

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

**Influência da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* na
reativação da doença de Chagas experimental após imunossupressão
com ciclofosfamida**

DANIELA MARIA DOS SANTOS

Ouro Preto, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELA MARIA DOS SANTOS

Influência da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* na reativação da doença de Chagas experimental após imunossupressão com ciclofosfamida

**Orientadora: Prof^ª Maria Terezinha Bahia
Co-Orientadora: Prof^º Marta de Lana**

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

Ouro Preto, MG
2007

Não importa onde você parou
Em que momento da vida você cansou.
O que importa é que sempre é possível e necessário
recomeçar. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo
É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...
Acreditar em você de novo.

A hora é agora!
É preciso viver o sonho e a certeza de que tudo vai mudar

Sofreu muito neste período? Foi aprendizado.
Chorou muito? Foi limpeza da alma.
Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia.
Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechastes a porta
até para os anjos.
Acreditou que tudo estava perdido? Era o início de tua
melhora.
Onde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto...
Queira o melhor do melhor.
Se pensamos pequeno, coisas pequenas teremos.
Mas se desejamos fortemente o melhor e principalmente
lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar em nossa vida.

“Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho
de minha altura.”

À professora Maria Terezinha Bahia pela tranqüilidade e otimismo em sua orientação, pelos ensinamentos e presença constante quando solicitada.

À professora Marta de Lana por ter cedido os clones, pelo apoio, carinho e pelos momentos divertidos que passamos juntas.

À professora Cláudia Martins Carneiro por todo o auxílio na realização das necropsias e das técnicas histopatológicas, sua tranqüilidade e bom senso é sempre muito importante para nos acalmar nos momentos difíceis.

Ao professor André Talvani pela preciosa colaboração, por ter, em pouco tempo, se dedicado muito a este trabalho. Obrigada pelas valiosas contribuições, pelos conselhos e principalmente pela disponibilidade em ajudar.

Ao professor George L.L. Machado Coelho pela dedicada e paciente colaboração na análise estatística.

À Vanja, pela sua dedicação, disponibilidade e amizade, minha imensa admiração e gratidão. Tenho você como um exemplo vida, de pessoa batalhadora e vitoriosa que não desiste nunca de ser feliz. Obrigada por tudo.

Ao Paulo pela colaboração na realização da técnica de ELISA.

À Fernanda que realizou as técnicas de HE e Imunohistoquímica com muita dedicação e responsabilidade.

Aos colegas da protozoologia, Alekson, Alexandra, Rafaela, Elisângela e Lílian*, pela cooperação em todos os momentos. Nossa união e companheirismo amenizaram as dificuldades e alegraram as árduas horas de estudo.

Aos colegas Geovam, Vítor, Ivo, Sérgio, Fabiane, Girley, Daniela, Lívia, Juliana e Isabel, os momentos compartilhados.

Às amigas Jerusa, Jamille, Marcela, Érika e Nilza pelas conversas descontraídas, a força e o carinho.

À Helen pela carinhosa e agradável convivência. Você sempre ajudou nas coisas práticas, mas nunca deixou de ser amiga para ouvir e ajudar e principalmente para dar um abraço nos momentos em que as palavras não ajudariam muito.

Às amigas Lílian F. e Jaqueline, pessoas lindas e de bom coração, pela dedicada e preciosa colaboração nas técnicas de ELISA e PCR, pela harmoniosa e alegre convivência.

Ao Rafael e Tassiane que cuidaram do trabalho do biotério de forma responsável e dedicada e me ajudaram em todos os momentos necessários.

Ao Arnaldo por todas as horas dedicadas aos meus géis, pela paciência e boa vontade em me ajudar e por ser essa pessoa fantástica que consegue transformar os nossos dias mais tristes e exaustivos em dias divertidos e prazerosos.

Ao Rodrigo pela colaboração na técnica de PCR, sempre paciente e dedicado.

Aos colegas dos laboratórios do Nupeb, em especial da Imuno e Bioquímica, pela utilização de equipamentos e por muitas vezes cederem materiais e reagentes.

À Ana Salomé por estar sempre disponível e disposta a ajudar, e por tornar os nossos dias sempre muito divertidos.

Aos colegas do biotério Selma, Rosária, Zé Henrique, Marcos e Jorge pelos cuidados com os animais e pela prestatividade, em especial à Cristina pela eficiência na produção e por estar sempre pronta a nos servir e ao Cláudio (meu amigo cruzeirense) que cuidou dos meus animais e sempre me atendeu com muita atenção e carinho.

À Maria Chaves pelo processamento do material histopatológico.

À Cida, secretária do Nupeb, por sua dedicação e boa vontade em nos atender e ajudar, sempre com um sorriso contagiante.

Aos amigos que não fazem parte do meu mundo acadêmico, mas sempre fizeram parte da minha vida.

“Deus colocou em minha vida alguns anjos. Anjos muitos especiais que estão sempre ao meu lado, em todos os momentos. Anjos que me guardam, protegem e que desejam e fazem sempre o melhor para mim. Não possuem túnica, mas se vestem de bondade e amor, não possuem auréola, mas sob suas cabeças pairam as bênçãos divinas, não possuem asas mas são capazes de voar alto quando solicitados, são poucos, mas verdadeiros...e aqui na terra são chamados de **AMIGOS**”.

