

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

**ALTERAÇÃO NATURAL DO PADRÃO DE SUSCEPTIBILIDADE AO  
BENZNIDAZOL EM POPULAÇÕES DE *Trypanosoma cruzi* MANTIDAS NA FASE  
AGUDA OU CRÔNICA DA INFECÇÃO EM DIFERENTES MODELOS  
EXPERIMENTAIS**

AUTOR: Sérgio Caldas

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Maria Terezinha Bahia

CO-ORIENTADORA: Vanja Maria Veloso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de protozoários.

Ouro Preto, março de 2006

Instituições que colaboraram financeiramente para este projeto:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - processo CBB-538/03)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo 478.779/03-8)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES )

*Aos meus pais, Angelo e Helena, porto seguro da minha vida, que sempre estiveram presentes,  
apesar da distância, auxiliando-me e torcendo para meu sucesso.  
Aos meus irmãos, Ivo e Wallace, pela amizade, compreensão, companhia e  
desejo mútuo de nos vermos melhores a cada dia.*

A Deus.

À minha orientadora Maria Terezinha Bahia, pela amizade, confiança, respeito e, principalmente, pelo exemplo de personalidade marcante e dedicação à pesquisa, à qual poderei me espelhar.

À minha co-orientadora Vanja Maria Veloso, pelos valiosos ensinamentos, amizade e gratificante convívio.

À Professora Marta de Lana, pela amizade, carinho e por ser outro bom exemplo de pessoa dedicada e capaz.

Ao professor Max Jean, que acompanhou meus primeiros passos na iniciação científica.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação.

À Fabiane, em especial, que sempre esteve ao meu lado ajudando neste trabalho e compartilhando dos momentos de cansaço e euforia que ele nos proporcionou.

Aos alunos de iniciação científica, Arnaldo, Daniela, Rodrigo, Lílian, Jaquelline, Mariana, pela amizade e agradável convívio e em especial à Lívia, Geovan, Tassiane Stêfany e Rafael pela ajuda no biotério.

A todos os amigos que já fizeram estágio no laboratório de Parasitologia/Histopatologia.

Aos colegas de pós-graduação do Laboratório de Parasitologia/Histopatologia, Daniela, Girley, Helen, Jerusa, Léo, Lílian, Lisiane, Paulo, Rodolfo, Vitor e Wendel.

Aos queridos professores Alexandre e Cláudia, e seus alunos pelo convívio.

À Maria Xavier, Ana e Ramiro pelo convívio e imprescindível ajuda.

À Cida, pela amizade, sempre cordial e nos recebendo com um sorriso nos lábios.

Aos funcionários do Biotério, Cláudio, Cristina, José Henrique, Marcos, Rosário e Selma, sem os quais não seria possível realizar e manter as experimentações animais.

Ao professor Milton por ter cedido a utilização do espectrofotômetro.

Ao professor Luís Carlos Crocco por ter cedido a utilização do leitor de ELISA.

Aos professores Babá, Elísio, Renata e Lucinha, por terem sido sempre tão agradáveis e por terem permitido que eu utilizasse equipamentos do laboratório.

Ao professor Ieso pela disponibilidade em esclarecer as minhas dúvidas sobre as técnicas de RAPD e PCR.

A todos que auxiliaram, direto ou indiretamente, na realização deste trabalho.

Neste trabalho foi investigada a influência da manutenção do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica ou aguda da infecção, em diferentes hospedeiros vertebrados, em relação às características biológicas do parasito. Para isso, camundongos Swiss foram inoculados com cinco isolados do *T. cruzi* (Be-62A e B, e Be-78C, D e E) obtidos de diferentes cães chagásicos crônicos infectados com as cepas parentais Be-62 e Be-78, ambas 100% sensíveis ao benznidazol (Bz). Após a determinação da susceptibilidade ao Bz numa primeira passagem sangüínea em camundongos (PSC), as populações do *T. cruzi* foram mantidas em sucessivas PSCs (na ausência de tratamento específico). O objetivo foi investigar se este tipo de manutenção induziria novas alterações no nível de resistência ao Bz, bem como em outros parâmetros biológicos: períodos pré-patente e patente, níveis de parasitemia, perfil da curva de parasitemia e taxa de mortalidade.

Os experimentos foram realizados a cada cinco ou 10 PSCs utilizando-se grupos de 16 camundongos (10 animais para o grupo tratado, e seis para o grupo controle). A cura parasitológica foi determinada através do exame de sangue a fresco, antes e após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura, sorologia (ELISA) e PCR.

Os resultados demonstraram a indução natural de resistência ao Bz em populações do *T. cruzi*. Os isolados Be-62A e Be-62B apresentaram após uma 1ª PSC 50% e 60% de resistência ao Bz, respectivamente. Os isolados Be-78C, Be-78D e Be-78E apresentaram, respectivamente, 90%, 70% e 90% de resistência ao Bz, sob as mesmas condições. Por outro lado, novas alterações no fenótipo de susceptibilidade ao fármaco foram observadas durante a manutenção dessas populações em PSCs (durante a infecção aguda). Duas tendências foram observadas: (1) Estabilidade no grau de resistência ao Bz nas populações Be-62A (50 a 40% em 60 PSCs), Be-62B (60 a 80% em 60 PSCs) e Be-78C (90 a 90% em 60 PSCs); e (2) Redução no grau de resistência ao Bz nas populações Be-78 D (70 a 20% em 60 PSCs) e Be-78E (90 a 10% em 60 PSCs).

Os outros parâmetros biológicos, avaliados em camundongos, também apresentaram alterações. De um modo geral os isolados mostraram-se menos virulentos do que as cepas parentais ao permanecerem nos cães chagásicos crônicos. Entretanto, a virulência aumentou quando eles foram mantidos em PSCs.

Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que a forma de manutenção do *T. cruzi*, infecções de longa duração ou passagens sangüíneas sucessivas durante a fase aguda da infecção, pode influenciar a expressão fenotípica de susceptibilidade ao Bz, bem como a virulência de uma população do parasito.

It was evaluated the influence of the *Trypanosoma cruzi* maintenance in different vertebrate hosts during the acute or chronic phase of the infection on the biological characteristics. To do so, Swiss mice were infected with five (Be-62A and B, and Be-78C, D and E) *T. cruzi* isolates obtained from different chronic Chagasic dogs infected with Be-62 and Be-78 *T. cruzi* strains, both 100% sensitive to benznidazole (Bz). After the determination of Bz susceptibility in the first blood passage in mice (BPM) *T. cruzi* populations were maintained in successive BPMs (in the absence of specific treatment). The objective was to investigate the occurrence of new alterations in Bz resistance level, and in other biological parameters: pre-patent and patent periods, parasitaemia levels, parasitaemia curve, and mortality rate.

The experiments were performed to each five or 10 BPMs and groups of 16 mice were used (10 animals for the treated group, and six for the control group). The parasitological cure was determined by fresh blood examination, hemoculture, serological test, PCR and reactivation of the parasitaemia by cyclophosphamide immunosuppressive therapy. The induction of Bz natural resistance was showed in all evaluated *T. cruzi* populations. The Be-62A and Be-62B isolates showed 50% and 60% of resistance to Bz after a first BPM, respectively. The Bz resistance of Be-78C, Be-78D, and Be-78E isolates were, respectively, 90%, 70% and 90% in the same conditions. On the other hand, new alterations in the drug susceptibility phenotype were observed during successive BPMs (during acute phase) maintenance. Two tendencies were observed: (1) stability in Bz resistance level in Be-62A (50 to 40% in 60 BPMs), Be-62B (60 to 80% in 60 BPMs) and Be-78C (90 to 90% in 60 BPMs) populations; and (2) reduction in Bz resistance level in the Be-78 D (70 to 20% in 60 BPMs) and Be-78E (90 to 10% in 60 BPMs) populations. The long-term *T. cruzi* infection has led to alterations in the other biological parameters in mice. In general, the isolates showed less virulence than the parental strains after the dog chronic infection. However, they showed a tendency of increasing the virulence when maintained in BPMs.

These results are in agreement with the hypothesis that *T. cruzi* maintenance form (long-term chronic infections, or in successive blood passages during the acute phase), can influence the susceptibility phenotype of Bz, as well as the virulence of a parasite population.

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	IX
LISTA DE GRÁFICOS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.2 Características morfológicas .....	2
1.3 Ciclo evolutivo .....	3
1.4 A doença de Chagas .....	5
1.4.1 Aspectos epidemiológicos .....	6
1.5 O benznidazol.....	7
1.6 Caracterização genotípica e fenotípica do <i>T. cruzi</i> .....	9
1.7 Variabilidade intraespecífica do <i>T. cruzi</i> .....	12
1.8 Estrutura populacional do <i>T. cruzi</i> .....	13
1.9 Variabilidade biológica do <i>T. cruzi</i> .....	15
1.10 Alterações fenotípicas e/ou populacionais do <i>T. cruzi</i> .....	18
2. OBJETIVOS .....	21
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos .....	22
3. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Populações do <i>T. cruzi</i> .....	24
3.1.2 Manutenção das populações do <i>T. cruzi</i> .....	24
3.2 Animais.....	25
3.3 Caracterização biológica.....	26
3.3.1 Análise da virulência e da patogenicidade .....	26
3.3.2 Infectividade .....	26
3.3.3 Curva de parasitemia.....	26
3.3.4 Mortalidade.....	27
3.3.5 Susceptibilidade ao benznidazol.....	27

---

3.4 Exames parasitológicos para o controle de cura .....	28
3.5 Exames sorológicos .....	29
3.6 Análise estatística dos dados.....	30
4. RESULTADOS .....	31
4.1 Caracterização biológica.....	32
4.2 Determinação da susceptibilidade ao benznidazol.....	39
5. DISCUSSÃO .....	51
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64



Tabela 1 - Condições de inoculação, tempo de infecção e formas clínicas apresentadas pelos cães, experimentalmente infectados com as cepas parentais Be-62 e Be-78 e utilizados para o isolamento de cinco populações do <i>T. cruzi</i> .....	24
Tabela 2 - Resultados positivos da sorologia (6 MAT) em relação aos resultados parasitológicos positivos (1 MAT), referentes aos grupos de 10 camundongos tratados em cada experimento.....	46
Figura 1 - Delineamento experimental. ....	25
Figura 2 – Diagnóstico com gel de poliacrilamida 6%, obtido após a eletroforese dos produtos de amplificação, por PCR, das regiões de ~330 pb dos minicírculos do kDNA do <i>T. cruzi</i> , encontrado no sangue de animais tratados e não curados.....	47

Gráfico 1 - Curvas de parasitemia em camundongos Swiss inoculados com $5,0 \times 10^3$ tripomastigotas sanguíneos provenientes das cepas parentais Be-62 e Be-78 do <i>T. cruzi</i> .....	33
Gráfico 2 - Curvas de parasitemia referentes à 1 <sup>a</sup> , 20 <sup>a</sup> , 40 <sup>a</sup> e 60 <sup>a</sup> PSC do isolado Be-62A inoculado em grupos de camundongos não tratados.....	34
Gráfico 3 - Curvas de parasitemia referentes à 1 <sup>a</sup> , 20 <sup>a</sup> , 40 <sup>a</sup> e 60 <sup>a</sup> PSC do isolado Be-62B inoculado em grupos de camundongos não tratados.....	35
Gráfico 4 - Curvas de parasitemia referentes à 1 <sup>a</sup> , 20 <sup>a</sup> , 40 <sup>a</sup> e 60 <sup>a</sup> PSC do isolado Be-78C inoculado em grupos de camundongos não tratados.....	36
Gráfico 5 - Curvas de parasitemia referentes à 1 <sup>a</sup> , 20 <sup>a</sup> , 40 <sup>a</sup> e 60 <sup>a</sup> PSC do isolado Be-78D inoculado em grupos de camundongos não tratados.....	37
Gráfico 6 - Curvas de parasitemia referentes à 1 <sup>a</sup> , 20 <sup>a</sup> , 40 <sup>a</sup> e 60 <sup>a</sup> PSC do isolado Be-78E inoculado em grupos de camundongos não tratados.....	38
Gráfico 7 – Percentagens de resistência ao Bz apresentadas pelas cepas parentais Be-62 e Be-78 do <i>T. cruzi</i> e pelos seus respectivos isolados, numa 1 <sup>a</sup> PSC. ....	39
Gráfico 8 - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-62A através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR). .....	41
Gráfico 9 - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-62B através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR). .....	42

- Gráfico 10 - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-78C através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR).  
.....43
- Gráfico 11 - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-78D através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR).  
.....44
- Gráfico 12 - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-78E através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR).  
.....45
- Gráfico 13 - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-62A do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (1) cronicamente infectado com a cepa parental Be-62 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs .....48
- Gráfico 14 - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-62B do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (2) cronicamente infectado com a cepa parental Be-62 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs. ....48
- Gráfico 15 - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-78C do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (3) cronicamente infectado com a cepa parental Be-78 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs. ....49
- Gráfico 16 - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-78D do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (4) cronicamente infectado com a cepa parental Be-78 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs. ....49

Gráfico 17 - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-78E do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (5) cronicamente infectado com a cepa parental Be-78 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs .....50

**1 MAT** - um mês após o tratamento  
**6 MAT** - seis meses após o tratamento  
**Be-62** - Berenice-62  
**Be-78** - Berenice-78  
**Bz** - Benznidazol  
**ELISA** - Enzyme linked immunosorbent assay  
**EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético  
**Hc** - Hemocultura  
**IgG** - Imunoglobulina G  
**Kb** - kilobases  
**kDNA** - DNA do cinetoplasto  
**LIT** - Liver infusion tryptose  
**Nf** - Nifurtimox  
**PBS** - Phosphate buffered saline  
**PCR** - Polymerase chain reaction  
**PSC** - Passagem sangüínea em camundongos  
**PP** - Período de patência  
**PPP** - Período pré-patente  
**RAPD** - Randomly amplified polymorphic DNA  
**RFLP** - Restriction fragment length polymorphism  
**SFB** - Soro fetal bovino  
*T. cruzi* - *Trypanosoma cruzi*  
**Z** - Zimodema

## **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1 O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (CHAGAS, 1909) é o agente etiológico da Doença de Chagas. Trata-se de um protozoário uniflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O que caracteriza esta ordem é a presença do cinetoplasto, organela intracelular rica em DNA, a qual diferencia a sua mitocôndria única das mitocôndrias eucarióticas.

A diversificação evolucionária deste parasito antecede o aparecimento do *Homo sapiens* por vários milhões de anos. Estima-se que o *T. cruzi* tenha surgido há 150 milhões de anos e o primeiro contato com o homem ocorrido quando imigrantes da Sibéria Central povoaram as Américas, há menos de 15 milhões de anos, no Pleistoceno (BRIONES e cols., 1999).

### 1.2 Características morfológicas

A mitocôndria do *T. cruzi* contém maior quantidade de material genético extranuclear que qualquer outra mitocôndria eucariótica, cerca de 15% do DNA total do parasito (LUKES e cols., 2002). Este se mostra como uma rede fibrosa constituída por dois tipos de moléculas circulares denominadas minicírculos e maxicírculos (k-DNA). A função dos maxicírculos é equivalente à função do DNA das mitocôndrias de outros eucariotos, mas os maxicírculos contêm vários genes que requerem modificação, pós-transcrição, por edição de RNA mensageiro (RNAm) (ESTEVEZ & SIMPSON, 1999). O DNA encontrado nos maxicírculos é capaz de codificar subunidades de enzimas mitocondriais, como citocromos b, c e ATPsintase. Os minicírculos estão envolvidos na formação de pequenos RNAs guias que controlam a especificidade do processo de edição dos RNAm formados a partir dos maxicírculos, contribuindo para enorme conteúdo e heterogeneidade no DNA mitocondrial do parasito (CAMPBELL e cols., 2003).

A maior parte do k-DNA é composta por minicírculos, que no *T. cruzi* têm um tamanho de 1,4 kilobases (kb) e representam 95% das moléculas componentes, cerca de 30.000 minicírculos. Os maxicírculos estão presentes numa proporção de 25 a 50 cópias, com tamanho de 23 kb. A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da

célula e à emergência do flagelo permite a identificação das três formas evolutivas do parasito: amastigota, epimastigota e tripomastigota.

### 1.3 Ciclo evolutivo

Sob condições naturais o ciclo de vida do *T. cruzi* se alterna entre hospedeiros invertebrados, mais de 130 hemípteras da família Reduviidae, e entre hospedeiros vertebrados, mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens (LAMBRECHT 1965; ZELEDON & RABINOVICH, 1981). A distribuição geográfica dos triatomíneos e dos vertebrados, associada às preferências dos insetos por sangue de determinados mamíferos, define dois ciclos de transmissão do parasito. Trata-se de um ciclo silvestre, envolvendo diferentes espécies de triatomíneos e animais selvagens, e um ciclo doméstico ou peridoméstico no qual animais domésticos e o homem atuam como reservatórios.

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado inicia-se com a ingestão de tripomastigotas durante o repasto sangüíneo. No estômago destes insetos os tripomastigotas sofrem transformação para as formas esferomastigotas. Com o crescimento celular e o alongamento do flagelo, surgem as formas multiplicativas epimastigotas. No intestino médio dos triatomíneos ocorre uma intensa multiplicação das formas epimastigotas, que a seguir colonizam a ampola retal e iniciam o processo de metaciclogênese. Esse processo, caracterizado pelo aparecimento das formas tripomastigotas metacíclicas, parece ser ativado por interações hidrofóbicas entre o flagelo do parasito e a cutícula superficial do epitélio intestinal posterior do triatomíneo (BONALDO e cols., 1988) envolvendo uma resposta celular mediada por AMPc (GONZÁLES-PERDOMO e cols., 1988). De uma forma geral, a metaciclogênese ocorre em resposta a alterações de estímulos ambientais resultando em drásticas mudanças na expressão gênica, síntese de proteínas e morfologia do parasito. Vários genes e seus produtos polipeptídicos parecem estar envolvidos com aquisição das propriedades biológicas estágio-específicas que conferem ao *T. cruzi* a capacidade de estabelecer infecção nos hospedeiros mamíferos susceptíveis (HALL & JOINER, 1993).

Fatores como a saliva, enzimas digestivas, alterações de osmolaridade, pH e temperatura do ambiente intestinal dos triatomíneos induzem mudanças morfológicas



no *T. cruzi*. Já foram identificadas mais de 18 formas do parasito no vetor, ao se considerarem os principais estágios intermediários do protozoário (KOLLIEN & SCHAUB, 2000). Essas alterações morfológicas visíveis do parasito, influenciadas pelo vetor, servem como parâmetro para se imaginar que na relação parasito-hospedeiro também possa haver indução de diferentes padrões de expressão gênica do *T. cruzi*.

Ao realizarem o repasto sangüíneo, os hospedeiros invertebrados ingerem grande quantidade de sangue, seguida por rápida diurese e liberação de grande número de parasitos junto às suas excretas. A contaminação de mamíferos pode ocorrer através da penetração das formas tripomastigotas metacíclicas, depositadas pelo triatomíneo sobre a pele lesada do vertebrado por ação da sua probóscida, ou através da penetração por membranas mucosas. Os tripomastigotas metacíclicos, ao penetrarem no hospedeiro vertebrado, invadem os fagócitos mononucleares. As formas epimastigotas, apesar de serem também liberadas nas excretas do vetor e penetrarem nas células do hospedeiro vertebrado, são destruídas no interior do vacúolo parasitóforo, (ANDREWS e cols., 1990) sendo apenas as formas tripomastigotas capazes de escapar dos mecanismos de destruição dos fagócitos e se diferenciarem em amastigotas, no citoplasma destas células, aproximadamente 35 horas após a infecção. A enzima trans-sialidase e a proteína formadora de poros Tc-Tox são fatores de virulência do parasito responsáveis por facilitar o seu escape do vacúolo parasitóforo para o interior do citoplasma da célula hospedeira. Esse escape requer acidificação, fornecida pelos lisossomos (ANDREWS e cols., 1990). O parasito parece se proteger dos efeitos da proteína Tc-Tox através da transferência de ácido siálico da membrana do vacúolo para a sua superfície. Acredita-se que a proteína Tc-Tox ativada tenha a capacidade de difundir e inserir-se mais eficientemente na bicamada lipídica de membranas vacuolares desializadas, resultando na sua ruptura. Em princípio a superfície do tripomastigota sializada permaneceria relativamente resistente à ação lítica da Tc-Tox (HALL & JOINER, 1993). Após a multiplicação, no citoplasma das células hospedeiras, os amastigotas diferenciam-se em formas tripomastigotas. Posteriormente são liberados por ruptura celular e alcançam o sistema circulatório, sendo potencialmente infectantes para qualquer célula nucleada.

No homem, além do contágio através de excretas dos triatomíneos infectados, a transmissão do parasito pode ocorrer através de transfusões sangüíneas, transplantes de órgãos, transmissão congênita (BRENER & GAZZINELLI, 1997) e, mais raramente,

por alimentos contaminados com tripomastigotas do *T. cruzi* e acidentes de laboratório (LAMBRECHT 1965; PRATA 2001).

#### 1.4 A doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas que caracterizou o parasito, o vetor, o ciclo de vida do protozoário e o processo de transmissão (CHAGAS, 1909).

A enfermidade se inicia com uma fase aguda caracterizada por altos níveis de parasitemia, sendo esta fase assintomática ou oligossintomática na maioria das vezes. As manifestações clínicas da fase aguda começam por volta do sexto dia após a infecção e duram entre um e dois meses (MILES, 2003). Frequentemente, desenvolve-se uma inflamação, no sítio da infecção, denominada chagoma. O sinal de Romana, denominação dada à inflamação das pálpebras, resultante da penetração do parasito através da mucosa conjuntival, é outro achado que permite diagnosticar parte das infecções agudas. Nessa fase ocorre uma inflamação mononuclear focal, em vários órgãos, desencadeada pela ruptura das células parasitadas. A inflamação, especialmente no coração, é usualmente acompanhada por necrose das células parasitadas e não parasitadas. Patologia microvascular, degranulação de eosinófilos, edema, trombozes e agregação de plaquetas também têm sido demonstradas. Uma pequena percentagem de crianças, geralmente menores de dois anos de idade, apresenta uma forma aguda grave e pode falecer devido à insuficiência cardíaca ou à meningoencefalite (COURA & DE CASTRO, 2002).

A maioria dos indivíduos sobrevive à fase aguda e evolui para a fase crônica apresentando uma forma assintomática da doença, denominada forma indeterminada, na qual os parasitos são escassos na corrente sanguínea. Na fase crônica da doença de Chagas são reconhecidas as seguintes formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva e mista ou associada (cardíaca e digestiva). Decorridos vários anos, cerca de 25 a 30% dos pacientes desenvolvem lesões irreversíveis no miocárdio e/ou no trato digestivo, caracterizando a fase crônica sintomática, responsável por cerca de 14.000 mortes anuais (América Central e do Sul) e considerável morbidade, a qual impõe um pesado fardo socioeconômico em países com economias debilitadas (TDR 2005). Não

bastasse, existem áreas endêmicas onde a progressão da doença é bem mais rápida, fato evidenciado por Andrade e cols. (1988) ao observarem alterações eletrocardiográficas em crianças com sorologia positiva para o *T. cruzi*.

