIARI, M.V.; BAMBIRRA, E.A.; RIOS-LEITE, V.H.; BARBOSA, A.J.A. O cão como modelo experimental para o estudo da História Natural da Doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, p.77-82, 1988.

TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*, v.356, p.338-340, 1992.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.*, v.31, p.550-554, 2001.

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.; BARCELOS, L.S.; GOMES, Y.M.; RIBEIRO, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.*, v.38, p.943-950, 2004.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C.S.; ALIBERTI, J.C.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P.V.; MURTA, S.M.; ROMANHA, A.J.; ALMEIDA, I.C.; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J.S.; GAZZINELLI, R.T. 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.*, v.2 (Suppl.8), p.851-866, 2000.

TANOWITZ H.B, BURNS, E.R.; SINHA, A.K., KAHN, N.N.; MORRIS, S.A.; FACTOR, S.M.; HATCHER, V.B.; BILEZIKIAN, J.P.; BAUM, S.G.; WITTNER, M. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potencial pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.*, v.43, p.274-281, 1990.

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS L.M.; WITTNER, M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.*, v.5(4), p.400-419, 1992.

TANOWITZ, H.B.; KAUL, D.K.; CHEN, B.; MORRIS, S.A.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol.*, v.82, p.124-130, 1996.

TAVARES-NETO, J. Correlação do peso do coração, de chagásicos e controles, com algumas características anatomopatológicas. *Rev Pat Trop.*, v.19(1), p.25-34, 1990.

TEICHHOLZ, L.E.; KREULEN, T.; HERMAN, M.V.; GORLIN, R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic angiographic correlations in the presence or absence of asynergy. *Am J Cardiol.*, v.37, p.7-11, 1976.

TILLEY, L.P.; GOODWIN, J.K. Manual de Cardiologia para Cães e Gatos. *Roca*, 3ed., 2002.

TOLEDO, M. J. O.; GASPERI, M. V.; MARQUES DE ARAÚJO, S.; LANA, M. Berenice-62 e Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi*: comparison of their susceptibility to benznidazole. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 201, 1995.

TORRES, R.M.; DIAS, J.C.P.; GONTIJO, E.D. Manual de Interpretação das Alterações Eletrocardiográficas na Cardiopatia Chagásica. *Ministério da Saúde, Brasil*, 347p., 2007.

TORRES, R.M. *Fatores Relacionados ao Aumento do Volume do Átrio Esquerdo em Pacientes Chagásicos Cardiopatas*. Tese. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 192p., 2004.

TOSTES JÚNIOR, S.; LOPES, E.R.; LIMA PEREIRA, F.E.; CHAPADEIRO, E. Miocardite chagásica crônica humana: Estudo quantitativo dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no exsudato inflamatório. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.27, p.127-134, 1994.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M.M.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY., J.F. Cure of short-and long term experimental Chagas disease using D0870. *Science*, v.273, p.969-971, 1996.

URBINA, J.A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L.M.; LIENDO, A.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; LOEBENBERG., D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.42, p.1771–1777, 1998.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Design.*, v.8, p.287–295, 2002.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A.J. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int. J. Antim. Agents*, v.21, p.27-38, 2003.

URBINA, J. A; DOCAMPO R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, v. 19(11), p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104(1), p.311-318, 2009.

VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; ANDRADE, L.O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C.; SIMPSON, A.J.G.; TOSTES, S.; PENA, S.D.J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.*, v.149, p.2153-2159, 1996.

VAGO A.R.; ANDRADE L.O.; LEITE A.A.; REIS D.A.; MACEDO A.M.; ADAD S.J.; TOSTES J.R.S.; MOREIRA M.C.V.; FILHO G.B.; PENA S.D.J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Am J Pathol*, v.156, p.1805-1809, 2000.

VAGO A.R.; MACEDO A.M.; ADAD S.J.; REIS D.A.; CORRÊA-OLIVEIRA R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, v.348, p.891-892, 1996a.

VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TOLEDO, M.J.O.; LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L.; BAHIA, M.T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 96(7), p. 1005-1011, 2001.

VELOSO, V.M.; GUEDES, P.M.M.; ANDRADE, I.M.; CALDAS, I.S.; MARTINS, H.R.; CARNEIRO, C.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; LANA, M.; GALVÃO, L.M.C.; BAHIA, M.T.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 103(6), p. 524-534, 2008.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serological evaluation of patients with long-term follow-up. *Am Heart J.*, v.127, p.151-162, 1994.

VIOTTI, R.J.; VIGLIANO, C.; LAUCELLA, S.; LOCOCO, B.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; VERA, B.R.; ARMENTI, H. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. *Heart*, v.90, p.655-660, 2004.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ALVAREZ, M.G.; ARMENTI, A. Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression. *Rev Esp Cardiol.*, v.58(9), p.1037-1044, 2005.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M.G.; POSTAN, M.; ARMENTI, A. Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment: A Nonrandomized Trial. *Ann Intern Med.*, v.144, p.724-734, 2006.

VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; PINTO DIAS, J.C.; GONTIJO, E.D.; FARIA, A.M.; ELÓI-SANTOS, S.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Strategy to Assess the Overall Cytokine Profile of Circulating Leukocytes and its Assossiation with Distinct Clinical Forms of Human Chagas Disease. *Scand J Imunnol.*, v.68, p.516-525, 2008.

VITOR, R.W.; CHIARI, E. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction. II. Antigens of different samplings and evolutive forms. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* v.29(3), p.183-188, 1987.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and pratice. *Bull. W.H.O.*, v.53, p.55-65, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. *World Health Organization Tech. Rep., Ser.* 811, p.1-91, 1991.

WORKMAN, P.; WHITE, R.A.S.; WALTON, M.I.; OWEN, L.N.; TWENTYMAN, P.R. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br J Cancer.*, v.50, p.291-303, 1984.

WHO Expert Committe: Control of Chagas disease. Geneva. *World Health Organ Tech Rep., Ser.* 905, p.i-109, 116p., 2002.

WYATT, H.L.; MEERBAUM, S.; HENG, M.K.; GUERET, P.; CORDAY,E. Cross-sectional echocardiography. III. Analysis of mathematical models for quantifying volume of symmetric and asymmetric left ventricles. *Am Heart J.*, v.100, p.821-828, 1980.

XUEQING, B.A.; GUPTA, S.; DAVIDSON, M.; GARG, N.J. *Trypanosoma cruzi* Induces the Reactive Oxygen Species-PARP-1-RelA Pathway for Up-regulation of Cytokine Expression in Cardiomyocytes. *The J Biol Chem.*, v. 285(15), p.11596-11606, 2010.

YUN, O.; LIMA, M.A.; ELLMAN, T.; CHAMBI, W.; CASTILLO, S.; FLEVAUD, L.; RODDY, P.; PARREÑO, F.; ALBAJAR VIÑAS, P.; PALMA, P.P. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières. *PloS Negl Trop Dis.*, v.3(7), p.e-488, 2009.