A esses amigos não posso dizer apenas obrigada:

À Tia Cida e Elisângela que me estenderam a mão num momento difícil. Minhas companheiras de caminhada e baladas, que ajudaram a levantar o astral e mostraram o lado bom de muitas coisas.

Às minhas lindas da Escola Estadual “Coronel Benjamim Guimarães”, que cuidam de mim como uma filha. Dona Marlene, Dona Euci, Leci e Neli. À Bebel grande amiga, as horas divertidas, o carinho e os cuidados. Vocês são minhas mãezinhas de coração. Não tem preço tudo o que vocês fizeram por mim. Amo vocês.

À amiga Kívia pela torcida e infinitas horas de conversa nas quais trocamos experiências e nos transmitimos muita energia positiva. Obrigada pela ajuda na formatação desse trabalho e por todas às vezes que socorreu esta amiga que vive brigando com computador.

Rê e Nathy, que mesmo longe se fazem sempre presente. Uma presença constante e necessária em minha vida. O carinho, a preocupação e a torcida de vocês muito contribuíram para mais esta conquista. Obrigada pela força.

Às amigas Néia e Jose, por todos esses anos de amizade, por participarem de todos os momentos importantes da minha vida, sejam eles bons ou ruins. Obrigada pela disponibilidade em me ouvir e ajudar e por nunca dizerem não quando preciso de vocês.

Ao meu afilhado Higor e à sua família, pela torcida e pelo carinho com o qual me acolhem.

À Nayara, amiga de todas as horas, exemplo de força e serenidade. A distância separa dois corpos, mas é incapaz de separar duas almas, principalmente quando elas são tão unidas como a nossa.

À minha família, em especial minha mãe pelo amor incondicional, pelos cuidados e preocupação e aos meus irmãos, principalmente o Cacau, meu irmão mais que especial que enche nossos dias de paz e alegria e nos mostra o valor das pequenas coisas da vida, pois para ele cada dia é uma caixinha de surpresas, uma luta constante, com novos aprendizados e muitas conquistas.

À Liloca (Lílian Santos), minha querida amiga, toda a minha gratidão e admiração. Você mais do que ninguém sabe o significado desta conquista, pois esteve ao meu lado de forma incondicional. Deus te colocou em meu caminho na hora certa porque sabia que precisaria de uma pessoa como você para me ajudar a superar muitos obstáculos e foi exatamente o que aconteceu. Enfrentamos muitos momentos difíceis, mas hoje só tenho a agradecer, pois através das dificuldades fortalecemos a nossa amizade e entendemos o significado de muitas coisas. Você é uma pessoa iluminada e muito especial e onde quer que esteja estarei sempre torcendo para que seja feliz, com o mesmo amor de sempre.

A Deus, fiel e benevolente, energia sublime e inexplicável, capaz de fortalecer quando forças não acreditamos ter.

A variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* parece correlacionar-se a algumas variáveis da doença como tropismo tecidual, infectividade e resistência a drogas. Neste estudo, clones das linhagens do *T. cruzi* I (Gamba cl1 e SP104 cl1 - genótipo 19) e (Cuica cl1 e P209 cl1 - genótipo 20), e do *T. cruzi* II (Bug2148 cl1 e MN cl2 - genótipo 39) e (MVB cl8 e IVV cl4 - genótipo 32) foram avaliadas quanto à capacidade de gerar reativação da doença crônica em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida (Cy) e ainda, se o tratamento prévio com o fármaco benznidazol (Bz) preveniria esta recrudescência clone-específica. Entre os clones de ambas as linhagens do *T. cruzi* não houve alteração no perfil da curva de parasitemia nos animais infectados. Porém, após o protocolo de imunossupressão com Cy, no final da fase aguda e durante a fase crônica, clones da linhagem *T. cruzi* I induziram índices de reativação da parasitemia de 77,5% e 51,25%, respectivamente, enquanto clones da linhagem *T. cruzi* II apresentaram reativação de 4,7% apenas no final da fase aguda nos camundongos avaliados. De modo geral, o tratamento com Bz induziu uma redução dos índices de reativação tanto na fase aguda (72,22%) quanto na fase crônica (31,37%) da infecção. No entanto, Bz não foi capaz de prevenir a reativação da parasitemia em animais inoculados com os clones Gamba cl1, Cuica cl1 e P209 cl1 na fase aguda. Outro aspecto associado ao Bz, ainda na fase aguda, foi a queda induzida dos níveis totais de IgG avaliados. Finalmente, a imunossupressão induziu aumento de parasitismo tecidual durante a fase crônica mostrando-se, principalmente, associada aos animais infectados com clones da linhagem *T. cruzi* I. Nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, a correlação entre a divergência filogenética do *T. cruzi* e a reativação da doença de Chagas em condição de imunossupressão, sendo esta relacionada a parasitos da linhagem genética *T. cruzi* I. Além disso, foi demonstrado que a eficácia da prevenção secundária na reativação pelo tratamento com Bz, provavelmente também dependente das características genéticas das populações do *T. cruzi*. Nossos resultados abrem perspectivas para se validar a terapêutica imunossupressora em indivíduos chagásicos submetidos à quimioterapia antineoplásica e/ou corticoidoterapia ou mesmo a proposição de novos fármacos imunossupressores.