A forma digestiva está presente nas regiões situadas abaixo da linha equatorial, predominantemente na região central do Brasil e no Chile, sendo muito rara na Venezuela e na América Central (LUQUETTI e cols., 1986; DIAS, 1992). Caracteriza-se por quadros clínicos denominados megacólon (7 a 10% dos casos) e megaesôfago (3 a 7% dos casos) sendo resultantes da destruição das células nervosas do sistema entérico e da fibrose que se instala nesses órgãos. Segundo Tafuri (1985; 1987), a fibrose seria uma das principais causas de alterações dos feixes de fibras musculares lesadas dos órgãos ociosos, com conseqüentes alterações anatômicas e fisiológicas.

A forma cardíaca é resultante de dano miocárdico progressivo conseqüente à incessante miocardite fibrosante provocada pela presença do parasito. Esta forma clínica apresenta diferentes complicações, variando de arritmias a sintomas de insuficiência cardíaca compensada ou descompensada resultando, muitas vezes, na morte súbita do paciente (RASSI e cols., 1992). A miocardite fibrosante, ativa e crônica, tem sido atribuída à hipersensibilidade dos indivíduos infectados, a antígenos do parasito, a neoantígenos (expostos por lesão tecidual) ou autoimunidade. Entretanto, técnicas de imuno-histoquímica e de PCR, em tecidos inflamados do miocárdio, demonstram a presença do parasito nestes tecidos. Talvez, a persistência do *T. cruzi* no tecido seja um estímulo necessário para a secreção de citocinas inflamatórias, por células do sistema imune, as quais acabam rompendo os mecanismos regulatórios de auto-tolerância. Dessa forma, o prejuízo tecidual seria resultado dos mecanismos efetores engatillados pela resposta imune contra o parasito, embora células T com reatividade cruzada também agiriam sobre auto antígenos amplificando o processo de destruição (DOSREIS, 1997).

#### **1.4.1 Aspectos epidemiológicos**

O TDR (2005) estima que cerca de 13 milhões de pessoas habitantes da América Central e do Sul estejam infectadas com o *T. cruzi*. Cerca de 25% destas pessoas apresentam sintomas os quais variam conforme a cepa do parasito, o indivíduo infectado e a duração (fase aguda ou crônica) da infecção. Nos países do Cone Sul da

América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) a principal espécie vetora (*Triatoma infestans*) é domiciliada e vive nas habitações humanas ou próxima a elas. Na América Central, México, bacia Amazônica e em países andinos, os vetores vivem tanto nas moradias quanto no ambiente silvestre.

No Brasil, parece haver uma associação preferencial do *T. cruzi* I com o ciclo silvestre e do *T. cruzi* II com o ciclo doméstico de transmissão da doença (ZINGALES e cols., 1998). Áreas com mais alta morbidade apresentam a circulação do *T. cruzi* II, enquanto o *T. cruzi* I é evidenciado em áreas onde a doença de Chagas é pouco frequente e a morbidade é baixa (FERNANDES e cols., 1998). As classificações *T. cruzi* I e *T. cruzi* II serão comentadas no tópico 1.7 da introdução.

A incidência anual de novos casos de doença de Chagas caiu de 800.000 nos anos 80 para cerca de 200.000 atualmente devido, principalmente, ao sucesso dos programas de controle do *T. infestans*. A transmissão da doença, pelo vetor e por transfusão sanguínea, foi interrompida em 1997 no Uruguai, em 1999 no Chile e em 8 dos 12 estados endêmicos do Brasil no ano de 2000 (MONCAYO, 2003). Entretanto, considerando-se que a doença de Chagas é uma infecção crônica, métodos de diagnóstico rápidos e confiáveis se tornam primordiais para a triagem dos bancos de sangue, sobretudo, em países não endêmicos para esta enfermidade. Os movimentos de migração rural/urbana que ocorreram na América Latina entre os anos de 1970 e 1980 mudaram o modelo epidemiológico tradicional da doença de Chagas para uma infecção urbana, capaz de ser transmitida por transfusão sanguínea (DIAS, 1992).

Apesar do progresso no controle da transmissão vetorial nos países do Cone Sul, por iniciativa da Organização Mundial de Saúde e da Organização Pan Americana de Saúde, pouco progresso foi alcançado em relação à eficácia do tratamento dos milhões de indivíduos infectados.

### **1.5 O benznidazol**

O tratamento da doença de Chagas iniciou-se em 1930, por Salvador Mazza, com o uso de um derivado da quinolina (7602: Bayer, Buenos Aires, Argentina) (MAZZA e cols., 1937). Vários fármacos já foram ensaiados para a quimioterapia desta enfermidade, porém a cura continua sendo um desafio (BRENER, 1979; DE CASTRO,

1993; URBINA, 2001). No final dos anos 60 e início dos anos 70 dois fármacos começaram a ser utilizados no tratamento da doença de Chagas: O benznidazol (Bz) (*N*-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) (Radanil<sup>®</sup>, Rochagan<sup>®</sup>, Roche) e o nifurtimox (Nf) (3-metil-*N*-[(5-nitro-2-furanil)-metileno]-4-tiomorfolinamina-1,1-dioxida) (Lampit<sup>®</sup>, Bayer). Após os anos 80, a comercialização do Nf foi interrompida, primeiro no Brasil e em seguida na Argentina, Chile e Uruguai (COURA, 2002; DE CASTRO, S.L., 2002).

O principal efeito que se busca com a utilização da quimioterapia é a cura através da eliminação do parasito, mas muitas vezes este objetivo não é alcançado. Contudo, se a progressão da doença puder ser evitada, a terapêutica se justifica. Alguns autores (ANDRADE e cols., 1996; CANÇADO, 1997; FERREIRA, 1990) têm relatado negatização da sorologia, em crianças abaixo de 12 anos, após a quimioterapia com o Bz. Fragata Filho e cols. (1994) acompanhando chagásicos crônicos por longos períodos, mostraram piora clínica e eletrocardiográfica entre os não tratados quando comparados aos tratados. Entretanto Lauria-Pires e cols (2000) não observaram diferença na evolução da doença de Chagas (10 anos após o tratamento) entre indivíduos chagásicos crônicos tratados com Bz e indivíduos não tratados.

Os fármacos nitro-heterocíclicos, como o Bz e o Nf, são considerados capazes de curar 70 a 100% de doentes na fase aguda, enquanto na fase crônica indeterminada as percentagens variam entre seis a 30% (CANÇADO, 1997). A falha terapêutica observada em parte dos pacientes chagásicos agudos pode ser explicada pela existência de cepas naturalmente resistentes aos quimioterápicos (ANDRADE e cols., 1992). No entanto, é curiosa a constatação de que mesmo hospedeiros infectados com cepas do *T. cruzi* sensíveis ao Bz, apresentam baixos índices de cura, quando a terapêutica é realizada durante a fase crônica da infecção, como demonstrado por Guedes e Cols (2002), em um estudo realizado utilizando o cão como modelo experimental. As diferentes respostas do *T. cruzi* aos fármacos podem sugerir a existência de diferenças moleculares entre as várias cepas do parasito (ANDRADE e cols., 1992; MURTA e cols., 1998).

O Bz age através de estresse reductivo, o qual envolve reações covalentes de seus grupos nitro, parcialmente reduzidos, com macromoléculas (FAIRLAMB & CERAMI, 1992). Tanto o Nf quanto o Bz atuam sobre o genoma do *T. cruzi*. Ambos inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas (STOPPANI, 1999). Também aceleram a degradação

dessas macromoléculas. A toxicidade desses fármacos pode ser exercida por (1) ação direta dos radicais nitroaniônicos (EDWARDS, 1993; STOPPANI, 1999), (2) geração de radicais livres oxigenados (DOCAMPO e cols., 1981; DOCAMPO, 1990), (3) produção de derivados nitrosos e da hidroxilamina, de citotoxicidade conhecida (EDWARDS, 1993; STOPPANI, 1999).

Michailowsky e cols., (1998) sugerem que a ação do Bz sobre o *T. cruzi* pode ser favorecida pela atividade da citocina IL-12, embora a atividade do fármaco não seja dependente dessa citocina. Considerando que a eficácia do tratamento é maior durante a fase aguda da infecção, quando as células do sistema imune são altamente ativadas, a terapia com IL-12 recombinante poderia aumentar os efeitos anti-*T. cruzi* do Bz, como foi demonstrado experimentalmente por este autor.

O *T. cruzi* é um parasito deficiente em enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido dismutase (BOVERIS e cols., 1980) o que não ocorre com o hospedeiro vertebrado (GRINBLAT e cols., 1989) e garante o maior efeito destes fármacos sobre o parasito. Os produtos das reduções dos fármacos nitro-heterocíclicos, tanto os radicais nitroaniônicos, como os derivados nitroso e hidroxilamina, podem interagir com o DNA facilitando a ruptura das cadeias nucleotídicas. Estes efeitos se somariam aos efeitos dos superóxidos e do radical hidroxila.

Sérios efeitos colaterais têm sido observados em adultos tratados com o Bz, como dermatopatia alérgica, neuropatia periférica e granulocitopenia (FRAGATA e cols., 1994). Entretanto, Sosa-Estani e cols. (1998), observaram boa tolerância para os efeitos colaterais do Bz em crianças de seis a 12 anos de idade. Estes achados são compatíveis com prévias observações de menor toxicidade do fármaco em crianças do que em adultos. (RASSI e cols., 1992).

### **1.6 Caracterização genotípica e fenotípica do *T. cruzi***

Desde meados da década de 70 a variabilidade genética do *T. cruzi* vem sendo pesquisada. Análises que utilizam a comparação de isoenzimas têm alcançado sucesso na identificação de marcadores epidemiológicos para a doença de Chagas e identificado distintas populações do parasito (zimodemas) presentes nos ciclos de transmissão silvestre e doméstico. Toyé (1974) demonstrou diferenças isoenzimáticas entre cepas do

*T. cruzi* através da análise das isoenzimas aspartato e alaninoaminotransferase. Miles e cols., (1977; 1980) usaram a interpretação de zimogramas, baseada na variabilidade de seis *loci*, para distinguir três grupos isoenzimáticos do Norte do Brasil, o qual eles denominam zimodemas 1, 2 e 3. Posteriormente, variabilidades adicionais foram observadas dentro de cada um dos três zimodemas (TIBAYRENC & MILES, 1983; GIBSON & MILES, 1985). Vários estudos têm confirmado a heterogeneidade dos fenótipos de isoenzimas em *T. cruzi* (ROMANHA e cols., 1979; KREUTZER & SOUZA, 1981; GOLDBERG & SILVA PEREIRA, 1983).

A estrutura populacional do *T. cruzi* parece ser multiclonal e complexa. Tibayrenc e Ayala (1988) identificaram, através da análise isoenzimática de 15 *loci*, 43 clones naturais do parasito, dentre 121 cepas obtidas de vários hospedeiros vertebrados e invertebrados, oriundos de diferentes países da América Latina e de diferentes ciclos de transmissão. A análise de esquizodemas demonstrou heterogeneidade dentro de cada um dos 43 clones. Romanha (1982) e Carneiro e cols. (1990) caracterizaram amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos residentes na cidade mineira de Bambuí. Foram observados quatro zimodemas distintos, denominados pelos autores de ZA, ZB, ZC e ZD. ZA correspondia ao Z II e ZB mostrou características híbridas entre ZA e ZC. No Brasil pelo menos seis principais padrões de isoenzimas têm sido observados (Z I, Z II ou ZA, Z III, ZB, ZC e ZD ). Murta e cols. (1998) estudando 45 cepas dos *T. cruzi* susceptíveis e naturalmente resistentes ao Bz e ao Nf, analisadas por diferentes marcadores moleculares, demonstraram um perfil heterozigoto, ZB, contendo exclusivamente cepas susceptíveis e ocorrendo predominantemente em áreas geográficas onde a terapêutica da doença de Chagas apresentava-se mais eficaz.

Morel e cols. (1986), através da análise dos perfis de esquizodemas por uma técnica denominada RFLP (restriction fragment length polymorphism), sugeriram que as cepas do *T. cruzi* fossem coleções complexas de populações heterogêneas convivendo num equilíbrio dinâmico. Melhoras no protocolo original da RFLP foram inseridas por Sturm e cols. (1989) e Ávila e cols. (1990). Os variáveis segmentos de kDNA foram amplificados por PCR (polymerase chain reaction) e seu RFLP determinado. Esta mudança, na qual a digestão do kDNA era realizada diretamente nos produtos da PCR, oriundos do fragmento variável de 330 pb do minicírculo, permitiu a

utilização de quantidades bem menores de parasitos, evitando possíveis perdas de subpopulações do *T. cruzi* em função do manuseio prolongado em cultura.

Macedo e cols. (1992) explorando o polimorfismo de minissatélites humanos (seqüências repetitivas em *tandem* de 10 a 15 nucleotídeos, presentes em milhares de cópias no genoma humano) obtiveram uma sonda humana que reconhecia regiões de minissatélites no genoma do *T. cruzi*. A hibridação dessa sonda com o DNA nuclear do parasito, digerido por endonucleases de restrição, gerava um padrão complexo de bandas específicas, denominado de impressão digital do DNA (DNA Fingerprint), o qual apresentava elevada correlação com a análise de esquizodema. Também foi demonstrada por Steindel e cols. (1993) e Tibayrenc e cols. (1993) uma direta correlação entre RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) e perfis de isoenzimas em *T. cruzi*, incluindo esta técnica como boa ferramenta para análises da variabilidade gênica e identificação de marcadores moleculares. O RAPD consiste em uma reação em cadeia da polimerase que utiliza pequenos iniciadores de seqüências randômicas, as quais podem amplificar fragmentos anônimos no DNA alvo, gerando um padrão múltiplo de bandas cepa-específico. Esta técnica mostrou-se mais sensível que as análises de esquizodema e de impressão digital do DNA por requerer somente 0,1 a 1,0 ng de DNA total.

Macedo e cols. (2001) através da análise de microssatélites de 53 populações monoclonais do *T. cruzi*, demonstraram o grande polimorfismo genético do parasito, e confirmaram a divisão do *T. cruzi* em duas grandes linhagens, que foram, inclusive, oficialmente reconhecidas e posteriormente designadas como *T. cruzi* I e II (MOMEN, 1999). As análises de microssatélites permitem, ainda, estimar se uma cepa do *T. cruzi* é uma população monoclonal ou multiclonal. A utilização desta técnica tem demonstrado que a percentagem de populações multiclonais (ou aneuplóides) diminui quando cepas isoladas do ciclo silvestre são comparadas com cepas isoladas do homem, confirmando a hipótese de que o homem atua como filtro biológico, selecionando populações mais adaptadas a se desenvolverem no seu organismo (OLIVEIRA e cols., 1998; 1999; MACEDO e cols, 2001).



### 1.7 Variabilidade intraespecífica do *T. cruzi*

Cepas do *T. cruzi* constituem-se de populações multiclonais com distintas características no que se refere à composição antigênica (ANDRADE e cols, 1981), morfologia (BRENER, 1965), susceptibilidade a quimioterápicos (BRENER e cols., 1976), padrões isoenzimáticos (BOGLIOLO e cols., 1986), padrões genômicos de kDNA (MOREL e cols., 1980) e capacidade de se inter-relacionar com o hospedeiro vertebrado. Andrade e Magalhães (1996) sugerem que populações estáveis do parasito sejam resultantes do equilíbrio de múltiplos clones, manifestando um determinado comportamento biológico predominante. Evidências experimentais da estabilidade do comportamento das cepas do *T. cruzi* vêm sendo obtidas através da caracterização biológica e bioquímica destas cepas após diferentes condições de manutenção e cultivo em laboratório (MAGALHÃES e cols., 1985). Entretanto, pressões naturais e artificiais impostas ao *T. cruzi* podem resultar na seleção de subpopulações do parasito. A questão da influência da heterogeneidade das populações do parasito sobre a estabilidade da sua dinâmica populacional permanece ainda enigmática.

Várias classificações intraespecíficas foram criadas utilizando-se diferentes marcadores biológicos e moleculares. Atualmente, agrupam-se as espécies do *T. cruzi* em duas grandes divisões (TIBAYRENC, 1995; SOUTO e cols., 1996), denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, com base nos fenótipos de isoenzimas, perfis de DNA, seqüências polimórficas de miniexon do DNA e de ribossomos, e análises de microssatélites (OLIVEIRA e cols., 1998). O grupo *T. cruzi* II, o qual é predominante nas localidades onde a doença de Chagas apresenta maiores manifestações clínicas, pode ser subdividido em 5 grupos menores (*T. cruzi* IIa, IIb, IIc, IId e IIe) (BRISSE e cols., 2000). Essas subdivisões têm sido referidas como DTUs (discrete typing units) (TIBAYRENC, 1998). Evidências filogenéticas recentes sugerem uma origem híbrida para as espécies pertencentes às subdivisões *T. cruzi* IId e IIe (MACEDO & AYALA, 2001; TIBAYRENC & AYALA, 2002). Entretanto, a estratégia de se agrupar as populações híbridas em subdivisões do grupo II não considerou que, dependendo das características analisadas, os híbridos podem ser mais relacionados com o grupo I, ou até mesmo diferentes de ambos (SOUTO e cols., 1996; MACHADO & AYALA, 2001; 2002). Uma alternativa, que parece estar ganhando força, é o agrupamento dos híbridos

numa terceira linhagem do *T. cruzi* (MACHADO & AYALA, 2001; 2002). As cepas híbridas do parasito poderiam representar mais uma linhagem filogenética divergente do *T. cruzi*, a qual parece ter suas origens a partir de eventos de recombinações ancestrais entre as cepas dos grupos *T. cruzi* I e II.

### **1.8 Estrutura populacional do *T. cruzi***

Prévios estudos sobre isoenzimas (MILES e cols., 1997; BOGLIOLO e cols., 1986; 1996), conteúdo de DNA, cariótipos moleculares (GIBSON & MILES, 1986; HENRIKSSON e cols., 1990) e estudos de microssatélites (OLIVEIRA e cols., 1998) apontam para uma constituição diplóide do parasito (TIBAYRENC & MILES, 1983), como é sugerido para todos os flagelados Kinetoplastidas. O seqüenciamento completo do genoma do *T. cruzi* revelou uma constituição predominantemente diplóide para o parasito (EL-SAYED e cols., 2005). Estes estudos permitiram supor que o genoma do parasito pudesse sofrer plasticidade. O termo plasticidade refere-se à capacidade biológica e genética do *T. cruzi* em se adaptar a novos ambientes e hospedeiros. Sugere-se que tal plasticidade, responsável por variações gênicas do parasito, possa ser intrinsecamente relacionada ao modo de vida parasitária (LANZER e cols., 1995). Estudos de reassociação cinética com DNA de *T. cruzi*, análises das variações no tamanho das bandas cromossômicas por PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) e ‘Southern blot’ mostraram que aproximadamente 15% do DNA nuclear é formado por seqüências repetidas distribuídas através do genoma (REQUENA e cols., 1996) as quais podem ser responsáveis pela plasticidade genômica (HENRIKSSON e cols., 1996; REQUENA e cols., 1996). Mais recentemente, o seqüenciamento gênico do *T. cruzi* revelou que ao menos 50% do seu genoma é constituído de seqüências repetidas (EL-SAYED e cols., 2005).

A habilidade do *T. cruzi* de poder realizar seu ciclo de vida nas glândulas anais do gambá reflete bem a sua grande versatilidade (DEANE e cols., 1984b). Sob condições de estresse ou pressões seletivas, cromossomos e minicírculos demonstram evidências de plasticidade genética em *T. cruzi* e *Leishmania* (MCDANIEL & DVORAK, 1993). Isto significa que os mecanismos de ‘trans splicing’ e edição de RNA mitocondrial, ao menos em teoria, estariam resultando em proteínas alternativas ou

fatores de virulência (LAIRD, 1989). McDaniel e Dvorak (1993) propuseram a possibilidade da ocorrência de aneuploidia entre as populações do *T. cruzi*. Diferenças na ploidia para um ou mais cromossomos (aneuploidia) têm sido observadas (HERINKSSON e cols., 1996).

Tibayrenc e Ayala (1988), por outro lado, sugeriram ausência ou raros casos de recombinação em populações naturais do *T. cruzi*. Uma hipótese para a origem evolucionária dos zimodemas do parasito, apresentada por estes autores, era que o parasito exibiria uma estrutura predominantemente clonal com divergência ancestral e evolução independente dos múltiplos clones. Fatores de dispersão como migrações dos hospedeiros vertebrados e dos vetores, bem como características geográficas, diferenças seletivas entre clones e raras recombinações gênicas seriam alguns dos elementos responsáveis pela atual distribuição dos genótipos de *T. cruzi*. Em 1988, entretanto, estes autores já admitiam a possibilidade de futuras constatações de uma residual sexualidade entre as populações do *T. cruzi*, mas especulavam que essas seriam mais prováveis no ciclo silvestre e entre zimodemas próximos.

Contudo, a hipótese da estrutura clonal do *T. cruzi* proposta por Tibayrenc e cols. (1986) sofreu algumas contestações devido a resultados que demonstraram mudanças genéticas do parasito. Análises de isoenzimas e RFLP de três genes glicolíticos demonstraram a presença de heterozigotos e os correspondentes homozigotos circulando numa mesma área geográfica (BOGLIOLO e cols., 1996). Gaunt e cols. (2003) demonstraram a capacidade de troca genética no *T. cruzi*, através da obtenção de híbridos experimentais oriundos de duas cepas parentais transgênicas. Esta nova concepção fundamenta-se num processo de sexualidade complexo, onde as trocas genéticas ocorreriam entre linhagens separadas ao longo de dois a nove milhões de anos (MACHADO & AYALA, 2001; GAUNT e cols., 2003). Ao contrário do que ocorre no *Trypanosoma brucei* (GIBSON & BAILEY, 1994) a meiose parece não estar envolvida nas trocas genéticas do *T. cruzi*. Sugere-se que estas trocas poderiam ocorrer através da fusão de genomas, perda de alelos, poliplodia/aneuploidia e recombinação intragênica (GAUNT e cols., 2003).

Contudo, contradições entre estes achados e a teoria clonal são apenas superficiais. A teoria clonal não afirma que as trocas genéticas sejam ausentes, mas

apenas limitadas a raros casos (TIBAYRENC e cols., 1986), como foi demonstrado por Telleria e cols. (2004). Logo, essa teoria se aplica ao *T. cruzi*.

### **1.9 Variabilidade biológica do *T. cruzi***

O *T. cruzi* apresenta grande variedade de manifestações clínicas, no que se refere a imunologia, farmacologia e patogenicidade envolvidas na doença de Chagas (DVORAK, 1984). Trata-se de um conjunto de populações heterogêneas, circulando tanto no ciclo silvestre de transmissão quanto no ciclo doméstico em diferentes reservatórios animais e vetores.

Populações isoladas do *T. cruzi* apresentam alta heterogeneidade genética a qual se reflete num grande impacto fenotípico, quando parâmetros tais como a forma tripomastigota, perfil antigênico, metacicloquese, patogenicidade, preferência ou tropismo tecidual, e sensibilidade a fármacos são considerados. Estudos utilizando populações do *T. cruzi*, clonadas e não clonadas, demonstram que as cepas do parasito são compostas de populações com distintas características genéticas e biológicas (POSTAN e cols., 1986; FINLEY & DVORAK, 1987). Embora análises genéticas sejam importantes para a compreensão da heterogeneidade intraespecífica do *T. cruzi*, estudos do comportamento biológico e da relação parasito-hospedeiro são fundamentais para a percepção da capacidade intraespecífica do parasito em provocar manifestações clínico-patológicas da doença de Chagas. Segundo Thompson e Lymbert (1990) as cepas do parasito precisam ser descritas a partir da combinação de suas características genéticas e biológicas, pois a análise genética apenas, não permite a interpretação se sua relevância biológica.

O comportamento biológico em animais de laboratório é um dos parâmetros utilizados para a caracterização das diferentes cepas do *T. cruzi*. Camundongos têm sido amplamente utilizados, como modelos experimentais, devido a grande facilidade de manuseio e obtenção, baixos custos e a diversidade de linhagens existentes, inclusive isogênicas, que possibilitam o estudo de diferentes aspectos da doença (ANDRADE, 2000). A maioria das caracterizações biológicas do *T. cruzi* tem sido conduzida em camundongos não isogênicos Swiss, já que estes animais são constituídos de grupos heterogêneos, os quais podem ser utilizados na simulação da heterogeneidade humana

nas áreas endêmicas da doença. O cão também é um bom modelo experimental, pois além de ser de fácil manuseio, sobrevive por 15 a 20 anos e desenvolve a fase aguda, indeterminada e a forma cardíaca da doença de Chagas.

A variabilidade no comportamento biológico (infectividade, parasitemia, resistência a quimioterápicos, taxa de mortalidade, etc) do parasito, em animais experimentais, pode ser explicada pela combinação de fatores imunológicos, ambientais, virulência e patogenicidade de clones e, possivelmente, seleção de cepas e clones após interação com hospedeiros vertebrados e invertebrados (BICE & ZELEDÓN, 1970; MAGALHÃES e cols., 1996).

A primeira tentativa de se agrupar as cepas do *T. cruzi* foi baseada em critérios morfológicos e biológicos. Em 1909 Carlos Chagas já havia descrito a ocorrência de formas finas e largas do parasito circulante. (CHAGAS, 1909). Brener e Chiari (1963) e Brener (1965) confirmaram estas diferenças e demonstraram que tais formas estavam presentes em diferentes porcentagens nas várias cepas. As formas finas seriam predominantes nas cepas de alta virulência e teriam tropismo para macrófagos (BRENER, 1965 ; ANDRADE, 1974). As formas largas estariam em maior proporção nas cepas de baixa virulência e com tropismo para células musculares. Além disso, as formas finas seriam mais sensíveis ao sistema imune do hospedeiro, enquanto as formas largas seriam mais resistentes aos mecanismos imunes, suportando uma permanência maior no sangue destes animais (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1965). Brener (1977) sugeriu a caracterização do *T. cruzi* em dois tipos polares, baseados na morfologia e tropismo tecidual do parasito. Assim, haveria um pólo agressivo representado pela cepa Y e um benigno exemplificado pela cepa CL.

Estudos iniciais de Miles e cols. (1981) sobre cepas do *T. cruzi*, isoladas na Venezuela e no Brasil, sugeriram a possibilidade de alguma correlação entre zimodemas e formas clínicas da doença de Chagas. Porém, Apt e cols. (1987) não observaram nenhuma correlação entre estes parâmetros. Andrade e Magalhães (1996) realizaram um extensivo estudo sobre as características biológicas e bioquímicas de 138 cepas do *T. cruzi* isoladas de diferentes áreas geográficas, sendo 120 do Brasil e 18 de outros países da América do Sul e Central. Os resultados obtidos a partir da análise das características biológicas e histopatológicas destas cepas, em experimentações animais, permitiram a sua inclusão em três tipos ou biodemas I, II e III. Os autores observaram

correspondência entre biodemas e zimodemas: Tipo I e Z2b, Tipo II e Z2, Tipo III e Z1. Os resultados também mostraram a distribuição ubíqua dos vários tipos de cepas, observando-se a predominância do mesmo biodema em uma mesma área geográfica.

Estudos utilizando ferramentas moleculares demonstraram a existência, numa população heterogênea do parasito, de clones mais representativos, podendo ser encontrados em vários hospedeiros, em diferentes áreas geográficas da América Latina. Tais clones poderiam ser responsáveis pela variação de resposta à quimioterapia e por diferentes manifestações clínicas da doença (ANDRADE, 1999). Em 1988, Tibayrenc e Brenière verificaram que os clones naturais 19, 20, 39 e 32 eram ubíquos e os denominaram clones principais, estando presentes em 53,7% dos isolados, nos mais diversos hospedeiros e localidades.

Toledo e cols. (2002) analisando 14 parâmetros relacionados à virulência e patogenicidade em camundongos, demonstraram correlação entre diferenças biológicas e distâncias filogenéticas de genótipos clonais do *T. cruzi*. Em 2003 esses mesmos autores, analisando um total de 20 clones do *T. cruzi*, representantes da grande diversidade filogenética do parasito (incluindo os genótipos ubíquos 20, 19, 32 e 39) correlacionaram a susceptibilidade a quimioterápicos (itraconazol e benznidazol) em camundongos com as distâncias filogenéticas do *T. cruzi*. Entretanto, Villarreal e cols. (2004), utilizando análises de RAPD e eletroforese de isoenzimas de 16 clones naturais do *T. cruzi*, amplamente diversificados, não conseguiram estabelecer correlação, *in vitro*, entre susceptibilidade ao Bz e a distância filogenética do parasito. As diferentes formas de manutenção do parasito utilizadas pelos dois autores citados acima comprometeu a comparação de seus resultados.

Como nem toda a variabilidade genética do *T. cruzi* parece apresentar uma correlação biológica direta seria muito promissor o esforço de se agrupar a vasta diversidade do parasito de acordo com as diferenças biológicas mais relevantes e com a identificação de alguns marcadores moleculares mais comuns (encontrados com maior frequência nas populações mais e menos virulentas). Isso possibilitaria a divisão das espécies em simples subgrupos (principalmente o grupo *T. cruzi* II, que apresenta as maiores variações clínicas) com uma discriminação mais prática entre as populações de forma a permitir um possível tratamento da infecção humana de acordo com apresentação de algumas características marcantes (BUSCAGLIA & DI NOIA, 2003).

### 1.10 Alterações fenotípicas e/ou populacionais do *T. cruzi*

A correlação entre diversidade genética e patogenicidade do *T. cruzi* foi proposta através do modelo Histotrópico-Clonal (MACEDO & PENA, 1998). Este modelo se baseia na hipótese de que a heterogeneidade e multiclonalidade de uma cepa são fatores responsáveis pelos diferentes tropismos teciduais e, conseqüentemente, pelas variações na apresentação clínica da doença. Devido ao tropismo diferencial das várias cepas, os clones circulantes e disponíveis para o isolamento por hemocultura, podem ser diferentes daqueles responsáveis pela lesão tecidual. As técnicas de isolamento e cultivo do parasito podem selecionar subpopulações do parasito, não obtendo isolados representativos da população presente nos tecidos e sangue do hospedeiro vertebrado (ANDRADE, 1999).

Em cultivos *in vitro*, a seleção de subpopulações pode ocorrer ao se alterar a composição dos nutrientes do meio de cultura. Manutenção de cepas do parasito, por vários meses ou anos em cultivo *in vitro*, pode resultar em diminuição da virulência e infectividade destas cepas em animais de laboratório. Essa observação tem sido explicada como resultado da seleção de subpopulações melhor adaptadas ao crescimento *in vitro* do que ao crescimento *in vivo* (BICE & ZELEDÓN, 1970; CHIARI e cols., 1973; DEANE e cols., 1984a; MAGALHÃES e cols., 1985; ALVES e cols., 1993). Em hospedeiros vertebrados o sistema imune pode ter um importante papel neste fenômeno (LANA e cols., 1996; Oliveira e cols., 1998). Alterações nas características das cepas originais podem ser observadas em experimentações animais de longa duração. Em relação à virulência dessas cepas, já foi descrito tanto aumento (CARNEIRO e cols., 1991) quanto declínio (BRENER e cols., 1974). Segundo Basombrío e cols, (2000) a manutenção de populações do parasito em passagens sangüíneas sucessivas em camundongos seleciona populações com aumentada habilidade de invadir o hospedeiro vertebrado. Por outro lado, a manutenção *in vitro*, seleciona populações com baixa infectividade para mamíferos.

Análises bioquímicas e genômicas do *T. cruzi* estão revelando uma variedade de genes e funções que contribuem, independentemente, para a virulência (PEREIRA, 1996; BASOMBRIIO e cols., 1996). Provavelmente, várias subfunções necessárias para

a infectividade podem não ser essenciais para o crescimento *in vitro*. O *T. cruzi* apresenta um genoma plástico capaz de sofrer atenuação temporária reversível (CHIARI, 1974; LEGUIZAMÓN e cols., 1993), bem como perda irreversível de virulência em culturas (FIGUEIREDO e cols., 1996), possibilidade também suportada por experimentações em animais imunossuprimidos (BASOMBRÍO e cols., 2000).

Veloso e cols., (2005) observaram variações da virulência entre quatro populações do *T. cruzi* isoladas de cães infectados pela cepa Be-78 (2 a 7 anos de infecção), as populações isoladas apresentaram virulência similar ou menores do que a cepa parental. Lana e Chiari (1986) descreveram resultados similares em camundongos, comparando a cepa Berenice original (Be-62) com outro isolado da mesma paciente (Be-78) obtido 16 anos depois. Relatos na mudança do perfil de RFLP do kDNA após inoculação em animais são também comuns, evidenciando o papel seletivo exercido pelos vertebrados (DEANE e cols., 1984a, c, d; MOREL e cols., 1986; CARNEIRO e cols., 1990; ALVES e cols., 1993).

Berenice, o primeiro caso humano da doença de Chagas, pode exemplificar o papel seletivo exercido pelo hospedeiro cronicamente infectado. Duas populações do *T. cruzi* foram isoladas desta paciente aos seus 55 e 71 anos de idade e denominadas Be-62 (Salgado e cols., 1962) e Be-78 (Lana e Chiari, 1986), já que os isolamentos foram realizados nos anos de 1962 e 1978 respectivamente. A população Be-78 mostrou-se diferente da população Be-62 em relação à morfologia, parasitemia, tropismo tecidual, patogenicidade, mortalidade em camundongos, crescimento e diferenciação em meio LIT (LANA & CHIARI, 1986) e Perfis de kDNA e isoenzimas (LANA e cols., 1996). Foi verificada alta infectividade e baixa virulência para camundongos isogênicos *C<sub>3</sub>H* infectados com a cepa Be-78 (LANA & CHIARI, 1986). Por outro lado, esta cepa se mostrou mais patogênica do que a cepa Berenice-62 quando foi utilizado o cão como modelo experimental (LANA e cols., 1992).

Cruz e cols. (2005) demonstraram através de análises de microssatélites, diferenças entre as cepas parentais Be-62 e Be-78 do *T. cruzi*, mas sugeriram que ambas as populações fossem monoclonais, uma vez que cada cepa e seus respectivos clones apresentaram os mesmos produtos de amplificação. Esses dados, porém, foram diferentes daqueles encontrados por Veloso e cols. (2005) os quais permitiram sugerir a policlonalidade da cepa Be-78.



Alguns trabalhos, utilizando a cepa Y do *T. cruzi* (parcialmente sensível ao Bz), têm demonstrado a indução de resistência ao Bz *in vivo*, e que a resistência de cepas do *T. cruzi* ao Bz e ao Nf aumenta quando os parasitos são isolados de camundongos previamente tratados com os mesmos fármacos (MARRETTO & ANDRADE, 1994; MURTA & ROMANHA, 1998). Os autores sugerem que o tratamento inicial elimina os parasitos sensíveis preservando apenas os resistentes, que multiplicam e dominam a população.

Situação diversa foi observada por Veloso e cols. (2001), que demonstraram indução natural de resistência ao Bz em duas populações do *T. cruzi* reisoladas de cães previamente infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, considerada 100% sensível a este quimioterápico (TOLEDO e cols., 1995). Considerando que as características genéticas das populações do *T. cruzi* podem ser um dos fatores que modulam o processo de susceptibilidade/resistência ao Bz, a variação na resistência ao fármaco demonstrada pelos autores citados acima poderia ser reflexo da plasticidade genética observada no *T. cruzi*, fato já demonstrado por diversos autores (MCDANIEL & DVORAK, 1993; PACHECO & BRITO, 1999). Durante o processo de adaptação às pressões imunológicas do hospedeiro, o parasito acabaria tornando-se resistente, também, a mecanismos de pressão artificial, como a pressão oferecida pelo Bz, por exemplo.

Nesse sentido, a determinação da resistência ao Bz de populações do *T. cruzi* isoladas de cães cronicamente infectados com cepas desse protozoário (sensíveis ao Bz), e a seguir submetidas a reduzido estresse imunológico, através de sucessivas passagens sanguíneas em camundongos, durante o início da fase aguda da doença, poderá fornecer melhor compreensão sobre o processo de susceptibilidade/resistência ao Bz desenvolvido em populações do parasito, bem como permitir melhor entendimento sobre os baixos índices de cura observados em humanos portadores crônicos da doença de Chagas.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo Geral

Investigar a ocorrência de indução natural de resistência ao Bz em populações do *T. cruzi* isoladas de cães chagásicos crônicos infectados com as cepas parentais Berenice-62 e Berenice-78 (sensíveis ao Bz) e avaliar a possibilidade de novas alterações no fenótipo de susceptibilidade/resistência ao fármaco quando tais populações forem submetidas a sucessivas PSCs (passagens sanguíneas em camundongos) na fase aguda da infecção.

## 2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o grau de resistência ao Bz das populações do *T. cruzi* provenientes de cães chagásicos crônicos, infectados com as cepas parentais Berenice-62 e Berenice-78, logo após o seu isolamento, utilizando camundongos Swiss albinos como modelo experimental.

2. Investigar a ocorrência de alterações no fenótipo de susceptibilidade/resistência ao Bz, ao manter as populações do *T. cruzi* em camundongos na fase aguda da doença, através de sucessivas PSCs.

3. Caracterizar as populações do parasito, nas diferentes PSCs, comparativamente às cepas parentais, segundo os parâmetros:

- infectividade;
- curva de parasitemia;
- Mortalidade.

### **3. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Populações do *T. cruzi*

Foram utilizadas as cepas parentais Berenice-62 (SALGADO e cols., 1962) e Berenice-78 (LANA & CHIARI, 1986), provenientes da paciente Berenice, considerada o primeiro caso clínico humano da doença de Chagas. Ambas as cepas pertencem ao grupo *T. cruzi* II (Satellite Meeting, Rio de Janeiro, Anon, 1999).

Foram utilizadas, também, duas populações do *T. cruzi* isoladas, através de Hemocultura (Hc) (CHIARI e cols., 1989) de dois cães, sem raça definida, experimentalmente infectados com a cepa Berenice-62 (10 anos de infecção) e três populações do parasito isoladas, através de Hc, de três cães chagásicos crônicos (2 a 10 anos de infecção), sem raça definida, experimentalmente infectados com a cepa Berenice-78. As informações sobre estes isolados estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Condições de inoculação, tempo de infecção e formas clínicas apresentadas pelos cães, experimentalmente infectados com as cepas parentais Be-62 e Be-78 e utilizados para o isolamento de cinco populações do *T. cruzi*.

Cão	Cepa	Forma evolutiva	Tempo de infecção	Forma clínica	População isolada
1	Be-62	TM	10	Indeterminada	Be-62A
2	Be-62	TM	10	Indeterminada	Be-62B
3	Be-78	TS	7	Indeterminada	Be-78C
4	Be-78	TS	2	Indeterminada	Be-78D
5	Be-78	TM	10	Cardíaca	Be-78E

Tripomastigotas metacíclicos (TM)

Tripomastigotas sangüíneos (TS)

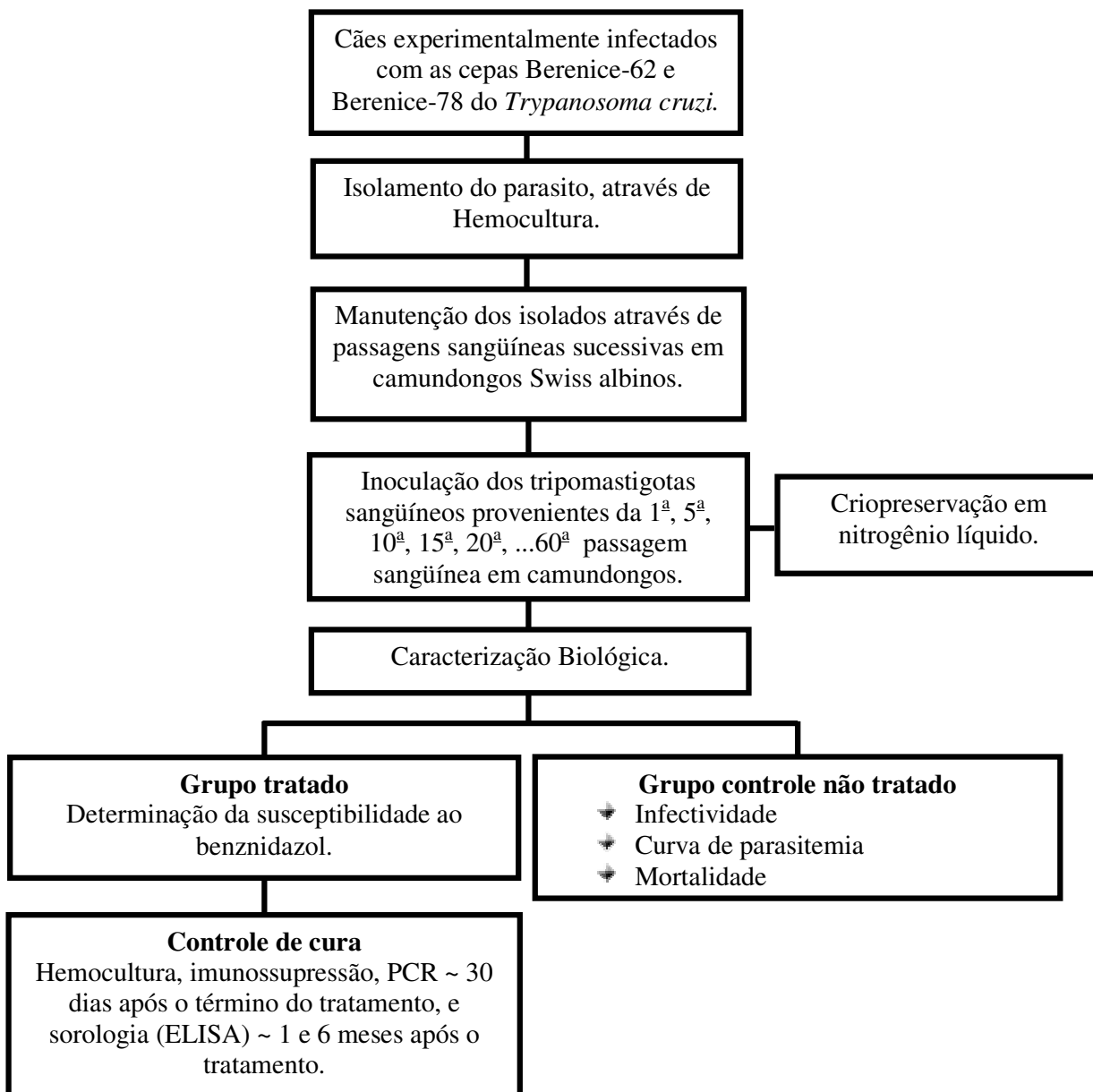
#### 3.1.2 Manutenção das populações do *T. cruzi*

As amostras do *T. cruzi*, após serem isoladas dos cães, foram crescidas em meio LIT a 28°C, criopreservadas, e inoculadas em camundongos Swiss. A seguir, foram mantidas através de sucessivas PSCs, utilizando-se inóculo de 50.000 tripomastigotas sangüíneos. (Figura 1).

### 3.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos, com trinta dias de idade, fêmeas, pesando aproximadamente 20g, nascidos e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto.

**Figura 1 – Delineamento experimental**



### **3.3 Caracterização biológica**

As cepas parentais e as populações isoladas de cães foram inoculadas em camundongos Swiss albinos e submetidas a estudo comparativo, através dos parâmetros descritos abaixo.

#### **3.3.1 Análise da virulência e da patogenicidade**

Os experimentos foram realizados de acordo com o delineamento experimental (Figura 1). Inicialmente, a cada cinco PSCs e, posteriormente, a cada 10 PSCs, cada uma das cinco populações do *T. cruzi*, isoladas de diferentes cães cronicamente infectados, foi inoculada em grupos de 16 camundongos, via intraperitoneal. Em cada experimento, foram inoculados seis camundongos, para constituir o grupo controle infectado e não tratado, e 10 camundongos para constituir o grupo tratado. O grupo tratado foi utilizado para a determinação da susceptibilidade ao Bz, e o grupo controle foi utilizado para a avaliação da infectividade, curva de parasitemia e mortalidade. No parâmetro infectividade foram avaliados, também, além dos seis camundongos não tratados do grupo controle, os outros 10 camundongos do grupo tratado.

#### **3.3.2 Infectividade**

A infectividade de cada isolado, nas diferentes PSCs, foi verificada pela observação, através do exame de sangue a fresco, de parasitos no sangue periférico dos camundongos inoculados. Os camundongos apresentando exames de sangue a fresco persistentemente negativos foram submetidos à Hc para a confirmação da infectividade.

#### **3.3.3 Curva de parasitemia**

Para a avaliação da parasitemia foi realizada a coleta de sangue, dos vasos sangüíneos, da ponta da cauda de cada animal dos grupos controle, a partir do quarto dia de infecção. A quantificação dos parasitos foi realizada segundo a técnica descrita por Brener (1962). A parasitemia foi avaliada até a não observação, por pelo menos cinco

dias consecutivos, de parasitos no sangue periférico dos animais ou por um período de pelo menos 30 dias, naqueles animais que apresentavam baixos níveis de parasitemia de forma intermitente. As curvas representam as médias diárias dos parasitos observados, por exame de sangue a fresco, nos animais de cada grupo controle.