The genetic variability of *Trypanosoma cruzi* appears to be correlated with some aspects of Chagas disease like tissue parasite tropism, infectivity and drug resistance. In this study, lineages of *T. cruzi* I (Gamba c11 and SP104c11 - genotype 19) and (Cuica c11 and P209 c11 - genotype 20) and *T. cruzi* II (Bug2148 c11 and MN c12 - genotype 39) and (MVB c18 e IVV c14 - genótipo 32), were evaluated to its capacity to generate reactivation during experimental chronic phase of disease using Cyclophosphamide (Cy) immunosuppressed mice and, whether the previously treatment with Benznidazol (Bz) would foresee this clone-specific recrudescence. There was no difference associated with parasitemia curve observed among clones into each *T. cruzi* lineage. However, *T. cruzi* I lineage was able to induce 77,5% and 51,25% of parasitemia reactivation when Cy was administrated in the end of acute phase and 51,25%, respectively, while this reactivation associated with *T. cruzi* II was observed only in the end of acute phase (4.7%). In general, treatment with Bz was able to induce low index of reactivation in acute (72.22%) and chronic (31.37%) phase of infection. Nevertheless, Bz was not able to prevent reactivation of parasitemia in acute phase, induced by clones clones Gamba c11, Cuica c11 e P209 c11. Another aspect associated with Bz treatment, in acute phase, was the reduction of IgG1 levels, except to clones that belongs to 32 and 39 genotypes. Finally, immunosuppression induced high levels of tissue parasites during chronic phase and this aspect was associated with animals infected with *T. cruzi* I clones. In our study, we demonstrated for the first time, the correlation between phylogenetic divergence of *T. cruzi* and reactivation of Chagas disease under immunosuppression condition and a close relation of these events with *T. cruzi* I genetic lineage. Besides, it was demonstrated a secondary prevention of this reactivation after Bz treatment and, also, this event appears to be dependent of genetic *T. cruzi* populations. Our data open new perspectives to an immunosuppressed therapeutic validation in chagasic individuals submitted to chemotherapy to neoplastic cells or corticoterapia or, at least, to propose new immunosuppression drugs.

1- Introdução	1
1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2. Variabilidade genética do <i>T. cruzi</i>	5
1.3. Formas clínicas da doença de Chagas	9
1.4. Imunopatologia da doença de Chagas	10
1.5. A doença de Chagas em indivíduos imunocomprometidos.....	12
2- Justificativa	16
3- Objetivos.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	19
3.2. Objetivos Específicos	19
4- Material e Métodos.....	21
4.1. Populações de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
4.2- Animais e infecção.....	23
4.3. Avaliação da reativação da parasitemia, após a imunossupressão com ciclofosfamida, em camundongos inoculados com os diferentes clones do <i>T. cruzi</i>	23
4.4. Avaliação do efeito do tratamento com benznidazol (durante as fases aguda e crônica da infecção) no índice de recrudescência da doença de Chagas, após a imunossupressão com ciclofosfamida.....	24
4.5. Esquema de imunossupressão com ciclofosfamida	24
4.6. Determinação do índice de reativação da doença de Chagas	25
4.7. Esquema de tratamento com benznidazol.....	25
4.8. Exames parasitológicos	26
4.8.1. Exame de sangue a fresco.....	26
4.8.2. Hemocultura.....	26
4.9. Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA	26
4.10. Análise Histopatológica.....	27
4.10.1. Hematoxilina-Eosina	28
4.10.2. Técnica Imuno-histoquímica -PAP para identificação do <i>T. cruzi</i>	28
5-Resultados.....	31
5.1. Parâmetros Biológicos - infectividade, mortalidade, período patente e período pré-patente.	32
5.2. Curva de parasitemia padrão dos diferentes clones pertencentes aos grupos genéticos <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i> II	33
5.3. Índice de reativação da parasitemia de camundongos inoculados com parasitos pertencentes aos grupos <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i> II após imunossupressão com ciclofosfamida.....	37
5.4. Curvas de parasitemia dos animais infectados com os clones pertencentes à linhagem genética <i>T. cruzi</i> I, tratados ou não com benznidazol e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida durante a fase aguda da infecção.....	38
5.5. Curvas de parasitemia dos animais infectados com os clones pertencentes à linhagem genética <i>T. cruzi</i> I, tratados ou não com benznidazol e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida durante a fase crônica da infecção.....	42

5.6. Avaliação da eficácia do tratamento específico com benznidazol na prevenção da reativação da parasitemia em animais imunossuprimidos com ciclofosfamida.	44
5.7. Análise histopatológica dos tecidos cardíaco e/ou esquelético e encefálico de camundongos inoculados com clones os Gamba cl1 e SP104 cl1 (genótipo 19), Cuica cl1 e P209 cl1 (genótipo 20), pertencentes à linhagem genética <i>T. cruzi</i> I, e Bug2148 cl1 e MN cl2 (genótipo 39) e MVB cl8 e IVV cl4 (genótipo 32) pertencentes à linhagem <i>T. cruzi</i> II e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida e/ou tratamento com benznidazol.	49
6 – Discussão	61
7 - Conclusões	71
8- Referências Bibliográficas.....	74