### **3.3.4 Mortalidade**

A taxa de mortalidade, em cada experimento, foi calculada contando-se todos os camundongos do grupo controle, que morreram durante um período de pelo menos 120 dias após a infecção. Os resultados foram expressos em percentagens.

### **3.3.5 Susceptibilidade ao benznidazol**

Para a determinação da susceptibilidade ao Bz (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) (Roche), grupos de 10 camundongos inoculados, via intraperitoneal, com 5.000 tripomastigotas sangüíneos provenientes da 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>...60<sup>a</sup> PSCs foram tratados com Bz, durante 20 dias consecutivos, após a confirmação da infecção. Cada comprimido de Bz, de 100mg, foi macerado em graal, com o auxílio de um pistilo, e suspenso em exatos 10 mL de água, utilizando-se a goma arábica como agente suspensivo. Através de uma cânula de metal e de uma seringa, foi administrado aos animais, por via oral, um volume do fármaco correspondente a 100 mg/kg de peso corporal, segundo protocolo descrito por Filardi e Brener (1987).

Foi considerado curado todo animal que apresentou exame de sangue a fresco persistentemente negativo, antes e após a imunossupressão com ciclofosfamida, bem como resultados de Hc e PCR negativos. Antes do início da imunossupressão foi coletado sangue dos animais para a realização da sorologia. O teste sorológico utilizado foi o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Os resultados da sorologia tiveram a finalidade de discriminar os animais que seriam submetidos à análise de controle de cura por PCR. Esta técnica, para diagnóstico, foi realizada apenas nos camundongos que apresentaram resultados discordantes entre a sorologia e a Hc. Logo, os animais com resultados reativos da sorologia e resultados da Hc negativos foram



submetidos à investigação da cura por PCR. Todos os animais que apresentaram resultados de Hc e PCR negativos foram considerados curados.

### 3.4 Exames parasitológicos para o controle de cura

O exame de sangue a fresco foi realizado entre o 15<sup>o</sup> e o 25<sup>o</sup> dia após o tratamento, para a observação da reativação natural da parasitemia nos animais tratados e não curados. A imunossupressão dos animais, apresentando parasitemia negativa, foi iniciada aos 25 dias após o tratamento, para fins de controle de cura. Foram administradas doses de 0,05mL de ciclofosfamida (Genuxal®), correspondentes à concentração de 50mg/kg de peso corporal, durante quatro dias consecutivos, com espaços de três dias, intercalando-se três ciclos de administração. Foram realizados exames de sangue a fresco durante a imunossupressão, cessando-se o esquema de administração da ciclofosfamida nos animais que apresentaram a reativação da parasitemia. A atividade imunossupressora da ciclofosfamida se deve ao bloqueio da síntese de DNA dos linfócitos com o consequente controle da produção de células B.

A Hc foi realizada aos 35 dias após o tratamento, nos animais do grupo tratado e também do grupo controle, com as finalidades de controle de cura, expansão das populações do *T. cruzi* para criopreservação em nitrogênio líquido, e obtenção de massas de parasitos para futuras caracterizações moleculares. Para tal 0,4 a 0,6 mL de sangue foi coletado assepticamente no seio venoso retro-orbital dos animais e distribuído em tubos de 15mL (*falcon*) contendo 3mL de 'LIT' (Liver infusion tryptose). Os tubos foram incubados em estufa a 28°C. As Hcs foram examinadas aos 30, 45 e 60 dias após a sua realização.

A técnica de PCR utilizada foi a de Britto e cols. (1995) modificada por Gomes e cols. (1998). Foram coletados 200µL de sangue de cada animal, pelo plexo venoso retro-orbital 30 dias após o tratamento, e adicionados ao dobro de solução de Guanidina-HCl/EDTA 6,0 M, pH 8,0 (ÁVILA e cols., 1991). As amostras de sangue foram fervidas, a 100°C por 7min, uma semana após a coleta (BRITTO e cols., 1993) e estocadas a temperatura ambiente até o momento do uso.

A extração do DNA foi feita com Fenol: Clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1). A precipitação foi realizada com 0,1 volume de acetato de sódio 3,0M e dois

volumes de álcool absoluto gelado. O DNA extraído foi amplificado com a utilização dos iniciadores específicos:

S35 (5'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA 3') e

S36 (5'GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT 3') descritos por Ávila e cols. (1990). Estes iniciadores anelam-se nas microrregiões conservadas dos minicírculos do kDNA resultando na amplificação de fragmentos da região variável.

Foram realizados 35 ciclos de amplificações no termociclador automático (MinCycler TM). As condições da reação foram: desnaturação do DNA a 95° C por 1 minuto (a 1ª etapa foi por 5 minutos), anelamento dos iniciadores a 65°C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto (o último ciclo foi de 10 minutos). Nas etapas de extração do DNA e mistura da reação de PCR foram utilizados controles negativos obtidos de camundongos não infectados e controles positivos obtidos de camundongos apresentando a fase aguda da doença. Os produtos amplificados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelados pela prata (SANTOS e cols., 1993).

### 3.5 Exames sorológicos

Foi coletado, aproximadamente, 0,5 mL de sangue, no seio venoso retro-orbital, de cada animal tratado. As amostras de sangue foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5mL (*ependorf*) e centrifugadas a 3000 rpm (735 G) durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos *ependorf* de 0,5mL a 4°C. As coletas foram feitas aos 25 dias e 6 meses após o tratamento.

Foram utilizados antígenos da forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi*, obtidos de cultivo acelular em meio LIT. Uma anti-imunoglobulina de camundongo, da classe IgG, obtida de soro imune de cabra e marcada com peroxidase (SIGMA, Chemical Company, USA) foi utilizada como conjugado.

A ELISA foi realizada segundo a metodologia descrita por Voller e cols. (1976), modificada de acordo com o protocolo descrito a seguir. O teste foi executado em placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato. Cada poço da placa foi tratado com 100µl do extrato antigênico de epimastigotas, na concentração definida previamente por

titulação em bloco (4.5µg/mL), diluído em solução tampão carbonato (pH 9,6). As placas foram incubadas a 4°C por 18h e após este intervalo de tempo foram bloqueadas com 100µL/poço de PBS + SFB 5% e incubadas a 37°C por 30 minutos. A próxima etapa consistiu na adição de 100µL do soro de cada animal, diluído na proporção de 1:80 em PBS-Tween 0,05% e incubação a 37°C por 45 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100µL/poço do anticorpo conjugado, diluído em PBS-Tween 0,05%, conforme titulação prévia, e as placas foram novamente incubadas a 37°C por 45 minutos. Finalmente, foram adicionados 100µL/poço da solução de substrato (3µg de O-fenilendiamino-OPD, 15mL de solução de ácido cítrico e 3µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vol)) e decorridos 20 minutos de incubação a 37°C, a reação foi interrompida com a adição de 32µL/poço de ácido sulfúrico 4M. Entre cada etapa, as placas foram submetidas a quatro lavagens com solução salina (NaCl 9g/Tween-20 0,5mL, e H<sub>2</sub>O qsp 1L).

A leitura foi realizada em leitor de microplaca (BIO RAD, Modelo 3550) com filtro de 490nm. Em cada placa foram adicionados 10 soros controles negativos e quatro controles positivos. A absorbância discriminante, em cada placa, foi calculada tomando-se a média da absorbância dos 10 soros negativos somados a dois desvios padrão.

### **3.6 Análise estatística dos dados**

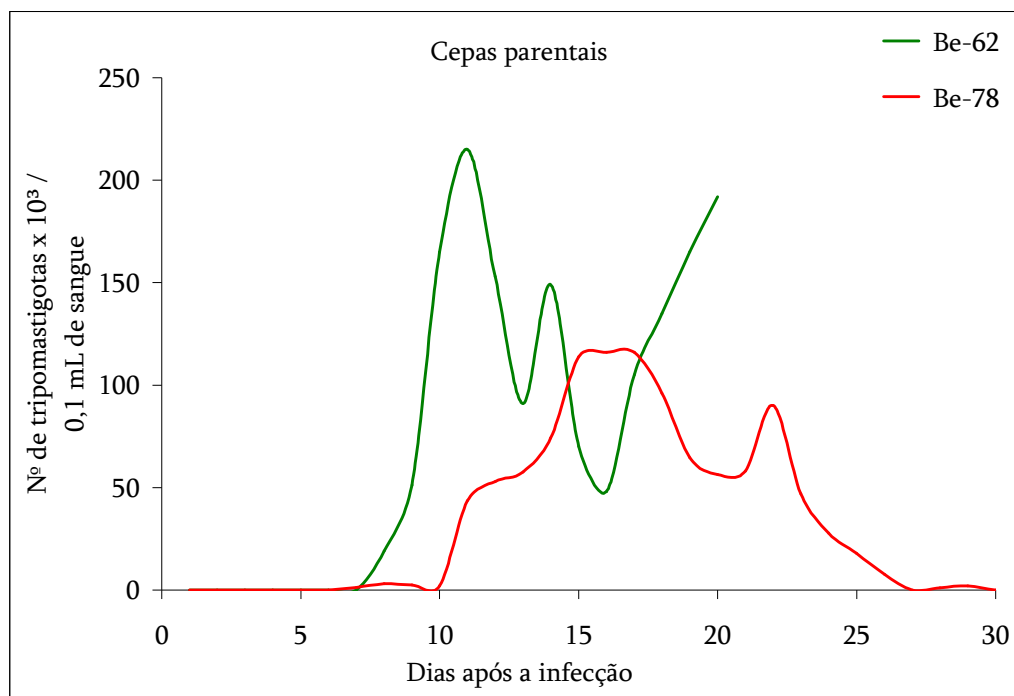
Foi utilizada a correlação de Pearson (r) para avaliar a associação entre o grau de resistência ao Bz e o número de passagens sanguíneas em camundongos. Diferenças significativas foram aceitas para  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Caracterização biológica

As curvas de parasitemia média obtidas em camundongos Swiss albinos não tratados inoculados com as cepas parentais Be-62 e Be-78 do *T. cruzi* estão apresentadas no gráfico 1. A taxa de infectividade observada nos animais infectados com a cepa Be-62 foi de 100% (16/16). O período pré-patente (PPP), foi de sete dias. O período patente (PP), correspondente aos dias em que os parasitos foram detectados no sangue periférico dos animais, foi de apenas 13 dias. A sua interrupção foi ocasionada pela morte de todos os camundongos do grupo controle (6/6) entre os dias 14 e 20 após a infecção. Foi observado um pico de parasitemia, com uma média de  $2,1 \times 10^5$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue, no 11<sup>o</sup> dia de infecção e um segundo pico no 14<sup>o</sup> dia de infecção com uma média de  $1,5 \times 10^5$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue.

A cepa parental Be-78 apresentou uma taxa de infectividade de 93,7% (15/16). O PPP foi de seis dias. O PP foi de 22 dias ocorrendo entre os dias oito e 30 após a infecção. Foram observados dois picos de parasitemia, no 17<sup>o</sup> e 22<sup>o</sup> dia de infecção, com as contagens de  $1,2 \times 10^5$  e  $9,0 \times 10^4$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue respectivamente. Não ocorreu a morte de nenhum camundongo do grupo controle (0/6) durante os 120 dias de observação.



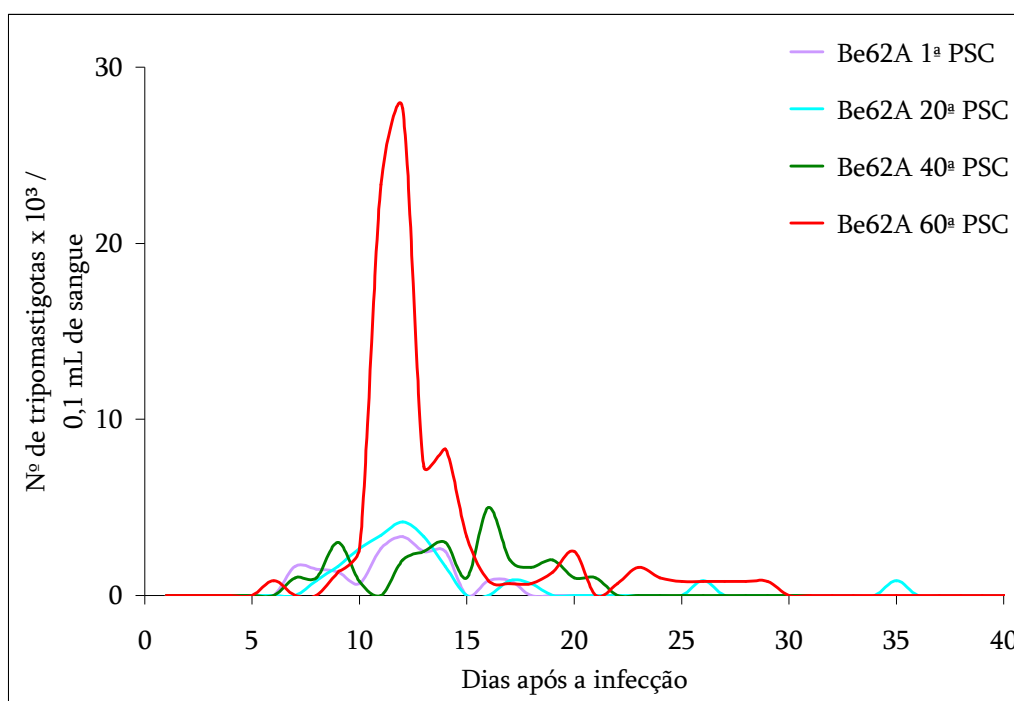
**Gráfico 1** - Curvas de parasitemia em camundongos Swiss inoculados com  $5,0 \times 10^3$  tripomastigotas sanguíneas, provenientes das cepas parentais Be-62 e Be-78 do *T. cruzi*.

No Gráfico 2 estão representadas as curvas de parasitemia realizadas em grupos de camundongos não tratados, inoculados com  $5,0 \times 10^3$  tripomastigotas sanguíneas provenientes da 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC do isolado Be-62A. As taxas de infectividade observadas foram de 93,7% (15/16) na 40<sup>a</sup> PSC e 100% (16/16) nas demais PSCs. Os PPPs foram de cinco a sete dias e os PPs foram de 11 dias na 1<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> PSC, 15 dias na 40<sup>a</sup> e 24 dias na 60<sup>a</sup> PSC, notando-se um aumento deste período à medida que progrediam as PSCs.

Em geral, o isolado Be-62A apresentou níveis baixos de parasitemia, consideravelmente inferiores aos apresentados pela cepa parental Be-62. Entretanto, observou-se uma tendência para o aumento da intensidade e do número de picos de parasitemia com o avanço das PSCs. Na 1<sup>a</sup> PSC foi observado um pico de parasitemia de apenas  $3,3 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue no 12<sup>o</sup> dia de infecção. Na 20<sup>a</sup> PSC o pico de parasitemia também ocorreu no 12<sup>o</sup> dia, com a contagem de  $4,2 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue. Na 40<sup>a</sup> PSC foram observados dois picos de parasitemia, ambos apresentando a contagem de  $3,0 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue nos dias nove e 14 após a infecção e um terceiro pico no 16<sup>o</sup> dia de infecção com

uma contagem média de  $5,0 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue. Na 60<sup>a</sup> PSC foi observado um pico de parasitemia bem definido no 12<sup>o</sup> dia de infecção, com uma contagem média, consideravelmente expressiva para este isolado, quando comparada às outras PSCs ( $2,8 \times 10^4$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue) e um segundo pico dois dias depois com uma média de  $8,3 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue.

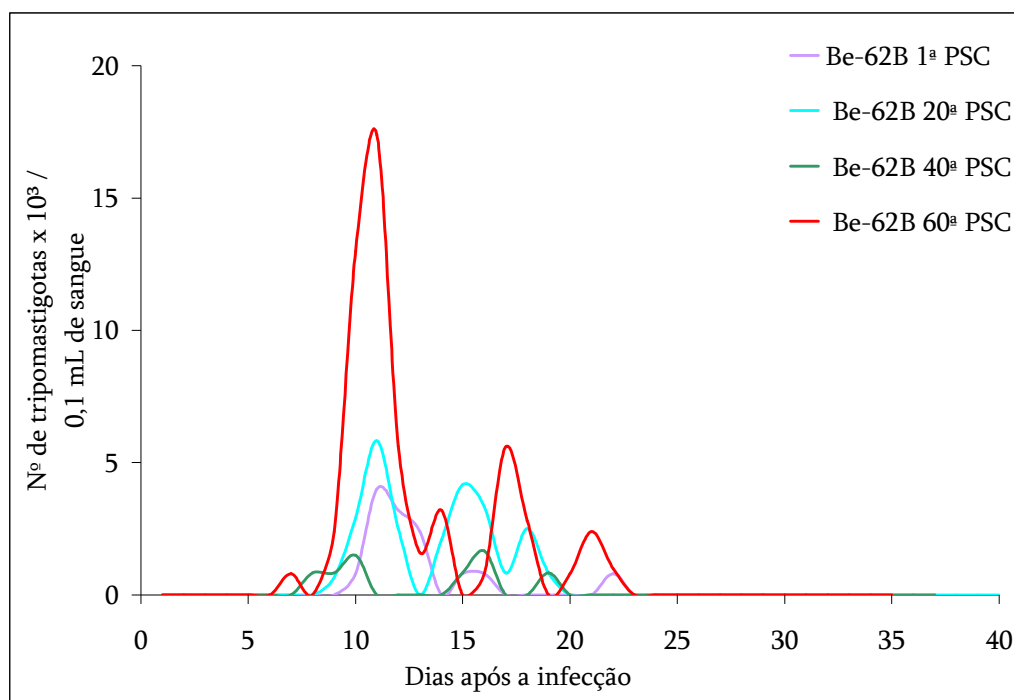
Foram observadas 16,6% (1/6) de mortalidade na 1<sup>a</sup> PSC, 0% (0/6) na 20<sup>a</sup> PSC, 20% (1/5) na 40<sup>a</sup> PSC e 33,3% (2/6) na 60<sup>a</sup> PSC. Essas taxas de mortalidade foram consideravelmente inferiores aos 100% (6/6) de mortalidade observados na cepa parental Be-62.



**Gráfico 2** - Curvas de parasitemia referentes à 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC, do isolado Be-62A, inoculado em grupos de camundongos não tratados.

No Gráfico 3 estão representadas as curvas de parasitemia realizadas em grupos de camundongos não tratados inoculados com  $5,0 \times 10^3$  tripomastigotas sanguíneos provenientes da 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC do isolado Be-62B. As taxas de infectividade foram de 93,7% (15/16) na 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC e 100% (16/16) na 40<sup>a</sup> PSC. Os PPPs apresentados nas diferentes PSCs oscilaram entre seis e nove dias, sendo observada a diminuição deste período com o avanço das PSCs, enquanto os PPs variaram entre 11 e 16 dias com uma ligeira tendência de aumento deste intervalo com a progressão das

PSCs. Os níveis de parasitemia, assim como os apresentados pelo isolado Be-62A, foram sempre muito baixos, consideravelmente inferiores aos apresentados pela cepa parental Be-62. Com exceção da 40<sup>a</sup> PSC, na qual foram observados níveis de parasitemia ainda mais reduzidos, com pico máximo inferior a  $2,0 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue, nas outras PSCs foi observada uma tendência de aumento na intensidade dos picos de parasitemia. Os picos máximos de parasitemia ocorreram no 11<sup>o</sup> dia de infecção e apresentaram as contagens médias de  $4,0 \times 10^3$ ,  $5,8 \times 10^3$  e  $1,7 \times 10^4$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue na 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC respectivamente. Nas 20<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC também foi detectado um segundo pico de parasitemia no dia 15 ( $4,2 \times 10^3$  tripomastigotas/0.1 mL de sangue) e no dia 17 ( $5,6 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue) de infecção respectivamente. As taxas de mortalidade observadas foram de 0% (0/6) na 1<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> PSC, 16,6% (1/6) na 20<sup>a</sup> PSC e 33,3% (2/6) na 60<sup>a</sup> PSC, muito inferiores à taxa de 100% (6/6) de mortalidade apresentada pela cepa parental Be-62.

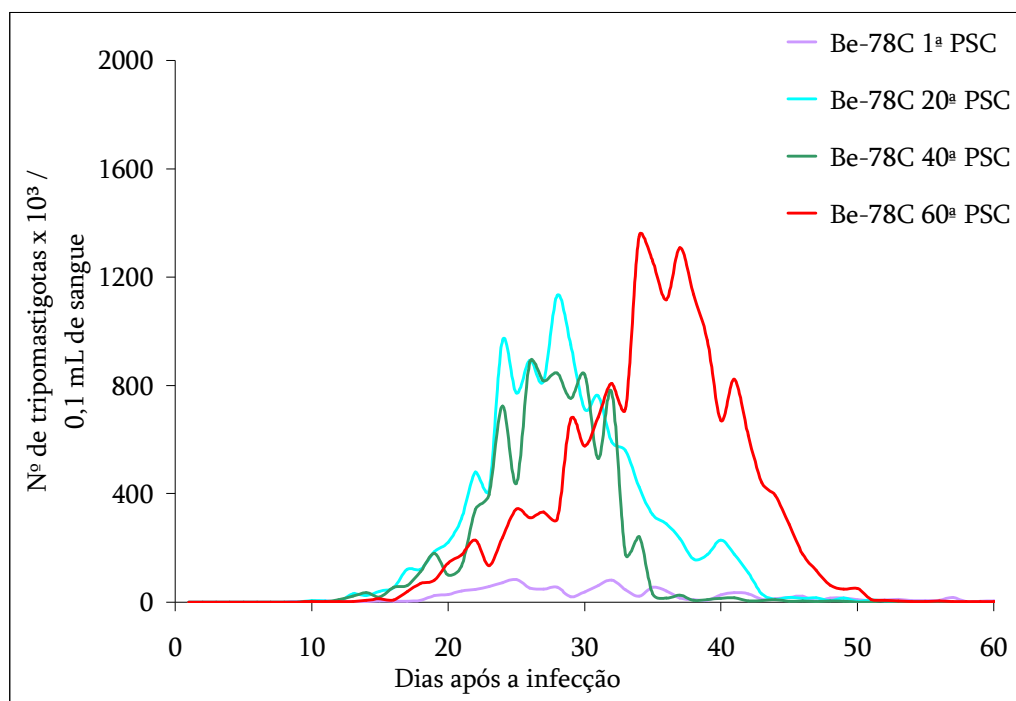


**Gráfico 3** - Curvas de parasitemia referentes à 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC, do isolado Be-62B, inoculado em grupos de camundongos não tratados.



No Gráfico 4 estão representadas as curvas de parasitemia realizadas em camundongos não tratados inoculados com  $5,0 \times 10^3$  tripomastigotas sanguíneas provenientes da 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC do isolado Be-78C. Foram observadas 100% (16/16) de infectividade em todas as PSCs. Os PPPs variaram entre oito e nove dias e os PP oscilaram entre 46 e 67 dias, não se observando relação entre o aumento das PSCs com aumento do PP.

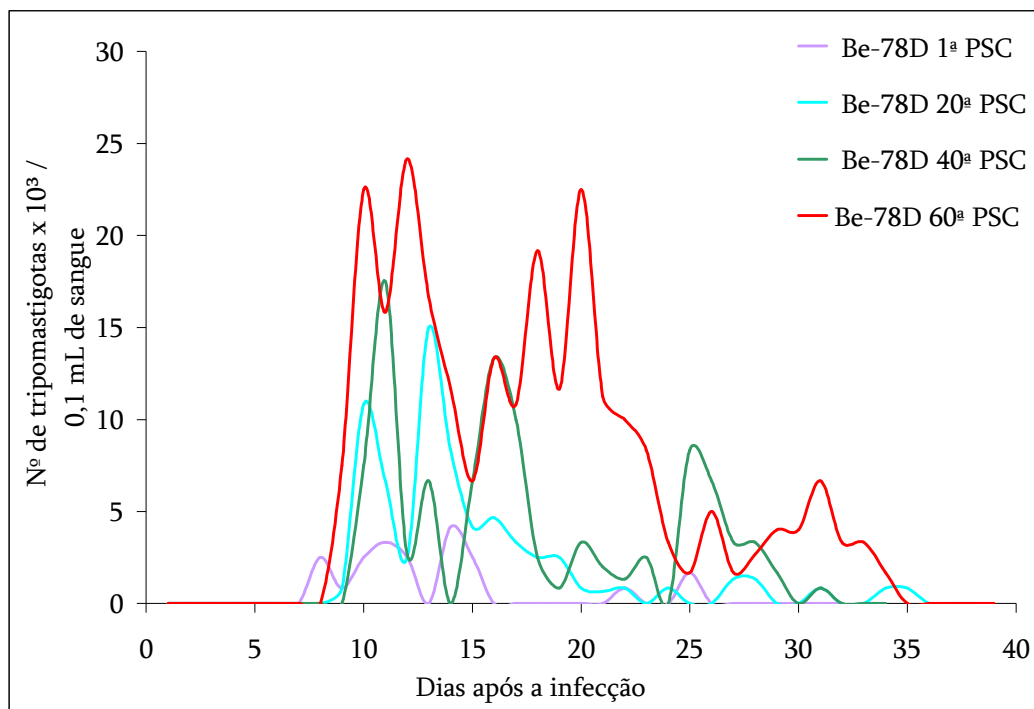
Observou-se grande variação na intensidade da parasitemia apresentada nas diferentes PSCs, em geral, com vários picos de parasitemia e consideravelmente superiores aos apresentados pela cepa parental Be-78. Os dias e as intensidades dos picos máximos de parasitemia na 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC ocorreram, respectivamente, nos 25<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 26<sup>o</sup> e 34<sup>o</sup> dias de infecção, com as contagens médias de  $8,4 \times 10^4$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $8,9 \times 10^5$  e  $1,3 \times 10^6$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue. A taxa de mortalidade induzida pelo isolado foi de 0% na 1<sup>a</sup> PSC, 16,6% (1/6) na 60<sup>a</sup> e na 20<sup>a</sup> PSC, e 33,3% (2/6) na 40<sup>a</sup> PSC respectivamente.



**Gráfico 4** - Curvas de parasitemia referentes à 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC, do isolado Be-78C, inoculado em grupos de camundongos não tratados.

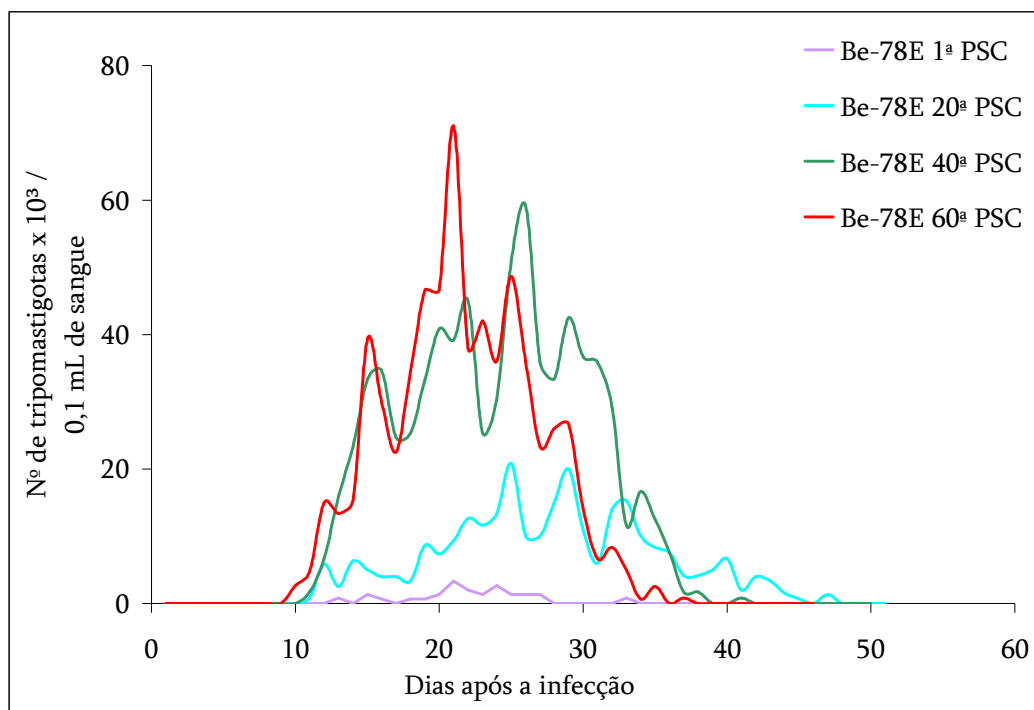
No Gráfico 5 estão representadas as curvas de parasitemia realizadas em grupos não tratados de camundongos inoculados com  $5,0 \times 10^3$  tripomastigotas sanguíneas provenientes da 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC do isolado Be-78D. As taxas de infectividade foram de 93,7% (15/16) na 40<sup>a</sup> e 100% (16/16) nas demais. Os PPPs ocorreram entre o sétimo e o nono dia após a infecção e os PP oscilaram entre 18 e 26 dias não se observando relação entre o aumento das PSCs e o aumento do PP.

Os níveis de parasitemia foram muito inferiores aos apresentados pela cepa parental Be-78. Foram observados vários picos de parasitemia nas diferentes PSCs e um aumento na intensidade do pico máximo de parasitemia com o avanço das PSCs. Os dias e as intensidades dos picos máximos de parasitemia na 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC ocorreram, respectivamente, nos 14<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias de infecção, com as contagens médias de  $4,2 \times 10^3$ ,  $1,5 \times 10^4$ ,  $1,7 \times 10^4$  e  $2,4 \times 10^4$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue respectivamente. As taxas de mortalidade observadas durante 120 dias foram de 16,6% (1/6) na 1<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> PSC, 0% (0/6) na 40<sup>a</sup> PSC e 50% (3/6) na 60<sup>a</sup> PSC.



**Gráfico 5** - Curvas de parasitemia referentes à 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC, do isolado Be-78D, inoculado em grupos de camundongos não tratados.

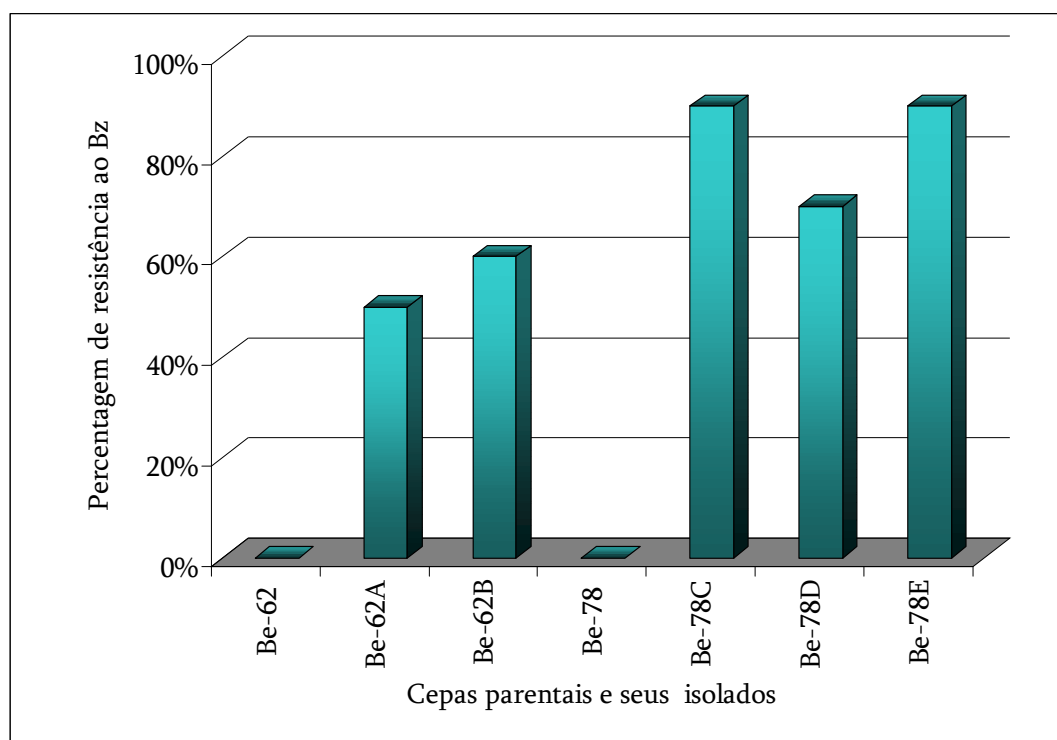
No Gráfico 6 estão representadas as curvas de parasitemia realizadas em grupos não tratados de camundongos inoculados com  $5,0 \times 10^3$  tripomastigotas sanguíneas provenientes da 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC do isolado Be-78E. Foram observadas 100% (16/16) de infectividade em todas as PSCs, exceto na 20<sup>a</sup> PSC na qual foi detectado 93,7% (15/16) de infectividade. Observaram-se oscilações entre nove a 12 dias nos PPPs e entre 21 a 37 dias nos PPs, com picos de parasitemia pouco definidos e um nítido aumento na intensidade destes à medida que as PSCs progrediam. Notou-se uma tendência de retorno ao perfil original (Be-78 parental) com o aumento das PSCs. Os dias e as intensidades dos picos máximos de parasitemia na 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC ocorreram, respectivamente, nos 21<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup>, 26<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de infecção, com as contagens médias de  $3,3 \times 10^3$ ,  $2,1 \times 10^4$ ,  $5,9 \times 10^4$  e  $7,1 \times 10^4$  tripomastigotas/0,1 mL de sangue respectivamente. Todos os camundongos (6/6) sobreviveram aos 120 dias de avaliação.



**Gráfico 6** - Curvas de parasitemia referentes à 1<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC, do isolado Be-78E, inoculado em grupos de camundongos não tratados.

## 4.2 Determinação da susceptibilidade ao benznidazol

Após o isolamento das diferentes populações do *T. cruzi* de cães cronicamente infectados, foi determinada a percentagem de resistência ao Bz de cada uma das populações. As percentagens de resistência ao Bz *in vivo*, das populações isoladas, comparativamente às cepas parentais (100% sensíveis ao Bz) estão representadas no Gráfico 7. Os isolados Be-62A e Be-62B apresentaram após uma 1<sup>a</sup> PSC 50% e 60% de resistência ao Bz respectivamente. Os isolados Be-78C, Be-78D e Be-78E apresentaram, respectivamente, 90%, 70% e 90% de resistência ao Bz na 1<sup>a</sup> PSC.



**Gráfico 7** – Percentagens de resistência ao Bz apresentadas pelas cepas parentais Be-62 e Be-78 do *T. cruzi* e os seus respectivos isolados, numa primeira passagem sanguínea em camundongos.

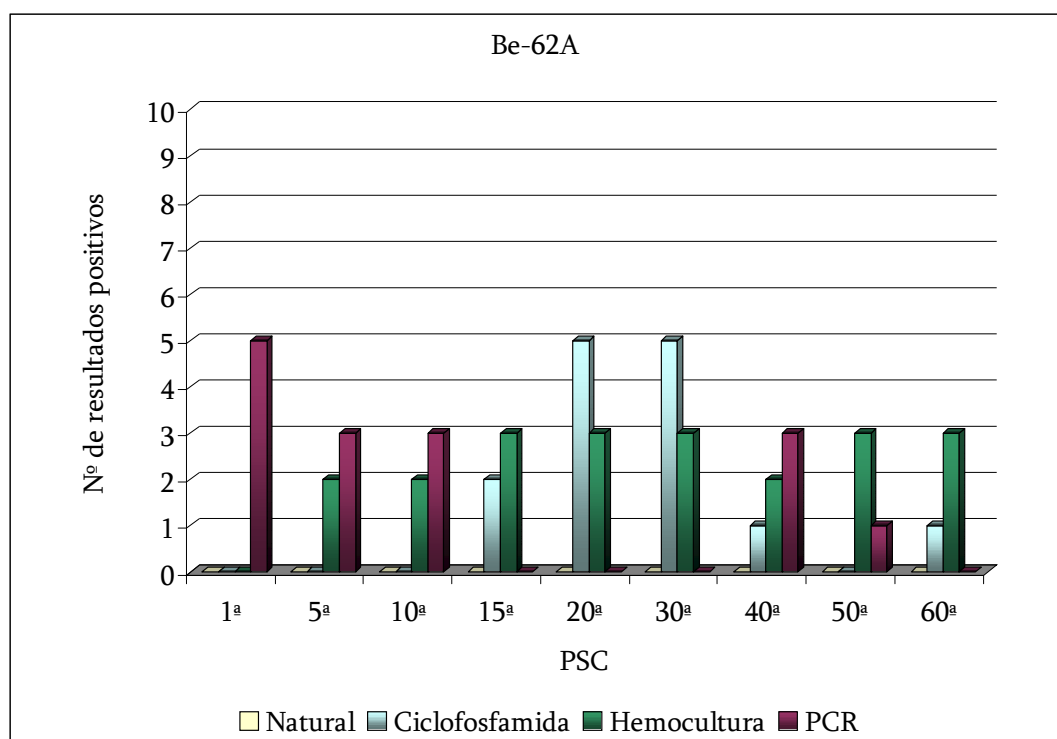
Todos os isolados que apresentaram resistência ao Bz passaram a ser mantidos em sucessivas PSCs, sendo verificada, a cada cinco PSCs (da 1<sup>a</sup> à 20<sup>a</sup> PSC) ou a cada 10 PSCs (da 20<sup>a</sup> à 60<sup>a</sup> PSC), a percentagem de susceptibilidade/resistência ao Bz.

Nos Gráficos 8, 9, 10, 11 e 12 estão representados quatro diferentes métodos parasitológicos utilizados para o controle de cura após o tratamento dos camundongos com Bz:

1. Exame de sangue a fresco, para avaliar a reativação natural da parasitemia, realizado a partir do 15<sup>o</sup> dia após o tratamento até o 25<sup>o</sup> dia;
2. Exame de sangue a fresco e administração do imunossupressor ciclofosfamida a partir do 25<sup>o</sup> dia após o tratamento (apenas nos animais que apresentaram resultados negativos através do método de controle de cura 1);
3. Coleta de sangue 35 dias após o tratamento para a realização da Hc. Foram representados nos gráficos apenas os resultados positivos da Hc diferentes daqueles observados através dos métodos de controle de cura 1 e 2.
4. Coleta de sangue 30 dias após o tratamento para a realização da PCR. Os resultados da PCR referem-se aos camundongos que apresentaram resultados negativos através dos métodos de controle de cura 1, 2 e 3.

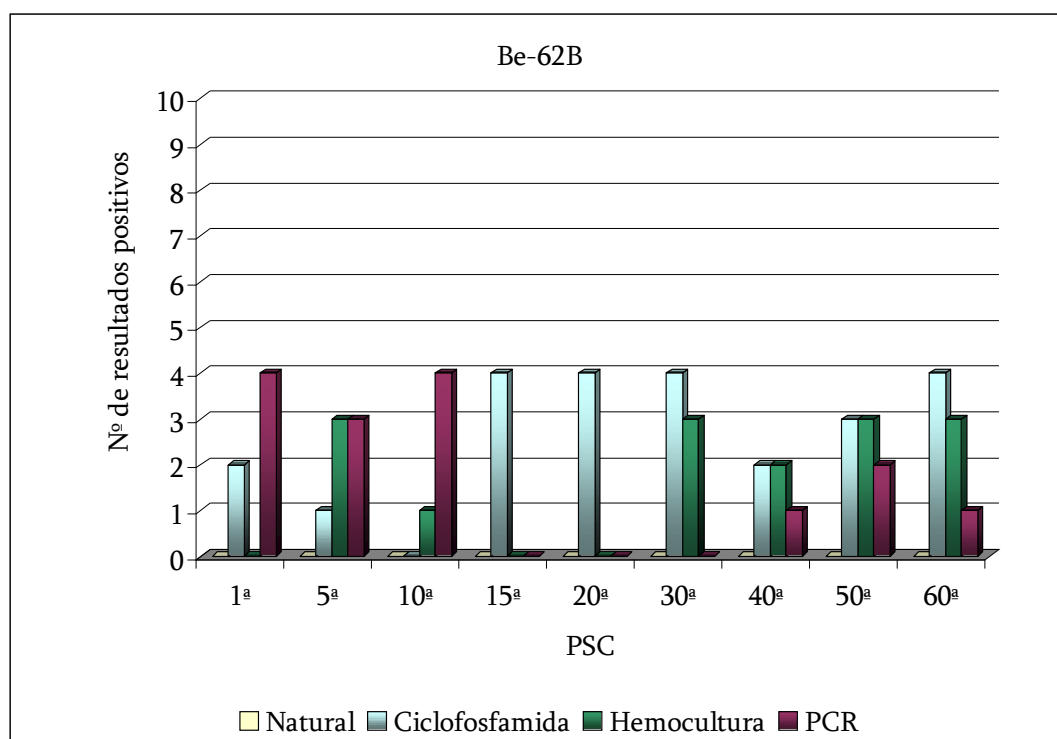
As cepas parentais Be-62 e Be-78 demonstraram, através dos métodos de controle de cura 1, 2 e 3 citados acima, 100% de sensibilidade ao Bz.

No Gráfico 8 estão apresentados os resultados dos testes utilizados no controle de cura dos animais infectados com parasitos provenientes das diferentes PSCs do isolado Be-62A. Não foi observada a reativação natural da parasitemia em nenhuma PSC. O número de animais que apresentaram reativação da parasitemia após a imunossupressão com ciclofosfamida foi um na 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC, dois na 15<sup>a</sup> PSC, e cinco na 20<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> PSC. Através da Hc foram observados mais dois camundongos não curados, na 5<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> PSC, e outros três camundongos na 15<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup>, 50<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC. Na 1<sup>a</sup> PSC, apenas a PCR foi capaz de detectar parasitos no sangue dos camundongos, observando-se um total de cinco animais com resultados positivos. Foram observados outros três animais com resultados de PCR positivos na 5<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> PSC e mais um resultado positivo na 50<sup>a</sup> PSC, mostrando a maior sensibilidade da PCR em detectar a falha terapêutica nesta população do *T. cruzi*.



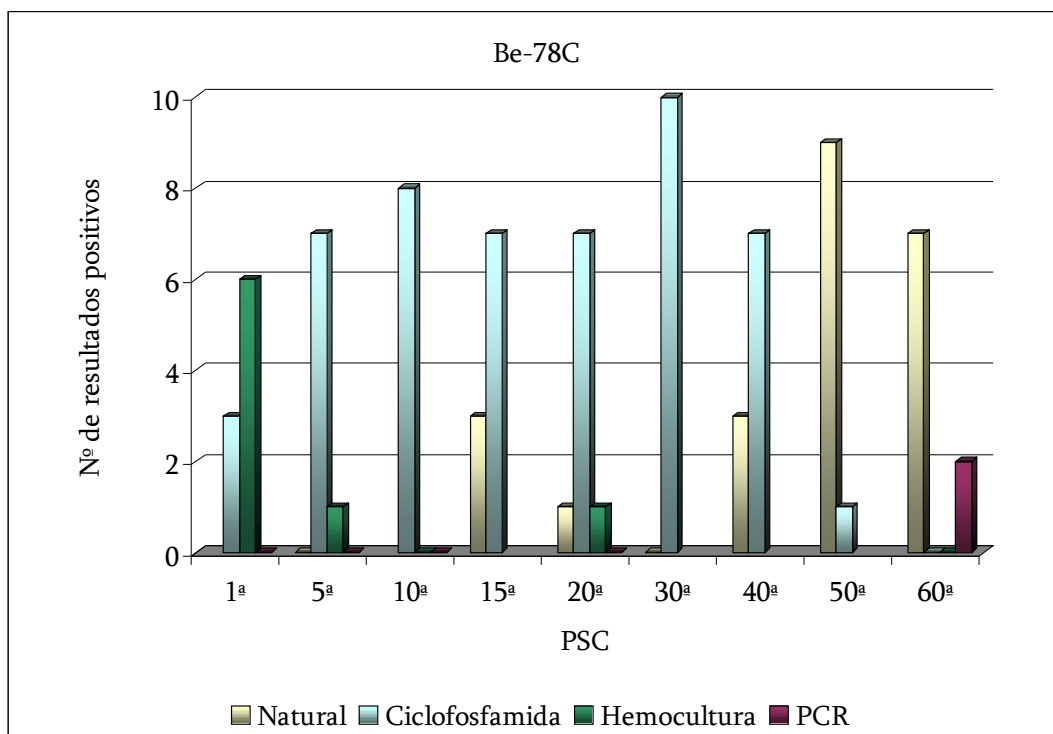
**Gráfico 8** - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-62A através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR).

O Gráfico 9 representa os resultados do controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-62B. Não foi observada a reativação natural da parasitemia em nenhuma PSC. A imunossupressão permitiu a observação de um animal com parasitemia positiva na 5ª PSC, dois na 1ª e 40ª PSC, três na 50ª PSC e quatro na 15ª, 20ª, 30ª e 60ª PSC. Os resultados da Hc mostraram um camundongo não curado na 10ª PSC, outros dois na 40ª PSC e outros três na 5ª, 30ª, 50ª e 60ª PSC. A PCR adicionou um resultado positivo na 40ª e 60ª PSC, dois na 50ª PSC, três na 5ª PSC e quatro na 1ª e 10ª PSC.