- Tabela 1: Percentagem total de reativação da parasitemia, após imunossupressão com ciclofosfamida, e/ou testes de hemocultura positivos em camundongos inoculados com os clones Gamba cl1, SP104 cl1, Cuica cl1 e P209 cl1 (*T. cruzi* I) e tratados com benznidazol durante a.....**45**
- Tabela 2: Média da absorbância pela reação imunoenzimática ELISA realizada em soros obtidos de animais infectados com clones pertencentes aos grupos genéticos 19, 20, 32 e 39, comparativamente aos animais infectados com os mesmos clones e tratados com benznidazol durante as fases aguda e crônica da infecção.....**48**
- Tabela 3: Parasitismo tecidual detectado no músculo cardíaco e/ou esquelético de camundongos inoculados com os clones Gamba cl1, SP104 cl1, Cuica cl1 e P209 cl1 (*Trypanosoma cruzi* I), Bug 2148 cl1, MN cl2, MVB cl8 e IVV cl4 (*T. cruzi* II), e imunossuprimidos pela ciclofosfamida (submetidos ou não ao tratamento com benznidazol) no 60^o (fase aguda) após a inoculação.....**50**
- Tabela 4- Mediana da intensidade do processo inflamatório no átrio de camundongos infectados com clones do *T. cruzi* pertencentes ao grupo *T. cruzi* I e *T. cruzi* II comparativamente aos camundongos inoculados com os mesmos grupos genéticos do parasito e submetidos a imunossupressão com ciclofosfamida e/ou ao tratamento com benznidazol.**53**
- Tabela 5: Número médio de nódulos gliais e infiltrados perivascular presentes no encéfalo de camundongos infectados com clones do *T. cruzi* pertencentes ao grupo *T. cruzi* I e *T. cruzi* II comparativamente aos animais inoculados com os mesmos grupos genéticos do parasito e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida e/ou ao tratamento com benznidazol.**57**

Quadro 1: Classificação do <i>Trypanosoma cruzi</i> de acordo com a caracterização biológica e molecular, segundo Anonymous, 1999.	3
Quadro 2: Hospedeiros e origem geográfica dos 8 clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> pertencentes aos clones principais (genótipos) ubíquos 19, 20, 39 e 32.	22
Quadro 3: Esquema de imunossupressão com ciclofosfamida.....	25

- Gráfico 1: Curvas de parasitemia realizadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos dos clones pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* I: Gamba cl1(1A), SP104 cl1 (1B), Cuica cl1 (1C) e P209 cl1(1D).34
- Gráfico 2: Curvas de parasitemia realizadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneos dos clones pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* II: Bug2148 cl1 (2A), MN cl2 (2B), MVB cl8 (2C) e IVV cl4(2D)......36
- Gráfico 3: Percentagem de reativação da parasitemia em camundongos Swiss imunossuprimidos com ciclofosfamida durante as fases aguda e crônica da infecção, infectados com diversos clones de *T. cruzi*, agrupados por linhagem genética (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II)......37
- Gráfico 4: Percentagem de reativação da parasitemia em camundongos Swiss infectados com os clones Gamba cl1, SP104 cl1, Cuica cl1 e P209 cl1, pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I e imunossuprimidos com ciclofosfamida durante as fases aguda e crônica da infecção.38
- Gráfico 5: Curva de parasitemia de camundongos Swiss infectados com os clones Gamba cl1, SP104 cl1, Cuica cl1 e P209 cl1, (*T. cruzi* I) tratados ou não com benznidazol e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida durante a fase aguda da infecção.41
- Gráfico 6: Curvas de parasitemia dos animais infectados com os clones pertencentes a linhagem genética *T. cruzi* I, tratados ou não com benznidazol e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida durante a fase e crônica da infecção.43
- Gráfico 7: Percentagem de reativação da parasitemia em camundongos Swiss infectados com os clones Gamba cl1, SP104 cl1, Cuica cl1 e P209 cl1, pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I, tratados com benznidazol e imunossuprimidos com ciclofosfamida durante as fases aguda e crônica da infecção.46
- Gráfico 8: Percentagem de reativação da parasitemia em camundongos Swiss infectados com diversos clones de *T. cruzi*, agrupados nas duas linhagens genéticas (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II), tratados com benznidazol e imunossuprimidos com ciclofosfamida durante as fases aguda e crônica da infecção.47

Figura 1 – Fotomicrografias representativas do miocárdio de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentando ninhos de amastigotas. A, B e C - fase aguda: são representativas do parasitismo tecidual discreto observado no tecido cardíaco dos animais inoculados com os clones Gambá cl1 e IVV cl4 imunossuprimidos ou não. D e E representam o parasitismo moderado a intenso observado nos tecidos dos animais imunossuprimidos infectados com o clone Cuica cl1 imunossuprimidos após o tratamento com benznidazol realizado durante a fase aguda da infecção. F e G - fase aguda: são representativas do parasitismo tecidual observado nos animais infectados com o clone P209 cl1 após a imunossupressão com ciclofosfamida (tratados ou não com Bz)). Imunohistoquímica anti-*T. cruzi*, Peroxidase anti-peroxidase, X60052

Figura 2– Fotomicrografias do miocárdio de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e necropsiados durante a fase aguda da infecção. A-D – *T. cruzi* I; E - H – *T. cruzi* II. A e E- Infectado; B e F- Infectado e imunossuprimido; C e G- Infectado e tratado com benznidazol; D e H- Infectado, imunossuprimido e tratado com benznidazol – Hematoxilina Eosina, X300.55

Figura 3 – Fotomicrografias do miocárdio de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e necropsiados durante a fase crônica da infecção. A-D – *T. cruzi* I; E - H – *T. cruzi* II. A e E-Infectado; B e F- Infectado e imunossuprimido; C e G- Infectado e tratado com benznidazol; D e H- Infectado, imunossuprimido e tratado com benznidazol – Hematoxilina Eosina, X300.56

Figura 4 – Fotomicrografias do encéfalo de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e necropsiados durante a fase aguda da infecção. A-D – *T. cruzi* I; E-H – *T. cruzi* II. A e E- Infectado; B e F- Infectado e imunossuprimido; C e G- Infectado e tratado com benznidazol; D e H- Infectado, imunossuprimido e tratado com benznidazol – Hematoxilina Eosina, X300.59

Figura 5 – Fotomicrografias do encéfalo de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e necropsiados durante a fase aguda da infecção. A-D – *T. cruzi* I; E-H – *T. cruzi* II. A e E- Infectado; B e F- Infectado e imunossuprimido; C e G- Infectado e tratado com benznidazol; D e H- Infectado, imunossuprimido e tratado com benznidazol – Hematoxilina Eosina, X300.60

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Bz	Benznidazol
Cy	Ciclofosfamida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1B	Interleucina 1B
IPV	Infiltrado perivascular
IS	Imunossupressão
LIT	Liver infusion tryptose
NG	Nódulos gliais
ON	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPP	Período pré-patente
PP	Período patente
RAPD	RandomLy amplified polymorphic DNA
SNC	Sistema nervoso central

1 - Introdução

1.1. O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem kinetoplastida e à família Tripanosomatidae. Caracteriza-se pela presença de uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA extranuclear, denominado k-DNA, localizada no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo o corpo do protozoário.

O *T. cruzi* apresenta uma ampla variabilidade biológica e genética, o que levou diferentes pesquisadores, utilizando diversos marcadores biológicos e moleculares, a proporem várias nomenclaturas para a classificação intraespecífica deste parasito. No encontro satélite realizado durante o “Simpósio Internacional em Comemoração ao 90º Aniversário da Descoberta da Doença de Chagas”, ocorrido no Rio de Janeiro em abril de 1999, foi proposta uma nomenclatura comum para este parasito, com o objetivo de facilitar o uso e o entendimento dos termos utilizados pela comunidade de pesquisadores que trabalham com o *T. cruzi*. Assim, após a caracterização biológica e molecular, as cepas do *T. cruzi* devem ser classificadas como *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e *T. cruzi*. Neste simpósio, os participantes procuraram uniformizar as classificações propostas anteriormente por diversos autores. Desta maneira, as cepas serão classificadas como mostrado na quadro I.

A variabilidade intraespecífica do *T. cruzi* foi inicialmente demonstrada através de caracterizações morfobiológicas. O isolamento e o estudo de populações do *T. cruzi*, de diferentes origens, demonstram a existência de características variáveis entre cepas. Foi demonstrada, por vários autores, a existência de características variáveis entre as populações do *T. cruzi* em relação à morfologia dos tripomastigotas sanguíneos (Brenner, 1963; 1965), ao tropismo tecidual (Melo & Brenner, 1978), ao padrão da curva de parasitemia (Brenner, 1977), às variações na virulência e patogenicidade (Bice & Zeledon 1970; Andrade, 1974, 1985), à suscetibilidade aos quimioterápicos (Filardi & Brenner, 1987) e à heterogeneidade da composição antigênica (Nusseinzweig & Goble, 1966).

Quadro 1: Classificação do *Trypanosoma cruzi* de acordo com a caracterização biológica e molecular, segundo Anonymous, 1999.

Classificação	Zimodema	Tipo	Linhagem	Grupo	Ribodema
<i>T. cruzi I</i>	Z1 (Miles et al., 1977, 1978, Barret et al., 1980)	Tipo III (Andrade 1974)	Linhagem 2 (Souto et al., 1996),	Grupo 1 (Tibayrenc 1995)	Ribodema II/III (Clark e Pung 1994)
<i>T. cruzi II</i>	Z2 (Miles et al., 1977, 1978, Barret et al., 1980)	Tipo II (Andrade 1974)	Linhagem 1 (Souto et al., 1996)	Grupo 2 (Tibayrenc 1995)	Ribodema I (Clark e Pung 1994)
<i>T. cruzi</i>	Z Chileno 2b (Miles et al., 1984) Z3 (Miles et al., 1978) ZB (Romanha et al., 1979)	Tipo I (Andrade, 1974)		Grupo ½ (Souto et al., 1996) Grupo 39 (Tibyrenc et al., 1995)	

Brener & Chiari (1963) e Brener (1965, 1969) demonstraram que formas tripomastigotas sanguíneas delgadas e largas ocorriam em diferentes proporções nos diversos isolados do *T. cruzi*. Os autores verificaram que formas finas são mais infectivas para as células do hospedeiro vertebrado, mais sensíveis ao sistema imune e predominates em cepas muito virulentas e macrofágicas. Por outro lado, as formas largas são mais resistentes ao sistema imune permanecendo mais tempo na circulação e estão presentes em maior proporção em cepas miotrópicas e de baixa virulência.