**Gráfico 9** - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-62B através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR).

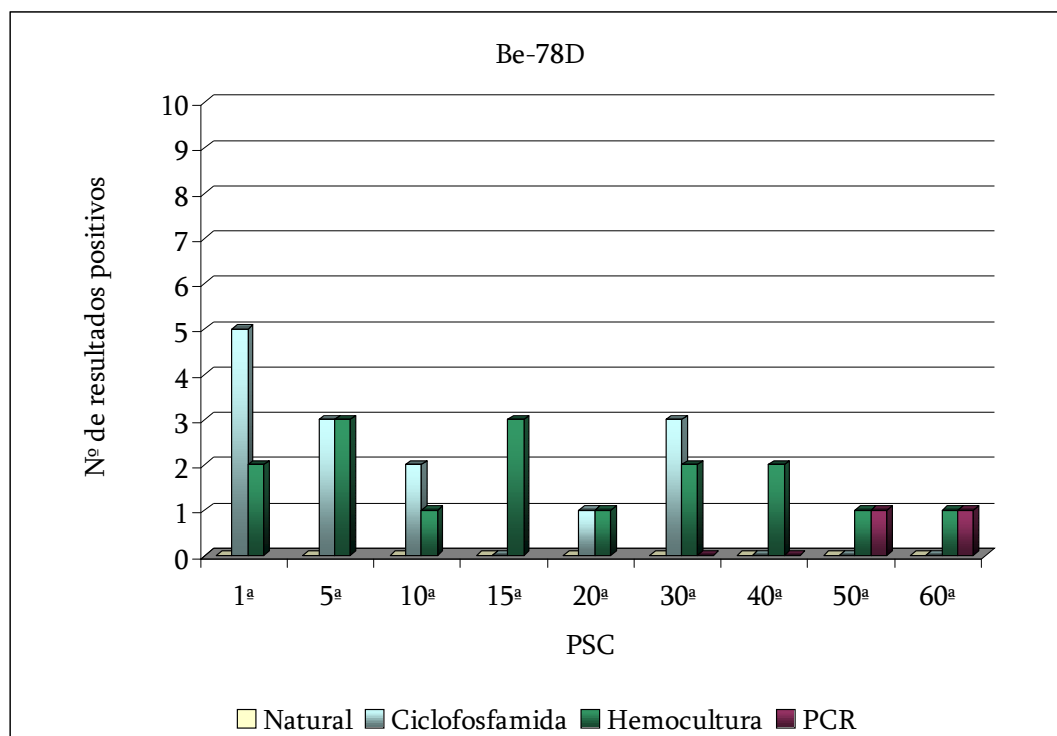
O Gráfico 10 representa os resultados do controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-78C. A reativação natural da parasitemia foi observada em um, três, três, sete e nove animais inoculados com parasitos provenientes da 20<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup>, 60<sup>a</sup> e 50<sup>a</sup> PSC respectivamente. Através da imunossupressão foi observada reativação da parasitemia em um animal na 50<sup>a</sup> PSC, em três na 1<sup>a</sup> PSC, em outros sete na 5<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> PSC, em oito na 10<sup>a</sup> PSC e em 10 na 30<sup>a</sup> PSC. Os resultados da Hc demonstraram mais um camundongo não curado na 5<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> PSC e em outros seis animais na 1<sup>a</sup> PSC. Os resultados da PCR demonstraram mais dois animais não curados na 60<sup>a</sup> PSC.



**Gráfico 10** - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-78C através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR).

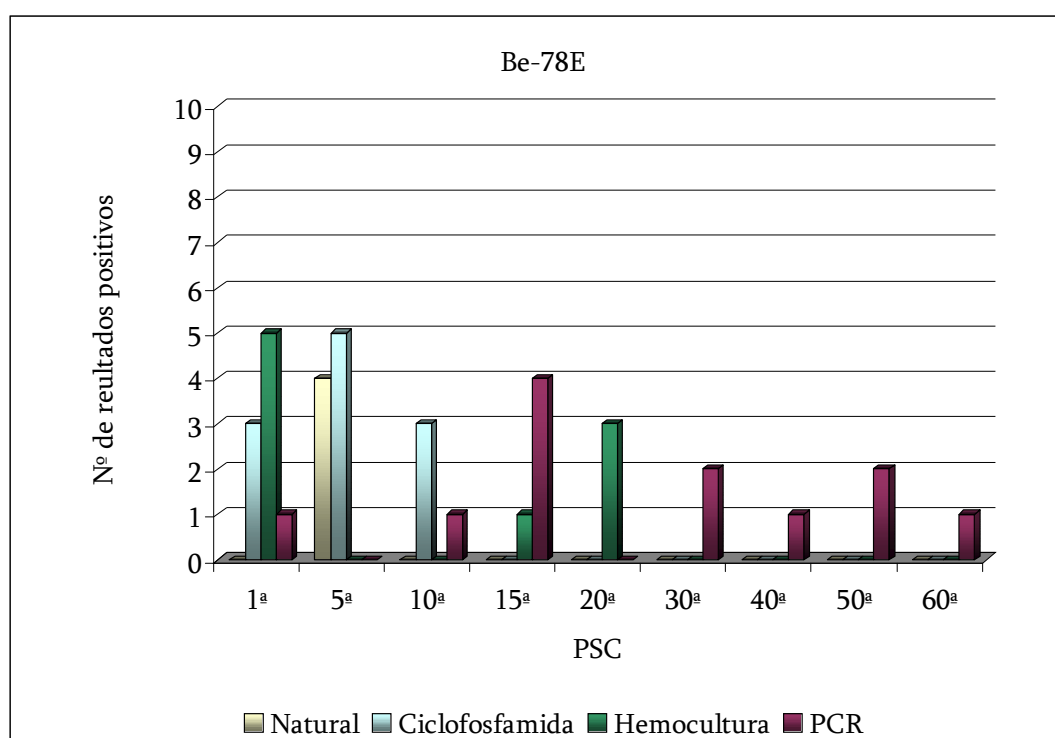


O Gráfico 11 representa os resultados do controle de cura realizado nos camundongos infectados com tripomastigotas sanguíneos provenientes das diferentes PSCs do isolado Be-78D. Não foi observada a reativação natural da parasitemia em nenhum camundongo. A imunossupressão foi eficaz em induzir a reativação da parasitemia após o tratamento específico em um animal na 20<sup>a</sup> PSC, dois na 10<sup>a</sup> PSC, três na 5<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> PSC e cinco na 1<sup>a</sup> PSC. Através da Hc foi observada resistência ao Bz em mais um animal na 10<sup>a</sup>, 20<sup>a</sup>, 50<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC, em outros dois na 1<sup>a</sup>, 30<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> PSC, e em três na 5<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> PSC. Os resultados da PCR demonstraram resistência ao Bz apenas em mais um animal na 50<sup>a</sup> e na 60<sup>a</sup> PSC.



**Gráfico 11** - Controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-78D através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR).

No Gráfico 12 estão representados os resultados do controle de cura realizado nas diferentes PSCs do isolado Be-78E. Somente nos animais inoculados com parasitos provenientes da 5<sup>a</sup> PSC foi observada a reativação natural da parasitemia (quatro animais). Através da imunossupressão observou-se reativação da parasitemia em três animais na 1<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> PSC e em cinco animais na 5<sup>a</sup> PSC. Com a Hc foi observado resistência ao Bz em um camundongo na 15<sup>a</sup> PSC, em três na 20<sup>a</sup> PSC e em cinco na 1<sup>a</sup> PSC. A PCR demonstrou resultado positivo em mais um animal na 1<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 40<sup>a</sup> e 60<sup>a</sup> PSC, em dois na 30<sup>a</sup> e 50<sup>a</sup> PSC e em outros quatro animais na 15<sup>a</sup> PSC.



**Gráfico 12** - Controle de cura realizado nas diferentes PSC do isolado Be-78E através de quatro diferentes métodos de detecção de parasitos (exame de sangue a fresco, exame de sangue após imunossupressão com ciclofosfamida, hemocultura e PCR).

Os resultados apresentados acima demonstram que a associação dos métodos parasitológicos utilizados para o diagnóstico dos camundongos tratados com Bz foram eficientes para a determinação da cura parasitológica. Por outro lado, a ELISA realizada em amostras de soro coletadas no primeiro e no sexto mês após o tratamento não contribuiu, na maioria das vezes, para definição da cura terapêutica.

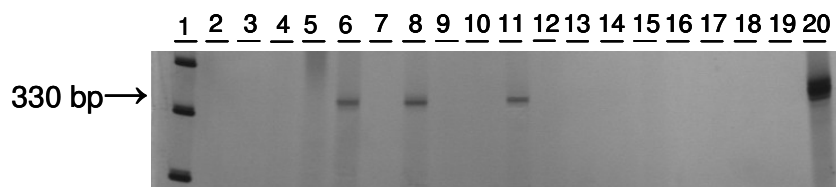
A Tabela 2 apresenta os resultados positivos da sorologia realizada nos camundongos tratados. Nesta tabela estão apresentados os resultados positivos dos soros coletados seis meses após o tratamento (6 MAT) comparativamente aos resultados positivos observados com a associação de quatro métodos parasitológicos, nos grupos de 10 camundongos tratados de cada experimento. Um considerável número de animais, com resultados parasitológicos negativos, continuaram apresentando anticorpos específicos anti-*T. cruzi* seis meses após a quimioterapia.

**Tabela 2** - Resultados positivos da sorologia (6 MAT) em relação aos resultados parasitológicos positivos (1 MAT), referentes aos grupos de 10 camundongos tratados em cada experimento.

<b>Resultados sorológicos positivos / resultados parasitológicos positivos</b>									
PSC Cepas	1 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>
<b>Be-62A</b>	6/5	8/5	6/5	8/5	5/8*	6/8*	9/6	7/4	6/4
<b>Be-62B</b>	2/6*	7/7	5/5	4/4	7/4	7/7	6/5	6/8*	7/8*
<b>Be-78C</b>	4/9*	5/8*	2/8*	3/10*	1/9*	2/10*	2/10*	8/10*	8/9*
<b>Be-78D</b>	6/7*	0/6*	0/4*	7/4	5/2	5/5	6/2	6/2	6/2
<b>Be-78E</b>	8/9	9/9	7/4	7/5	6/3	5/2	5/1	5/2	5/1

\* Todos os valores marcados, os quais representam resultados sorológicos positivos inferiores aos parasitológicos, referem-se a grupos de camundongos que não sobreviveram 6 MAT. Nesses casos, foram realizadas as análises da PCR independente dos resultados obtidos com os soros coletados 1 MAT. É importante ressaltar que no período da coleta de sangue para a realização da PCR não foi observada mortalidade entre os animais tratados.

A Figura 2 ilustra um gel de poliacrilamida 6%, revelado pela prata, obtido após a eletroforese dos produtos de amplificação, por PCR, das regiões de ~330 pb dos minicírculos do kDNA do *T. cruzi*, encontrado no sangue de animais tratados e não curados. Observamos três resultados positivos referentes a animais inoculados com tripomastigotas sanguíneos provenientes da 10<sup>a</sup> PSC do isolado Be-62A.

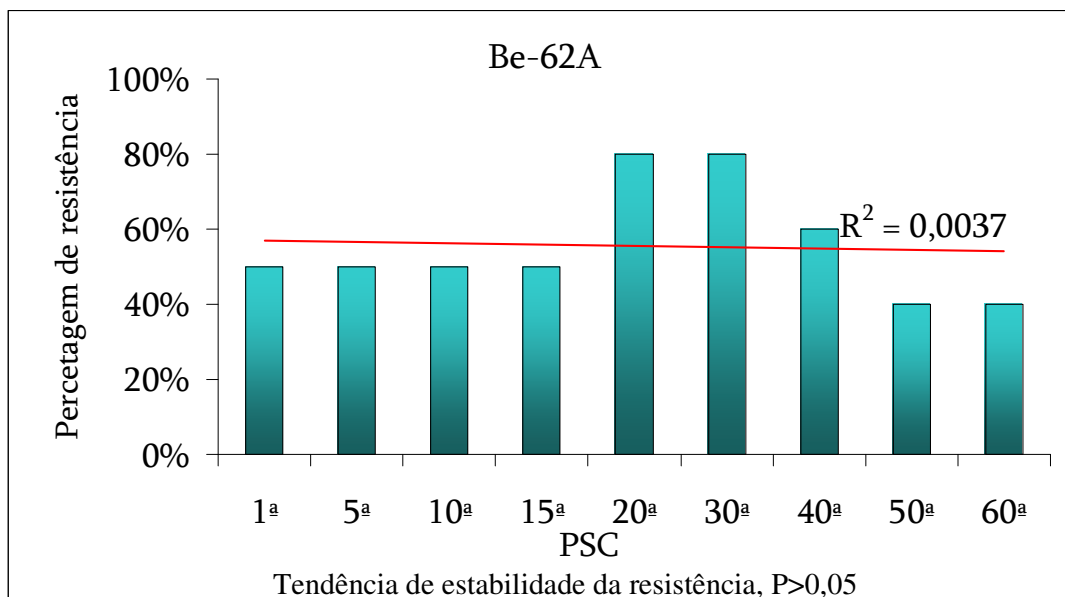


**Figura 2** – Diagnóstico com gel de poliacrilamida 6%, obtido após a eletroforese dos produtos de amplificação, por PCR, das regiões de ~330 pb dos minicírculos do kDNA do *T. cruzi*, encontrado no sangue de animais tratados e não curados. A seta indica o produto de amplificação de 330 pb.

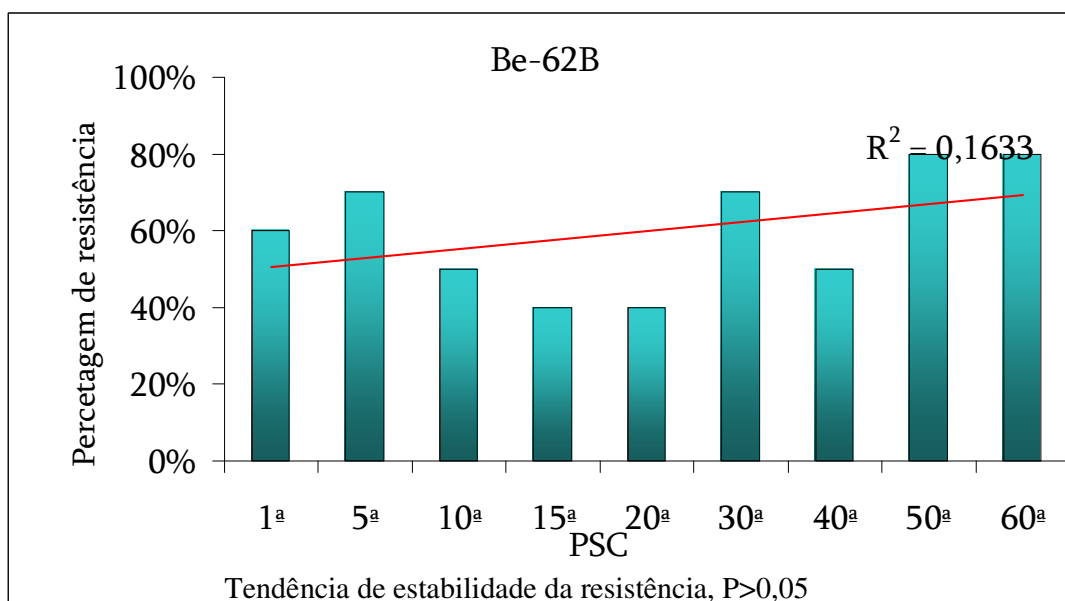
1: padrão de peso molecular (100 pb); 2: branco (ausência de DNA); 3: controle negativo; 4-19: amostras de sangue de animais coletadas após a quimioterapia; 20: controle positivo.

A avaliação dos resultados de controle de cura descritos acima, obtidos a partir da manutenção daquelas populações (isoladas de cães cronicamente infectados) em sucessivas PSCs (durante a infecção aguda), permitiu a observação de alterações no fenótipo de susceptibilidade/resistência ao fármaco. De um modo geral, duas tendências foram observadas:

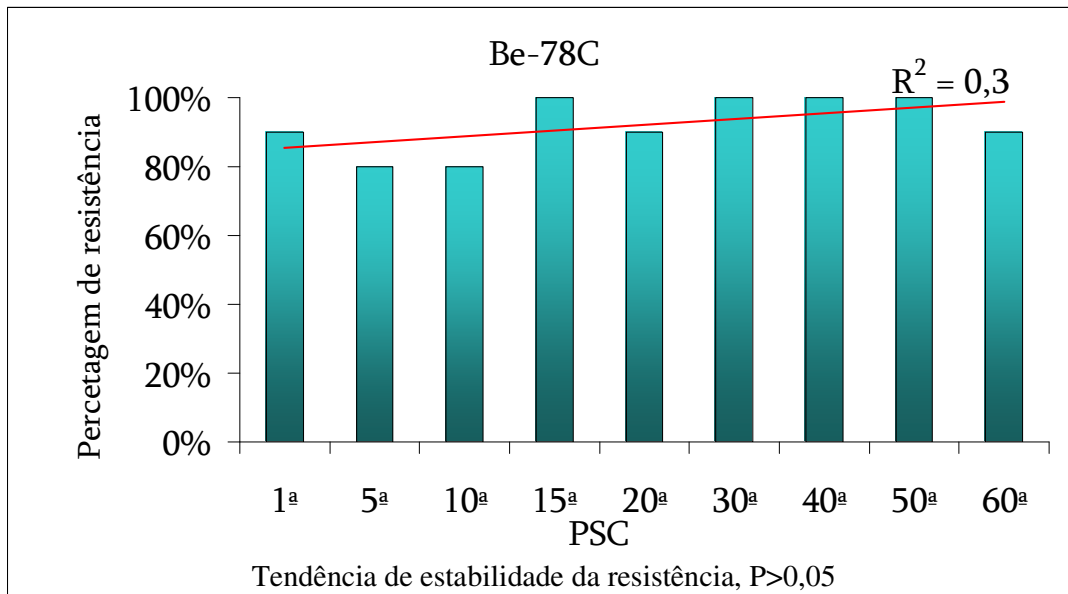
1. Estabilidade no grau de resistência ao Bz nas populações Be-62A (50 a 40% em 60 PSC), Be-62B (60 a 80% em 60 PSC) e Be-78C (90 a 90% em 60 PSC), (Gráficos 13, 14, e 15 respectivamente);
2. Redução no grau de resistência ao Bz nas populações Be-78 D (70 a 20% em 60 PSC) e Be-78E (90 a 10% em 60 PSC), (Gráficos 16 e 17 respectivamente).



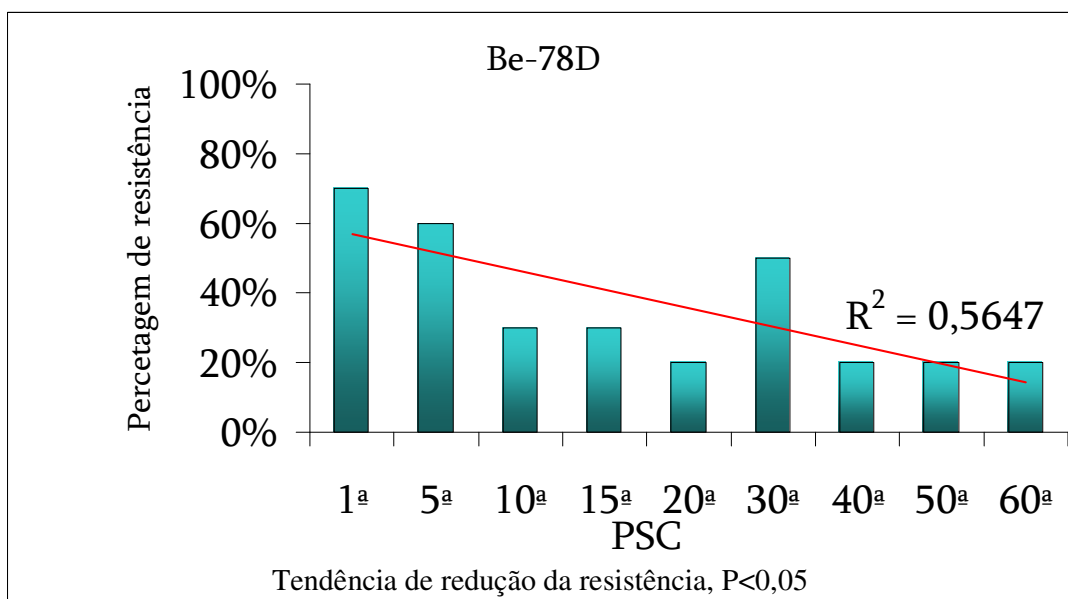
**Gráfico 13** - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-62A do *T. cruzi*, após o seu isolamento do cão (1) cronicamente infectado com a cepa parental Be-62 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs.



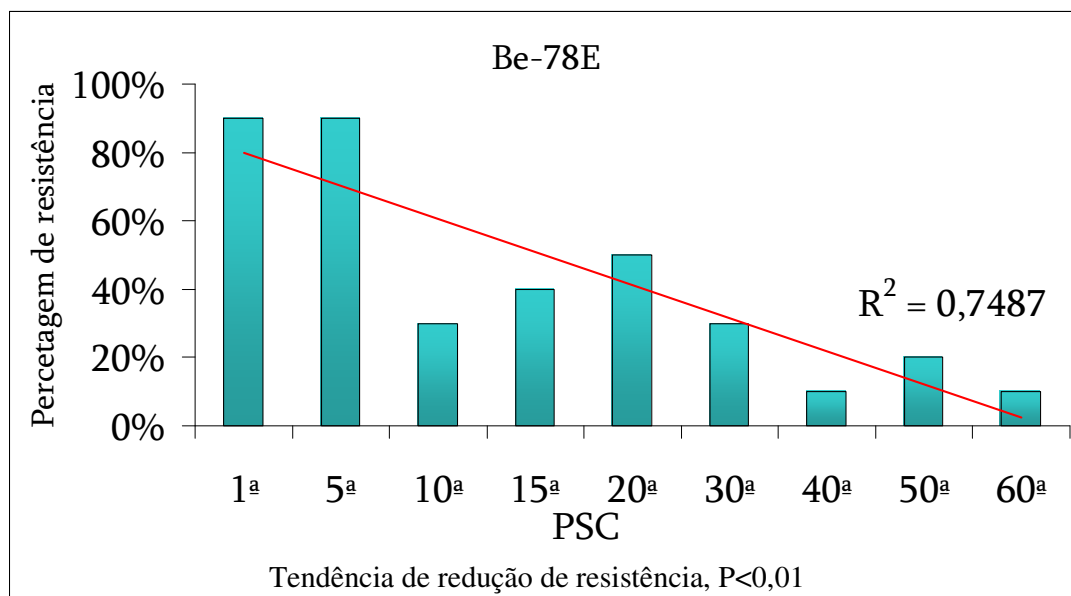
**Gráfico 14** - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-62B do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (2) cronicamente infectado com a cepa parental Be-62 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs.