A variação no tropismo tecidual de diferentes populações do *T. cruzi* também foi demonstrada por Andrade *et al.* (1999) que, ao infectarem camundongos BALB/c simultaneamente com duas diferentes populações do parasito (cepa JG e clone CoL1.7G2), demonstraram uma clara diferença na distribuição tecidual para as mesmas, tanto nas infecções mistas quanto simples. Por outro lado, Franco *et al.* (2003) demonstraram que o tropismo tecidual de uma população do *T. cruzi* pode ser alterado em infecções mistas de ratos infectados com a cepa JG (isolado de um paciente com megasôfago) e o clone CL-Brener. Os autores demonstraram que o

clone CL-Brener que sozinho provoca um intenso processo inflamatório nos músculos cardíaco e esquelético foi mais rapidamente eliminada do coração ou reduzido a níveis indetectáveis. Nas infecções mistas somente a cepa JG foi encontrada no músculo cardíaco no final da fase aguda e durante a fase crônica. Os resultados mostraram uma tendência da cepa JG em substituir o clone CL-Brener nos órgãos anteriormente parasitados por essa população de *T. cruzi*, sendo esse comportamento aparentemente dependente do tamanho do inóculo. Além disso, a dupla infecção preveniu a alta mortalidade induzida pela clone CL-Brener.

Vago *et al.* (2000) usando a técnica LSSP-PCR também estudaram o tropismo tecidual do *T. cruzi* e a diversidade genética do parasita. Nesse estudo foi verificado perfis genéticos distintos entre os parasitos detectados no tecido cardíaco e no esôfago de um indivíduo com a forma mista da doença de Chagas.

As diferentes populações do *T. cruzi* também apresentam distintos perfis de curva de parasitemia (Brener, 1977; Carneiro *et al.*, 1991). Entretanto, o padrão da curva de parasitemia é característico e estável para cada população do parasito (Brener *et al.*, 1974; Brener, 1977). Desta forma, a avaliação das curvas de parasitemia fornece importantes informações relativas à variabilidade biológica entre as populações do *T. cruzi*.

Andrade (1974), avaliando vários parâmetros biológicos, tais como tropismo tecidual, nível de parasitismo sangüíneo, morfologia dos tripomastigotas sangüíneos, virulência e patogenicidade de cepas do *T. cruzi*, demonstrou a existência de uma identidade desses caracteres entre grupos de cepas do parasito. A autora sugeriu que as populações do *T. cruzi* poderiam ser agrupadas levando em consideração suas características biológicas (Andrade *et al.*, 1970; Andrade, 1974).

Posteriormente, Andrade & Magalhães (1997), criaram o termo Biodema para agrupar populações do *T. cruzi* que apresentassem padrões de comportamento biológico semelhantes, sendo estabelecidos três tipos: Biodema ou Tipo I - (cepa Y e Peruviana) de multiplicação rápida, com picos de parasitemia e mortalidade altos e precoces, predominância de formas finas e reticulotropismo na fase aguda da infecção; Biodema ou Tipo II - (16 cepas isoladas no Recôncavo Baiano) de multiplicação lenta, picos de parasitemia irregulares, ocorrendo entre 12^o e 20^o dias, predominância de formas largas ao longo da infecção, mas com formas finas em pequeno número na fase inicial, e

tropismo predominante para o miocárdio; Biodema ou Tipo III - (cepa Colombiana) de multiplicação lenta, altos picos de parasitemia entre o 20^o e 30^o dia de infecção, baixas taxas de mortalidade, predominância de formas largas ao longo da infecção com envolvimento predominante do músculo esquelético.

A variabilidade biológica entre as cepas de *T. cruzi* pode, também, ser observada em estudos de susceptibilidade a drogas. As diferenças na eficácia da quimioterapia podem estar relacionadas a diversos fatores como o tipo de cepa predominante em cada área geográfica (Filardi & Brener, 1987). Uma outra característica bem conhecida, envolvida na resistência à quimioterapia é o elevado grau de diversidade genética das cepas de *T. cruzi* (Toledo *et al.*, 2003). O modelo de evolução clonal postulado para o *T. cruzi* pressupõe uma correlação entre a divergência filogenética dos genótipos clonais de *T. cruzi* e suas propriedades biológicas, incluindo sua sensibilidade às drogas (Revollo *et al.*, 1998). Em estudos que consideravam a susceptibilidade a drogas, Andrade *et al.*, (1985, 1992), constataram que cepas do Biodema I e II (*T. cruzi* II) apresentavam uma elevada ou parcial sensibilidade ao benznidazol (Bz) e ao nifurtimox, enquanto o Biodema III (*T. cruzi* I) exibiu um elevado grau de resistência a essas drogas. Toledo *et al.* (2003, 2004 a, b), avaliando a ação do Bz em camundongos BALB/c observaram que os clones pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* I foram totalmente resistentes ao tratamento e aqueles pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* II apresentaram diferentes graus de sensibilidade. Fatores relacionados às características intrínsecas do parasito e do hospedeiro, provavelmente contribuem para o aparecimento das diversas manifestações clínicas da doença de Chagas. Algumas evidências têm demonstrado também que o *T. cruzi* possui grande capacidade de adaptação às modificações do meio ambiente (Pacheco & Brito, 1998) podendo o parasito ser composto de populações geneticamente heterogêneas (Lambrecht, 1965; Tibayrenc & Ayala, 1988). Neste caso, esta heterogeneidade pode ser um dos fatores que modula a doença.