**Gráfico 15** - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-78C do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (3) cronicamente infectado com a cepa parental Be-78 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs.



**Gráfico 16** - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-78D do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (4) cronicamente infectado com a cepa parental Be-78 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs.



**Gráfico 17** - Percentual de resistência ao Bz apresentado pelo isolado Be-78E do *T. cruzi*, após o isolamento do cão (5) cronicamente infectado com a cepa parental Be-78 (sensível ao Bz) e durante a sua manutenção em sucessivas PSCs.

## **5. DISCUSSÃO**



A existência de variabilidade biológica e genética em populações do *T. cruzi* tem sido demonstrada por diferentes autores (MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988; MURTA & ROMANHA, 1999; TOLEDO e cols, 2002). Mais recentemente, Veloso e cols (2005) demonstraram alterações nos padrões biológicos e genéticos de populações do *T. cruzi* isoladas de cães, infectados por vários anos com a cepa parental Be-78. Anteriormente, estes mesmos autores haviam observado a ocorrência de indução natural de resistência ao Bz em populações do *T. cruzi* isoladas de cães com infecção crônica. Os cães, nunca submetidos ao tratamento específico, haviam sido infectados com cepas sensíveis ao Bz e a indução de resistência, das populações isoladas, observada em camundongos após 25 passagens sanguíneas. (VELOSO e cols., 2001). Os autores sugeriram que a manutenção do parasito durante longo período no hospedeiro vertebrado (dois a sete anos) poderia induzir uma alteração no grau de resistência ao tratamento com Bz.

No presente trabalho foi avaliada a susceptibilidade ao Bz, em populações do *T. cruzi* após o isolamento de cães (1<sup>a</sup> PSC) infectados com as cepas Be-62 e Be-78 do *T. cruzi*. Essas populações foram, a seguir, mantidas em sucessivas PSCs para investigar se este tipo de manutenção (até a 60<sup>a</sup> PSC) induziria novas alterações no nível de resistência ao Bz e em outros parâmetros biológicos, tais como períodos pré-patente e patente, níveis de parasitemia, perfil da curva de parasitemia e taxa de mortalidade.

De acordo com os parâmetros biológicos avaliados, as populações isoladas de cães apresentaram diferenças marcantes em relação às cepas parentais. Na maioria das vezes, os níveis de parasitemia apresentados pelos camundongos inoculados com as populações isoladas de cães infectados com as cepas parentais Be-62 e Be-78 foram inferiores aos apresentados pelos camundongos infectados diretamente com as cepas parentais. Também foi observada redução da taxa de mortalidade entre os animais infectados com os isolados Be-62A e Be-62B, quando comparados aos infectados com a cepa parental. Outros autores também demonstraram a diminuição da virulência de populações do *T. cruzi* isoladas do homem e de cães com infecções crônicas (LANA & CHIARI, 1986; VELOSO e cols, 2005). Esses dados sugerem que a permanência do parasito num hospedeiro vertebrado, com infecção crônica, pode resultar em diminuição de virulência para camundongos.

Em 1986, Lana e Chiari observaram menor virulência da cepa Be-78, em relação à cepa Be-62 em experimentos utilizando camundongos albinos e *C<sub>3</sub>H* isogênicos. Os animais inoculados com a cepa Be-78 sobreviveram à fase aguda da infecção, enquanto todos os animais inoculados com a cepa Be-62 apresentaram mortalidade até o 13<sup>o</sup> dia de infecção. Esses autores relataram uma ascensão gradual da parasitemia ao longo de 25 PSCs da cepa Be-78, e o predomínio de formas sangüíneas largas do parasito. A cepa Be-62 sempre apresentou características bem definidas, como o predomínio de formas delgadas ao longo de toda a infecção (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER 1965) e curvas com altos níveis de parasitemia (BRENER, 1965).

Os experimentos realizados neste estudo com as cepas parentais Be-62 e Be-78, demonstraram que ambas as cepas conservaram os mesmos padrões de comportamento, apresentados acima, no decorrer de vários anos de manutenção, em PSCs e em criopreservação em nitrogênio líquido. Esse fato sugere que as cepas do *T. cruzi* apresentam estabilidade das suas características biológicas quando mantidas em laboratório sob condições padronizadas (espécie de hospedeiro, inóculo, via de inoculação, intervalo de repiques, etc) (MELO & BRENER, 1978; MCDANIEL & DVORAK, 1993). Campos e Andrade (1996) relataram a estabilidade das características biológicas da cepa 21 SF, após 15 anos de manutenção através de sucessivas PSCs. Entretanto, Brener e Chiari (1963) observaram alterações da virulência (aumento dos níveis de parasitemia) nas cepas Berenice 62 e CI após cerca de 25 PSCs e posterior estabilidade das suas características biológicas.

Resultados semelhantes foram observados neste estudo. Notou-se uma tendência de elevação da intensidade da parasitemia, à medida que se aumentava o número das PSCs. Outros autores também demonstraram que a manutenção do parasito em sucessivas PSCs parece contribuir para o aumento da sua virulência (BRENER e cols., 1974; CARNEIRO e cols., 1991)

Por outro lado, nos isolados Be-62A e Be-62B, apesar de ter sido observada, após o isolamento dos cães, a redução dos níveis de parasitemia e da mortalidade, o perfil das curvas de parasitemia manteve-se semelhante ao da cepa parental, em relação aos PPPs (em torno de sete dias) e ao dia do 1<sup>o</sup> pico de parasitemia (em torno do 11<sup>o</sup> dia de infecção).

De forma semelhante, foram observadas diferenças no comportamento biológico da cepa Be-78 parental e dos seus isolados. Entretanto, foi detectado, neste caso, variação nos parâmetros biológicos avaliados entre os diferentes isolados, e também no decorrer das diferentes PSCs. O isolado Be-78C apresentou níveis de parasitemia muito superior à cepa parental Be-78, com exceção dos experimentos realizados com parasitos provenientes da 1ª PSC. Já o isolado Be-78D apresentou níveis de parasitemia muito inferiores aos apresentados pela cepa parental, porém demonstrou um nítido aumento dos níveis de parasitemia ao longo da sua manutenção em PSCs. O isolado Be-78E também apresentou aumento dos níveis de parasitemia ao longo de sua manutenção em PSCs, observando-se, inclusive, uma tendência de retorno ao perfil da curva de parasitemia apresentada pela cepa parental. O PPP apresentou pouca variação, mas o PP, o nível e o dia do pico máximo de parasitemia oscilaram bastante entre os isolados e a cepa parental.

Variações nas características das cepas do *T. cruzi*, mantidas em PSCs, parecem ser mais propensas a ocorrer num primeiro período após a modificação da forma de manutenção do parasito. No entanto, depois de um certo tempo (mais de 60 PSCs em alguns casos), as cepas demonstram alcançar uma nova estabilidade das suas características, provavelmente, resultante de um novo equilíbrio populacional.

Brener e Chiari (1965) observaram que as formas sangüíneas da cepa Be-62, quando isoladas por Hc, em meio LIT, entre os dias sete e 10 após a infecção, transformavam-se rapidamente em epimastigotas, sendo as formas amastigotas raramente encontradas. Decorridos 10 dias do isolamento, observavam-se praticamente apenas epimastigotas livres e rosáceas típicas na cultura. Por outro lado, quando a cepa Be-78 era isolada em meio LIT, grandes massas de amastigotas com raros epimastigotas eram observadas. Ao contrário do observado com a cepa Be-62, a cepa Be-78 demonstrava uma baixa capacidade de multiplicação em cultura (LANA, 1981) e uma taxa de diferenciação superior à apresentada pela cepa Be-62 (LANA e cols., 1996).

Estas observações foram coerentes com as realizadas no presente trabalho, tanto para as cepas parentais quanto para os seus respectivos isolados provenientes de cães chagásicos crônicos. A cepa Be-62 e os isolados Be-62A e Be-62B sempre apresentaram predomínio de formas sangüíneas delgadas (dados não mostrados), ao

passo que a cepa Be-78 e os isolados Be-78C, Be-78D e Be-78E apresentaram predomínio de formas largas. Os isolados Be-78D e Be-78E, no entanto, demonstraram um discreto aumento do número de formas sanguíneas delgadas durante a sua manutenção em PSCs.

Apesar de ambas as cepas terem sido isoladas da mesma paciente, não se pode excluir a possibilidade de apresentarem diferenças em sua composição populacional, pois Berenice poderia ter se reinfectado no período entre 1962 e 1978. Não se pode excluir, ainda, a possibilidade da eliminação de populações do parasito durante a longa relação parasito-hospedeiro (uma população foi isolada 16 anos após a outra). Além disso, não se pode garantir que o xenodiagnóstico, método utilizado no isolamento das cepas, tenha obtido uma população representativa da população total de parasitos existente na paciente naqueles dois momentos.

Lana e cols. (1996) demonstraram claras diferenças entre as duas cepas, através das análises de esquizodema e de zimodema, sugerindo a ocorrência de populações heterogêneas do *T. cruzi* na infecção da paciente. Veloso e cols (2005) também demonstraram a heterogeneidade da cepa Be-78, observando dois grupos genéticos distintos, quando compararam a cepa parental com isolados obtidos de cães infectados cronicamente, utilizando as análises de RAPD e de isoenzimas. Curiosamente, os isolados do segundo grupo genético apresentaram uma reversão para o perfil genético da cepa parental após 25 PSCs. Estes resultados demonstram que, eventualmente, uma subpopulação do *T. cruzi* pode se tornar dominante em relação à outra, sendo a transição entre as subpopulações lenta e gradual. Provavelmente, os perfis genéticos diferentes, apresentados inicialmente por aqueles dois isolados, tenha resultado do predomínio de uma determinada população, mais adaptada, e com maior taxa de crescimento, no organismo do cão. Posteriormente, a manutenção do isolado em sucessivas PSCs permitiu um melhor desenvolvimento de outras populações, antes reprimida pelo sistema imune do cão. Dessa forma, poderia ocorrer, novamente, o mesmo equilíbrio populacional observado na cepa parental. Estas variações no perfil genético e no comportamento biológico do *T. cruzi* podem ser resultantes, também, da plasticidade genética observada no parasito. Polimorfismos em seqüências de minicírculos já foram evidenciados em experimentos realizados em camundongos infectados com população monoclonal do *T. cruzi* (PACHECO & BRITO, 1999).

Segundo McDaniel e Dvorak (1993), sob condições de estresse, ou pressões seletivas, cromossomos e minicírculos demonstram evidências de plasticidade genética em *T. cruzi* e *Leishmania*. Logo, apesar da propagação clonal se mostrar predominante nos ciclos de transmissão do *T. cruzi*, variações genéticas podem ocorrer nas cepas do parasito resultando em modificações de algumas propriedades biológicas, tal como resistência a quimioterápicos. Mudanças reversíveis no perfil de isoenzimas e na infectividade para camundongos já foram, também, observadas em experimentos onde clones da cepa Y foram mantidos em meios de diferentes composições, ou em PSCs (ALVES e cols., 1993).

É bastante difundida a idéia de que a dinâmica populacional do parasito, ou seja, o equilíbrio de diferentes clones, com características próprias (tropismo, taxa de crescimento, dentre outras) influencia no seu padrão de comportamento biológico. Franco e cols. (2003) observaram modificação da virulência dos clones JG e CL-Brener utilizados para a infecção mista em ratos. Ao que parece, as infecções de longa duração, num hospedeiro vertebrado, podem induzir alterações genótípicas, além de fenótípicas no *T. cruzi*, de maneira que os parasitos mais aptos a se desenvolverem nesse organismo hospedeiro se estabeleçam em maior proporção em detrimento de outros que passam a sobreviver em pequenas proporções, ou acabam, até mesmo, por se extinguirem.

Os dados do presente trabalho permitem sugerir que a permanência do *T. cruzi* num hospedeiro vertebrado, com infecção crônica, pode alterar, de forma diversa, o comportamento biológico de uma população do parasito induzindo, na maioria das vezes, diminuição da virulência. Por outro lado, a manutenção do parasito em sucessivas PSCs, parece contribuir para o aumento da sua virulência, e algumas vezes, como no caso do isolado Be-78E, pode permitir o retorno ao padrão de comportamento biológico apresentado pela cepa parental.

Os resultados da análise de susceptibilidade observados neste estudo demonstraram a ocorrência de alteração no nível de resistência ao fármaco nas populações do *T. cruzi* isoladas de cães com infecção de longa duração (2 a 10 anos de infecção). Curiosamente, a manutenção dessas populações do *T. cruzi* em um novo modelo experimental (o camundongo), durante a fase aguda da infecção, permitiu a observação de novas variações no fenótipo de susceptibilidade/resistência ao Bz.

Quando aqueles isolados passaram a ser mantido nesse novo modelo experimental, com repiques realizados a cada 15 dias e, portanto, expostos a uma resposta imunológica menos efetiva, novas alterações na dinâmica populacional de alguns dos isolados puderam ter ocorrido. Isso poderia, pelo menos teoricamente, resultar em modificações na resposta terapêutica de um determinado isolado do *T. cruzi*.

Os primeiros experimentos para a determinação da resistência ao fármaco foram realizados de cinco em cinco passagens sanguíneas porque se acreditava que as principais alterações no fenótipo de resistência ocorreriam inicialmente, quando as populações do *T. cruzi* passassem a ser mantidas em sucessivas PSCs. Esperava-se que as subpopulações sensíveis prevalecessem novamente, o que levaria os isolados a demonstrar um padrão fenotípico de resistência ao Bz semelhante ao apresentado pelas populações originais Be-62 e Be-78 do *T. cruzi*. Porém, isso não foi exatamente o observado, pois alguns isolados demonstraram retorno de sensibilidade ao fármaco, enquanto outros demonstraram estabilidade no grau de resistência, como é discutido abaixo.

Considerando a classificação de Filardi e Brener (1987), as populações isoladas de cães infectados com a cepa parental Be-78 mostraram-se resistentes ao Bz, enquanto as populações isoladas de cães infectados com a cepa parental Be-62 mostraram-se parcialmente resistentes. Entretanto, esses isolados, ao serem mantidos em camundongos, apresentaram alterações distintas no padrão de resistência ao fármaco. O isolado Be78C permaneceu resistente ao longo de 60 PSC, demonstrando estabilidade no fenótipo de resistência ao Bz. De forma semelhante, os isolados Be-62A e Be-62B demonstraram estabilidade no grau de resistência ao Bz apresentando, porém, resistência parcial, tanto no momento do isolamento, quanto ao longo da manutenção em camundongos. Por outro lado, os isolados Be-78D e Be-78E mostraram-se resistentes ao Bz, no momento do isolamento, passando a apresentar, no entanto, um perfil de sensibilidade no decorrer das PSCs. Estas observações poderiam ser explicadas por duas hipóteses não excludentes: (1) ocorrência de uma variação fenotípica para a resistência; (2) ocorrência de uma alteração genética em alguns parasitos, a qual contribuiria para uma melhor adaptação destes às pressões do organismo hospedeiro.

Coincidentemente, as alterações que levaram à maior adaptação do parasito ao organismo hospedeiro, também conferiram resistência ao fármaco. Já foi demonstrada a

participação da citocina IL-12 agindo sinergicamente com o Bz para a destruição do *T. cruzi* (MICHAILOWSKY e cols., 1998). Estes autores observaram *in vivo* e *in vitro* que cepas resistentes ao Bz, como a cepa Colombiana, por exemplo, são pobres indutoras da expressão de IL-12, por macrófagos, quando comparadas às cepas sensíveis (cepa CL) ou parcialmente resistentes (cepa Y) ao fármaco. Logo, não é tão coincidência o fato de que a pressão do sistema imune ao longo de anos tenha selecionado parasitos resistentes ao Bz. A observação de que a administração de Bz pode diminuir a síntese de nitritos e citocinas por macrófagos estimulados (REVELLI e cols., 1999) seria uma evidência de que esse fármaco age através de mecanismos afins. Para não haver excesso de radicais livres, o qual seria prejudicial também ao hospedeiro, o organismo parece sofrer imunorregulação.

Os dados obtidos permitem concluir que a infecção crônica de longa duração é capaz de induzir diferentes níveis de resistência ao Bz em populações do *T. cruzi* e que a resistência adquirida pode ser estável ou não quando estas populações passam a ser mantidas em sucessivas PSCs durante a fase aguda da infecção.

Correlação *in vivo* e *in vitro* entre a distância filogenética de clones do *T. cruzi* e a susceptibilidade ao Bz e ao Nf foram demonstradas por alguns autores (REVOLLO e cols., 1988; TOLEDO e cols., 2002). Andrade e cols. (1992) observaram 82% de concordância entre os resultados do controle de cura realizado após o tratamento de pacientes e camundongos infectados com as mesmas cepas. Por outro lado, Vilarreal e cols. (2004) não observaram correlação entre a distância genética e a susceptibilidade ao Bz em experimentos realizados *in vitro*.

As alterações no padrão de resistência ao Bz, observadas neste trabalho, poderiam estar relacionadas não apenas ao potencial genético de cada isolado do *T. cruzi*, mas também ao potencial genético de cada hospedeiro. As populações do *T. cruzi* foram isoladas de diferentes cães inoculados com as mesmas cepas parentais. Curiosamente, essas populações demonstraram diferentes alterações nas suas dinâmicas populacionais, evidenciadas pela variação dos percentuais de resistência ao Bz e da virulência para camundongos ao longo das PSCs. Portanto, essas observações permitem reforçar a hipótese de que o comportamento de uma população do *T. cruzi* seja diretamente influenciado pela interação com o seu hospedeiro. Guedes e cols (2002) demonstraram 100% de cura em cães inoculados com a cepa Y e tratados com Bz,

enquanto em camundongos esta cepa apresentava 47% de resistência (FILARDI & BRENER, 1987). Lana e cols. (1992) demonstraram que a cepa Be-78 apresentava maior virulência e patogenicidade para cães em relação à Be-62, enquanto que em camundongos a cepa Be-78 era menos virulenta.

Vários autores têm demonstrado a indução de resistência ao tratamento específico, *in vivo*, utilizando populações do *T. cruzi* parcialmente resistentes ao Bz (SILVA e cols., 1989; MURTA & ROMANHA, 1998). Nesse caso, o fármaco selecionaria os clones resistentes de uma população, eliminando os sensíveis, sendo que a resistência da cepa estaria condicionada à proporção de clones resistentes e sensíveis existentes na população de parasitos. Entretanto, os dados apresentados no presente trabalho mostram claramente a ocorrência de indução natural de resistência nas populações do *T. cruzi* isoladas de cães chagásicos crônicos. A indução foi dita natural porque não houve nenhuma pressão artificial, como a utilização de quimioterápicos, para selecionar as populações previamente resistentes. Além disso, os experimentos de quimioterapia, realizados nesse trabalho, em camundongos infectados com as cepas parentais, demonstraram 100% de sensibilidade dos parasitos ao Bz. Toledo e cols. (1995) utilizando camundongos infectados com ambas as cepas também observaram 100% (20/20) de sensibilidade destas ao Bz.

Estas observações, referentes à possibilidade da ocorrência natural de resistência ao Bz em populações do *T. cruzi* durante infecções de longa duração, poderiam explicar, pelo menos parcialmente, o grande percentual de falha terapêutica observado em chagásicos crônicos, quando comparado ao tratamento de crianças ou indivíduos chagásicos de fase aguda recente (CANÇADO, 1997). De forma semelhante, em modelos experimentais *in vivo*, infectados com o *T. cruzi*, a quimioterapia com Bz se mostra mais eficiente durante a fase aguda do que durante a fase crônica da infecção (ANDRADE e cols., 1996; FILARDI & BRENER, 1987).

Em relação ao controle de cura adotado neste trabalho foi avaliada, pela primeira vez, a utilização da imunossupressão com ciclofosfamida para monitorar a cura de camundongos após o tratamento com o Bz. O emprego desse método, com o objetivo de facilitar a reativação da parasitemia nos animais não curados, foi bastante satisfatório. A imunossupressão forneceu resultados rápidos, em relação à falha terapêutica, principalmente nos experimentos realizados com os isolados que



apresentaram maior percentagem de resistência ao Bz. Porém, nos experimentos em que os isolados apresentaram maior susceptibilidade ao fármaco, a confirmação da falha terapêutica através da Hc e da PCR foi primordial. É importante ressaltar que os resultados positivos observados através do exame de sangue a fresco após a imunossupressão foram muito valiosos, ao se considerar que pouparam trabalho e gastos, reduzindo o número de animais que seriam examinados pela Hc e PCR. Além disso, os resultados positivos obtidos após a imunossupressão eliminaram a possibilidade de resultados falso-negativos que, eventualmente, poderiam ocorrer com os outros métodos de diagnóstico.

Os resultados da sorologia foram utilizados para discriminar os animais que seriam investigados pela PCR. Os camundongos que apresentaram resultados da sorologia, realizada 6 MAT, positivos e discordantes dos resultados parasitológicos, foram submetidos à investigação da cura através da PCR. Os animais que não sobreviveram aos 6 MAT também foram submetidos à análise por PCR, independente do resultado sorológico obtido com as amostras coletadas 1 MAT. A ELISA utilizando conjugado para a IgG total, entretanto, apresentou resultados muito discordantes dos obtidos com os métodos parasitológicos. Rassi e Luquetti (1992), Andrade e cols. (1996) e Sosa-Estani e cols. (1998) admitem um longo período para a negativação da sorologia e mesmo baixos títulos de anticorpos como critério de cura. Andrade e cols. (1991) demonstraram resultados sorológicos persistentemente positivos em camundongos parasitologicamente curados. Estes achados podem ser correlacionados com o acúmulo de antígenos de *T. cruzi* em células dendríticas do baço. Contudo, a sorologia convencional pode reverter para resultados negativos muitos meses ou anos após o tratamento.

Dos métodos de controle de cura utilizados, a técnica de PCR mostrou-se a mais sensível para o diagnóstico dos camundongos tratados. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Miyamoto e cols (2006) que detectaram, com a PCR, 100% de positividade em camundongos infectados com clones de diferentes genótipos do *T. cruzi*. Em alguns casos apenas a PCR foi capaz de demonstrar a presença do parasito no sangue dos animais (1<sup>a</sup> PSC do isolado Be-62A e 30<sup>a</sup> à 60<sup>a</sup> PSC do isolado Be-78E). No caso do experimento realizado com parasitos provenientes da 1<sup>a</sup> PSC do isolado Be-62A, pode-se pensar que a proporção de parasitos resistentes, induzidas pelo organismo

do cão, foi muito pequena. Entretanto, com as sucessivas PSCs, a proporção desses parasitos, em relação aos sensíveis, foi sendo alterada, de maneira que outros métodos de diagnóstico, menos acurados, conseguiram detectar facilmente as falhas terapêuticas. No caso do isolado Be-78E, nota-se o predomínio de parasitos resistentes, facilmente detectados nas primeiras PSCs quando ainda era recente o seu isolamento do cão. A partir da 30<sup>a</sup> PSC, no entanto, a proporção de parasitos resistentes no isolado se tornou muito baixa, já que apenas a PCR detectou resultados positivos em pequeno percentual dos animais.

É importante ressaltar que os métodos parasitológicos comentados acima serviram como ferramentas de diagnóstico, que se complementaram, para o resultado do controle de cura final. Nesse sentido, não houve a preocupação de se comparar a eficiência dos métodos entre si, mas sim de se assegurar um controle de cura bastante acurado.

Os resultados da avaliação do controle de cura mostram que a associação da imunossupressão, utilizando a ciclofosfamida, com a PCR poderia ser utilizada para a definição da cura terapêutica em estudos experimentais, realizados em camundongos, fornecendo resultados mais rápidos e econômicos, uma vez que a PCR poderia ser utilizada apenas no diagnóstico dos animais que não apresentassem reativação da parasitemia após a imunossupressão.

É importante destacar que há outros materiais biológicos obtidos ao longo deste trabalho que ainda não foram analisados. Esses materiais biológicos serão importantes para a realização de estudos posteriores, principalmente aqueles relacionados à (1) investigação dos genes envolvidos na resistência do *T. cruzi* ao fármaco, bem como a possibilidade de identificação de marcadores moleculares para a resistência ou sensibilidade ao Bz; (2) análise da expressão gênica entre populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao Bz, neste caso utilizando as populações isoladas de cães (resistentes) em comparação com as cepas parentais (sensíveis).

## **6.CONCLUSÕES**

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1. A permanência de uma cepa do *T. cruzi* num hospedeiro vertebrado, com infecção crônica, pode alterar, de forma diversa, o comportamento biológico da população de parasitos induzindo, na maioria das vezes, diminuição da virulência.
2. Variações nas características das cepas do *T. cruzi* parecem ser mais propensas a ocorrer num primeiro período após a modificação da forma de manutenção do parasito, observando-se, após um certo tempo de nova manutenção em condições padronizadas, uma estabilização das suas características.
3. A manutenção de cepas do *T. cruzi* em passagens sangüíneas em camundongos parece contribuir para o aumento da virulência das populações do parasito.
4. A infecção crônica de longa duração pode induzir diferentes níveis de resistência ao Bz em populações do *T. cruzi*, em decorrência da relação parasito/hospedeiro estabelecida.
5. A resistência adquirida pelas populações do *T. cruzi*, numa infecção crônica, pode ser estável ou não, quando elas são mantidas em camundongos durante a fase aguda da infecção.
6. A definição da cura terapêutica em camundongos pode ser realizada de forma mais rápida ao se associar a imunossupressão, utilizando a ciclofosfamida, com a PCR.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALVES, A.M.B.; TANURI, A.; ALMEIDA, D.F.; VON GRUGER, W.M.A. Reversible changes in the electrophoretic mobility patterns and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, v. 77, p. 246-253, 1993.

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

ANDRADE, A.L.; ZICKER, F.; RASSI, A.G.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, S.A.; ANDRADE, S.S.; MARTELLI, C.M.T. Early electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi*-seropositive children. *Am. J. Trop. Hyg.*, v. 59, p.530-534, 1988.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev. Patol. Trop.*, v. 3, p. 65-121, 1974.

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

ANDRADE, S.G. Patologia experimental da doença de Chagas. In Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Netto, M. (eds), *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 177-200, 2000.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F.D.; BARRAL NETTO, M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 23, p. 245-250, 1981.

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

ANDRADE, S.G. & MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 30, p. 27-35, 1996.

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

ANDREWS, N.W.; ABRAMS, C.K.; SLATIN, S.L.; GRIFFITHS, G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*, v. 61, p. 1277-1287, 1990.

APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; GOMEZ, L.; MILES, M.; WIDMER, G. Epidemiology of Chagas disease in Northern Chile: isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 37, p. 302-307, 1987.

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

AVILA, 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.

BASOMBRÍO, M.A.; NOZAKI, T.; GÓMEZ, L.; RAMOS, F.; CROSS, G. GP72 gene deletion increases culture induced virulence attenuation in *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91 (Suppl.), p. 303, 1996.

BASOMBRÍO, M.A.; SEGURA, M.A.; GÓMEZ, L.; PADILHA, M. Studies on the virulence and attenuation of *Trypanosoma cruzi* using immunodeficient animals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 95(suppl. I), p.175-178, 2000.

BICE, D.E. & ZELEDON, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.*, v. 56, p. 663-670, 1970.

BOGLIOLO, A.R.; CHIARI, E.; SILVA-PEREIRA, R.O.; SILVA-PEREIRA, A.A. A comparative study of *Trypanosoma cruzi* enzyme polymorphism in South América. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.19, p. 673-683, 1986.

BOGLIOLO A.R., LAURIA-PIRES L.; GIBSON, W.C. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop.*, v. 61, p. 31-40, 1996.

BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J. Cell. Biol.*, v. 106, p. 1349-1358, 1988.

BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E.E.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J.F.; STOPPANI, A.O.M. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.*, v. 188, p. 643-648, 1980.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v 59, p. 19-26, 1965.

BRENER, Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations resending distinct characteristics. *PAHO Sci. Pub.*, v. 347, p.11-21, 1977.

BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western hemisphere. *Pharmac. Therap.*, v. 7, p. 71-90, 1979.



BRENER, Z. & CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 5, p. 220-224, 1963.

BRENER, Z.; COSTA, C.A.G.; CHIARI, C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 18, p. 450-455, 1976.

BRENER, Z., CHIARI E.; ALVARENGA, N.J. Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 16, p. 39-46, 1974.

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.

BRIONES, M.R.; SOUTO R.P.; ZINGALES. The evolution of the two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 104, p. 219-232, 1999.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.*, v.30, p.35-44, 2000.

BRITTO, C.; CARDOSO, M.A.; MONTEIRO VANNI, C.M.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S.S.; OELEMANN, W.; SANTORO, A.; PIRMEZ, C.; WINCKER P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, v. 110, p. 241-247, 1995.

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.

BUSCAGLIA, C.A.& DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.*, v.5, p.419-427, 2003.

CAMPBELL, D.A.; THOMAS, S.E; STUM, N.R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: Why be normal? *Microbes Infect.*, 5, p.1231-1240.

CAMPOS, R.M.F. & ANDRADE, S.G. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 795-800, 1996.

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.

CARNEIRO, M.; CHIARI, E.; GONÇALVES, A.M.; DA SILVA PEREIRA, A.A.; MOREL, C.M.; ROMANHA, A.J. Changes in the isoenzyme and Kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.*, v. 47, p.35-45, 1990.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 387-393, 1991.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase 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.

CHIARI, E. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes from cultures kept in laboratory for different periods of time. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 16, p.61-67, 1974.

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.

CHIARI, E.; TAFURI, W.L.; ALVARENGA, N.J.; SOARES, S.J. Observações sobre o comportamento no hospedeiro vertebrado de diferentes culturas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 15, p. 225-260, 1973.

COURA, J.R. & DE CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 97(1), p.3-24, 2002.

CRUZ, R.E.; MACEDO, A.M.; BARNABÉ, C.; FREITAS, J.M.; CHIARI, E.; VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; BAHIA, M.T.; TAFURI, W.L.; LANA, M. Further genetic characterization of the two *Trypanosoma cruzi* Berenice strains (Be-62 and Be-78) isolated from the first human case of Chagas disease (Chagas, 1909). *Acta Trop.*, v. 97(3), p.239-46, 2005.

DEANE, M.P.; JANSEN, A.M.; MANGAIA, R.H.R.; GONÇALVES, A.M.; MOREL, C.M. Are our laboratory "strain" representative sample of *Trypanosoma cruzi* population that circulate in nature? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79(suppl.), p.19-24, 1984a

DEANE, M. P.; LENZI, H.L.; JANSEN, A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79(4), p.513-515, 1984b.

DEANE, M.P.; MANGAIA, R.H.R.; PEREIRA, N.M.; GONÇALVES, A.M.; MOMEM, H.; MOREL, C.M. *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of an initial mixed infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79, p.495-497, 1984c.

DEANE, M.P.; SOUZA, M.A.; PEREIRA, N.M.; GONÇALVES, A.M.; MOMEN, H.; MOREL, C. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. *J. Protozool.*, v. 31, p. 276-280, 1984d.

DE CASTRO, S.L. The challenge of Chagas disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropic.*, v. 53, p.83-98, 1993.

DIAS, J.C.P. Epidemiology of Chagas disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.S., Rassi, A. (eds), Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine, *ISBT Brasil 1992, São Paulo*, p. 49-80, 1992.

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

DOCAMPO, R.; MASON, P.; MOTTLEY, C.; MUNIZ, R.P.A. Generation of free radicals induced by nifurtimox in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 930-933, 1981.

DOSREIS, G.A. Cell-mediated immunity in Experimental *Trypanosoma cruzi* infection - a review. *Parasitology Today*, v. 13, p. 335-342, 1997.

DVORAK, J. A., The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.*, v. 24, p. 357-371, 1984.

EDWARDS, D.I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemoter.*, v. 31, p. 9-20, 1993.

EDWARDS, D.I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. II. Mechanism of resistance. *J. Antimicrob. Chemoter.*, v. 31, p. 201-210, 1993.

EL-SAYED, N.M. e cols., The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, p. 409-415, 2005.

ESTEVEZ, A.M. & SIMPSON, L. Uridine insertion /deletion RNA editing in trypanosome mitochondria - a review. *Gene*, v. 240, p. 247-260, 1999.

FAIRLAMB, A.H. & CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 46, p. 695-729, 1992.

FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; PEREIRA, J.B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A.C.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 58(6), p. 807-11, 1998.

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.

FIGUEIREDO, I.F.; LIMA, M.T.; GATASS, C.R.; SOUTO PADRON, T. Trypomastigotes of clone C14 of *Trypanosoma cruzi* are rapidly destroyed by macrophages *in vivo*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 56-61, 1996.

FILARDI, L.S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p. 755-759, 1987.

FINLEY, R.W. & DVORAK, J.A. *Trypanosoma cruzi*: Analysis of the population dynamics of heterogeneous mixtures. *J. Protozool.*, v. 34, p. 409-415, 1987.

FRAGATA FILHO, A.A.; SILVA, M.A.D.; BOAINAIN, E. Tratamento etiológico da doença de Chagas com Nifurtimox e Benzonidazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 4, p. 192-197, 1994.

FRANCO, D.J.; VAGO, A.R.; CHIARI, E.; MEIRA, F.C.A.; GALVÃO, L.M.C.; MACHADO, C.R.S. *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol.*, v. 104, p. 54-61, 2003.

GAUNT, M.W.; YEO, M.; FRAME, L.A.; STOTHARD, J.R.; CARRASCO, I.I.J.; TAYLOR, M.C.; MENA, S.S.; VEAZEY, P.; MILES, G.A.; ACOSTA, N.; DE ARIAS, A.R.; MILES, M.A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, v. 421, p. 936-939, 2003.

GIBSON, A.C. & MILES, M.A. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* v. 5, p. 1299-1305, 1986.

GIBSON, W.C. & BAILEY, M.A. Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*: evidence for meiosis from analysis of a cross between drug-resistant transformants. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 64, p. 241-252, 1994.

GIBSON, W.C. & MILES, M.A. Application of new technologies to epidemiology. *Brit. Med. Bull.*, v. 41, p. 115-121, 1985.

GOLDBERG, S.S. & SIVA PEREIRA, A.A. Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, v. 69, p.91-96, 1983.

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.

GONZÁLES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Exp. Med.*, v. 66, p.205-212, 1988

GRINBLAT, L.; SREIDER, C.M.; STOPPANI, A.O.M. Nitrofurantoin inhibition of yeast and rat tissue glutathione reductase. *Biochem. Pharmacol.*, v. 38, p. 767-772, 1989.

GUEDES, P.M.M.; VELOSO, V.M.; TAFURI, W.L.; GALVÃO L.M.C.; CARNEIRO, C.M.; LANA, M.; CHIARI, E.; SOARES, K.A., BAHIA, M.T. The dogs as model for chemotherapy of the Chagas disease. *Acta Trop.*, v. 84, p. 9-17, 2002.

HALL, B.F. & JOINER, K. A. Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. *J. Euk. Microbiol.*, v. 40(2), p. 207-213, 1993.

KOLLIEN, A.H. & SCHAUB, G.A. The Development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae - a review. *Parasitol. Today*, v. 16, p. 381-387, 2000.

KREUTZER, R.D. & SOUSA, O.E. Biochemical characterization of *Trypanosoma cruzi* spp. by isozyme electrophoresis. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 30, p. 308-317, 1981.

LAIRD, P.W. Trans splicing in trypanosomes--archaism or adaptation? – Review. *Trends Genet.*, v. 5(7), p. 204-8, 1989.

LAMBRECH, F.L. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop, São Paulo*, v. 7, p. 346-352, 1965.

LANA, M. Caracterização do *Trypanosoma cruzi*, cepa Berenice, isolada da mesma paciente em diferentes períodos. 1981. 91 f. Tese (Mestrado em Parasitologia) - UFMG, 1981.

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, p. 247-253, 1986.

LANA M., CHIARI C.A., CHIARI E., MOREL C.M., GONÇALVES A.M.; ROMANHA A.J. Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909. *Parasitol. Res.*, v. 82, p. 257-260, 1996.

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

LANZER, M.; FISCHER, K.; LE BLANCQ, A.M. Parasitism and chromosome dynamic in protozoan parasites: there a connection? *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 70, p.1-8, 1995.

LAURIA-PIRES, L.; BRAGA, M.S.; VEXENAT, A.C.; NITZ, N.; SIMOES-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(3-4), p.111-118, 2000.

LEGUIZAMÓN, M.S.; CAMPETELLA, O.F.; ORN, A.; GONZÁLES CAPPÀ, S.M. Reversion of culture-induced virulence attenuation in *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 88, p. 161-162, 1993.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D.L.; VOTYPKA, J.; ZIKOVA, A.; BENNE, R.E; ENGLUND, P.T. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*, v. 1, p. 495-502, 2002.

LUQUETTI, A.O.; MILES, M.A.; RASSI, A.; DE REZENDE, J.M.; RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zimodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans. R. Soci. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, p. 462-470, 1989.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; MACINA, R.A.; FRANKE DE CAZZULO, B.M.; CAZZULO, J.J.; FRASCH, A.C.; PETTERSSON, U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of



karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 42, p. 213-224, 1990.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, v. 12, p. 108-114, 1996.

MACEDO, A.M.; MARTINS, M.S.; CHIARI, E; PENA, S.D.J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 55, p. 147-154, 1992.

MACEDO, A.M. & PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today*, v. 14, p. 119-123, 1998.

MACEDO, A.M.; PIMENTA, J.R.; AGUIAR, R.S.; MELO, A.I.M., CHIARI, EGLER.; ZINGALES, B.; PENA, S.D.J.; OLIVEIRA, R.P. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 96(3), p. 407-413, 2001.

MACEDO, C.A. & AYALA, F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 98, p. 7396-7401, 2001.

MCDANIEL, J.P. & DVORAK, J.A. Identification, isolation and characterization of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 57, p. 213-222, 1993.

MACHADO, C.A. & AYALA, F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, p.7396-7401, 2001.

MACHADO, C.A. & AYALA, F.J. Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 121, p. 33-47, 2002.

MAGALHÃES, J.B.; ANDRADE, S.G.; SHERLOCK, I. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomines (biological and biochemical patterns). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 38, p. 23-28, 1996.

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

MARQUES DE ARAÚJO S. & CHIARI E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C<sub>3</sub>H isogênicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 175-181, 1988.

MARRETTO, J.P.M. & ANDRADE, S.G. Biochemical behavior of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, p. 209-215, 1994.

MAZZA, S.; COSSIO, R.; ZUCARDI El primer caso agudo de enfermedad de Chagas comprobado en Tucumán y su tratamiento com Bayer 7602. *Misión Estudios Patol. Reg. Arg.*, v. 32, p. 2-18, 1937.

MELO, R.C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strain. *J. Parasit.*, v. 64, p. 475-82, 1978.

MICHAILOWSKY, V.; MURTA, S.M.F.; CARVALHO-OLIVEIRA, L.; PEREIRA, M.E.S.; FERREIRA, L.R.P.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; GAZZINELLI, R.T. Interleukin-12 enhances in vivo parasiticidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Ag. Chem.*, v. 42, p. 2549-2556, 1998.

MILES, M.A. American trypanosomiasis (Chagas disease). In, p. Cook G.C. Zumla, A., eds. *Manson's tropical disease, 21st edn. London, p. Elsevier Science*, p. 1325-1337, 2003.

MILES, M.A.; CEDILLOS, R.A.; POVOA, M.M., DE SOUZA, A.A.; PRATA, A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet*, v. 1, p. 1338-1340, 1981.

MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 74, p. 221-237, 1980.

MILES, M.A.; TOYÉ, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brasil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 71, p. 217-225, 1977.

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. Parasit.*, (in press), 2006.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 181-184, 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, Rio de Janeiro*, v. 98(5), p. 577-591, 2003.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern

of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

MOREL, C.; DEANE, M.P.; GONÇALVES, A.M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol. Today*, v. 2, p. 97-101, 1986.

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.

MURTA, S.M.F. & ROMANHA, A.J. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitol.*, v. 116, p. 165-171, 1998.

MURTA S.M.F. & ROMANHA A.J. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 177-180, 1999.

OLIVEIRA, R.P.; BROUDE, N.E.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R., SMITH, C.L.; PENA, S.D.J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 95, p. 3776-3780, 1998.

OLIVEIRA, R.P.; MELO, A.I.R.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 1, p. 65-70, 1999.

PACHECO, R.S. & BRITO, C.M.M. Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 199-201, 1999.

PEREYRA, M. Generation of an invasive phenotype in *Trypanosoma cruzi* by an endogenous, cytokine like molecule. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91 (Suppl.), p. 14, 1996

POSTAN, M.; MCDANIEL, J.P.; DVORAK, J.A. *Trypanosoma cruzi*: constancy of clone pathogenicity for inbred mice during long-term in vitro maintenance. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, p. 659-662, 1986.

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

RASSI, A. & LUQUETTI, A.O. Therapy of Chagas' disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E.; RASSI, A., (Eds) Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. *ISBT, São Paulo, Brasil'92*, p. 237-256, 1992.

REQUENA, J.M.; LÓPEZ, M.C.; ALONSO, C. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, v. 12, p. 279-283, 1996.

REVELLI, S.; PAGE, C.LE.; PIAGGIO, E.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' Disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 118, p. 271-277, 1999.

REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J.P.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; CARRIÈRI, V.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp. Parasitol.*, v. 89, p. 30-39, 1998.

ROMANHA, A.J. Heterogeneidade Enzimática em *Trypanosoma cruzi*. PhD Thesis. UFMG. Belo Horizonte. 110pp, 1982.

ROMANHA, A.J.; PEREIRA, A.A.S.; CHIARI, E.; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 62B, p. 139-142, 1979.

SALGADO, J.A.; GARCEZ, P.N.; OLLIVEIRA, C.A.; GALIZZI, J. Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito de Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 4(5), p. 330-337, 1962.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.J.; EPPLER 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.

SILVA, R.C.; SANTIAGO, C.M.G.; PONTES, A.L.; ANDRADE, S.G. Padrão isoenzimático da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* após quimioterapia específica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.84, p. 81-86, 1989.

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.

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

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.

STURM, N.R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast

minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* v. 33, p. 205-214, 1989.

TAFURI, W.L. Patogênese. In: *Cardiopatia chagásica*. (Eds) Cançado, J.R.; Chuster, M. *Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte*, v. 1, p. 9, 1985.

TAFURI, W.L. Patogenia da Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo*, v. 29(4), p. 194-199, 1987.

TDR. Tropical disease research: progress 2003-2004. Seventeenth programme report of TDR. *Chagas disease, Making health research work for people*. p. 31-33, 2005.

TELLERIA, J.; BARNABÉ, C.; HIDE, M.; BAÑULUS, A.L.; TIBAYRENC, M. Predominant clonal evolution leads to close parity between gene expression profiles and subspecific phylogeny in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 137(1), p.133-41, 2004.

THOMPSON, R.C.A. & LYMBERT, A.J. Intraspecific variation in parasites – What is a strain? *Parasitol. Today*, v. 6, p. 345-348, 1990.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* v. 36, p. 47-115, 1995.

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

TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, v. 42, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 405-410, 2002.

TIBAYRENC, M. & BRENIÉRE, S. F. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v. 83, p. 249-255, 1988.

TIBAYRENC, M. & MILES, M.A. A genetic comparison of Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 77, p. 76-83, 1983.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 83, p.115-119, 1986.

TOLEDO, M.J.O; BAHIA, M.T.; CARNEIRO, C.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; TIBAYRENC, M.; BARNABÉ, C.; TAFURI, W.L.; LANA, M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Am. Soc. Microb.*, v. 47(1), p. 223-230, 2003

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

TOLEDO, M.J.O.; GUILHERME, A.L.F.; SILVA, J.C.; GASPERI, M.V.; MENDES, A.P.; GOMES, M.L.; ARAÚJO, S.M. *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with Benznidazole in mice inoculated with strains from Paraná state and from diferent endemic áreas of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 39, p. 283-290, 1997.

TOLEDO, M.J.O.; LANA, M.; CARNEIRO, C. M.; BAHIA, M.T.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; VELOSO, V.M.; BARNABÉ, C.M.; TAFURI, W.L. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp. Parasitol.* v. 100, p. 116-172, 2002.

TOYÉ, P.J. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 68, p. 147, 1974.



URBINA, J.A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr. Opin. Infect. Dis.* v.14, p. 733-741, 2001.

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, Rio de Janeiro*, v. 96(7), p. 1005-1011, 2001.

VELOSO, V.M.; ROMANHA, A.J.; LANA, M.; MURTA, S.M.F.; CARNEIRO, C.M.; ALVES, C.F.; BORGES, E.C.; TAFURI, W.L.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; CHIARI, E.; BAHIA, M.T. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol. Res.*, v. 96, p. 382-389, 2005.

VILLARREAL, D.; BARNABÉ, C.; SERENO, D.; TIBAYRENC, M. Lack of correlation between in vitro susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp. Parasitol.*, v. 108, p.24-31, 2004.

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

ZELEDON, R. & RABINOVICH, J.E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 26, p. 101-133, 1981.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA J. R.; JANSEN A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Intern. J. Parasit.*, v. 28, (1), p. 105-112, 1998.