1.2. Variabilidade genética do *T. cruzi*

O modelo da genética do *T. cruzi* proposto por Tibayrenc e Ayala (1988) é de que este protozoário possui uma estrutura e evolução clonal. Tal modelo implica que

a reprodução sexual ou recombinação genética é um fenômeno extremamente raro ou ausente nesta espécie; tão raro que não é capaz de impedir a existência de clones naturais estáveis no tempo e no espaço, mesmo após sofrer pressões do hospedeiro e/ou ambientais. Tal modelo foi proposto após a caracterização por isoenzimas (um total de 15 loci enzimáticos) de uma mostra representativa (mais de 500 estoques) de populações do *T. cruzi* isoladas do homem, reservatórios animais e vetores, provenientes de diversos países da América Latina, inclusive do Sul dos Estados Unidos. Nesse estudo foram encontrados 43 grupos genéticos distintos ou zimodemas (termo introduzido por Barret *et al.*, (1980) em referência a “populações de *T. cruzi* que apresentam o mesmo perfil de isoenzimas”, que os autores denominaram de “clones naturais”. Estes clones naturais ou “clonets” são evolucionariamente distantes entre si (distância de Jacard – medida aproximada das diferenças de alelos entre as cepas ou clones estudados) e especialmente dispostos na rede de Wagner (Tibayrenc *et al.*, 1986). Posteriormente, Tibayrenc & Brenière (1988) verificaram que entre o grande número de clones naturais encontrados, 4 parecem ubiquistas, por terem sido encontrados com mais frequência nos mais diversos hospedeiros e localidades constituindo um total de 53,7% dos isolados analisados. Tais clones foram denominados “clones maiores” 19/20, 39 e 32. Mais tarde, Tibayrenc *et al.* (1993) utilizaram pela primeira vez o RAPD (DNA polimórfico ampliado aleatoriamente) no estudo do polimorfismo de DNA em protozoários patogênicos, inclusive o *T. cruzi*, verificando a existência de correlação entre o perfil de RAPD e o de isoenzimas, e também a existência de variações genéticas significativas dentro de um mesmo zimodema. Isto favorece mais uma vez a hipótese da estrutura clonal do *T. cruzi*.

Considerando que o *T. cruzi* apresenta evolução predominantemente clonal (Tibayrenc *et al.*, 1993), espera-se uma evolução não-independente entre diferenças biológicas e divergência genética entre os clones naturais. Isso pressupõe que clones geneticamente mais próximos apresentariam características biológicas e clínicas semelhantes entre si, enquanto clones geneticamente mais distantes apresentariam propriedades distintas.

A hipótese subjacente ao modelo clonal proposto por Tibayrenc & Ayala (1988) é de que os principais clones (19, 20, 39 e 32) têm papel importante na patologia e na epidemiologia da doença de Chagas, merecendo atenção especial. A hipótese

fundamental que tem sido investigada é a existência de correlação entre a divergência filogenética do parasita (ou distância genética) e as propriedades clínicas fundamentais.

Trabalhando neste sentido Laurent *et al.*, (1997) analisaram o comportamento biológico (crescimento em cultura celular e acelular, e infectividade e virulência para camundongos), de 16 estoques clonados do *T. cruzi*, pertencentes aos três grupos genéticos principais (19, 20 e 39). Os autores verificaram diferenças significativas, com relação aos parâmetros analisados, entre os grupos genéticos 19 e 39, e entre os grupos 20 e 39.

Posteriormente, Revollo *et al.*, (1998), analisaram 21 estoques clonais de *T. cruzi* pertencentes aos genótipos 19, 20, 39 e 32, avaliando o comportamento dos mesmos em culturas celulares e acelulares. De um modo geral, clones dos genótipos 19 e 20 crescem mais facilmente em cultura, são mais virulentos para camundongos, são mais resistentes a drogas quando comparados com clones do grupo 32, que por sua vez, apresentam menor intensidade para todas essas propriedades. Dezesesseis desses clones tinham sido estudados por, Laurent *et al.* (1997) e corroboram com os resultados obtidos.

O mesmo aconteceu em relação à infectividade, diferenciação e intensidade do parasitismo em infecções experimentais de *Triatoma infestans* (Lana *et al.*, 1998), nas quais foi constatada uma forte correlação entre marcadores genéticos e propriedades biológicas do parasito. Clones do genótipo 19/20 são infectivos para o inseto vetor e apresentam maior taxa de diferenciação e produção de flagelados, quando comparados com clones pertencentes aos genótipos 39 e 32.

Do mesmo modo, Toledo *et al.*, (2002) demonstraram, uma forte correlação entre a divergência filogenética de populações do *T. cruzi* e as suas propriedades biológicas. Os autores, utilizando 20 estoques clonais, pertencentes aos genótipos 19, 20, 39 e 32, avaliaram comparativamente 14 parâmetros biológicos em camundongos BALB/c infectados com parasitos pertencentes aos diferentes genótipos, durante a fase aguda e crônica da infecção. Os autores demonstraram que animais inoculados com parasitos pertencentes a genótipos geneticamente próximos (19/20 ou 39/32) apresentaram menor número de diferenças biológicas significativas em relação aos geneticamente distantes (19 ou 20 versus 32 ou 39). Os clones do genótipo 20 foram os mais virulentos e patogênicos na fase aguda da infecção, enquanto clones do

genótipo 39 apresentaram parasitemias mais heterogêneas. Além disso, apenas nos animais infectados com clones do genótipo 39 foi detectado parasitismo tecidual durante a fase crônica da infecção, contudo, sem correlação com a intensidade do processo inflamatório. Clones do genótipo 32 foram menos virulentos e patogênicos para camundongos.

Mais recentemente, Toledo *et al.* (2003, 2004a,b) avaliaram a ação do Bz em infecções experimentais em camundongos BALB/c, observando que clones do genótipo 20 foram totalmente resistentes ao tratamento, enquanto clones do genótipo 19 apresentaram diferentes graus de sensibilidade ao fármaco. Dois padrões de resposta ao Bz foram observados para o genótipo 39, que apresentaram clones sensíveis e resistentes ao tratamento. Esse comportamento ambíguo foi observado também para as propriedades biológicas desses parasitos, o que pode ser devido ao fato desses clones serem geneticamente híbridos. Clones do genótipo 32 apresentaram um típico padrão de susceptibilidade ao Bz. Quando esses estoques são agrupados nas duas linhagens genéticas do parasito, observa-se que clones pertencentes ao *T. cruzi* I são mais resistentes ao tratamento, que os clones pertencentes ao *T. cruzi* II, em ambas as fases da infecção. Por outro lado, Villareal *et al.* (2004), utilizando análises de RAPD e eletroforese de isoenzimas de 16 clones naturais do *T. cruzi*, não conseguiram estabelecer correlação, *in vitro*, entre susceptibilidade ao Bz e a distância filogenética do parasito.

Estes resultados, analisados em conjunto, enfatizam a crucial importância de considerar a diversidade filogenética dos clones naturais do *T. cruzi* em todos os estudos referentes a diagnóstico, biologia, patogenicidade, desenho de drogas e vacinas, levantamentos epidemiológicos e diversidade clínica da doença de Chagas, uma vez que, ao analisar tanto a resposta à terapêutica quanto as propriedades biológicas do parasito, observa-se uma polaridade ou grande diversidade destas propriedades entre grupos genéticos distintos porém existe grande desvio padrão entre amostras de um mesmo grupo genético.

1.3. Formas clínicas da doença de Chagas

A doença de Chagas humana é amplamente distribuída na maioria dos países do Continente Americano, sendo encontrada desde o México ao Sul da Argentina e do Chile (WHO, 2002). Estima-se que 13 milhões de pessoas habitantes da América Central e do Sul estejam infectadas pelo *T. cruzi*, e que ocorrem 1400 mortes anuais em decorrência de danos irreversíveis ao coração e trato digestivo. 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 (WHO, 2005).

A fase aguda da doença de Chagas pode ser sintomática ou assintomática . Os casos sintomáticos clássicos foram detectados principalmente em crianças com até 10 anos. Entretanto, a maioria dos casos agudos da doença de Chagas são assintomáticos ou apresentam sintomatologia bastante discreta, não sendo portanto normalmente detectados nesta fase da doença. A duração da fase aguda é de 4 a 12 semanas, após este tempo a febre ou outro sintoma dominante tende a desaparecer, paralelamente, ocorre um progressivo decréscimo da parasitemia (Prata, 2001; Rocha *et al.*, 2003).

Nos casos sintomáticos, os sintomas iniciam-se aproximadamente uma semana após a inoculação. Nesta fase, o indivíduo pode apresentar sinais relevantes como febre, linfadenopatia, e sinais de porta de entrada, como um complexo oftálmico-ganglionar (sinal de Romanã) ou chagoma de inoculação. Ainda, é possível que alguns indivíduos apresentem meningoencefalite ou uma miocardite aguda, caracterizada por uma intensa reação inflamatória adjacente à ruptura dos ninhos de amastigotas (após instalação do parasita no miocárdio). Estas manifestações podem, com uma baixa frequência, ocasionar a morte do indivíduo durante a fase aguda da doença de Chagas, sendo esta mais comum em crianças (Rassi *et al.*, 2000).

A fase crônica da doença de Chagas inicia-se aproximadamente três meses após a infecção inicial (Prata, 2001). Nesta fase, os parasitos tornam-se dificilmente detectáveis na corrente sanguínea, sendo necessário a utilização de métodos parasitológicos, como xenodiagnóstico (Bronfen *et al.* 1989), hemocultura (Chiari *et al.* 1989), ou moleculares, como a reação em cadeia da polimerase – PCR (Jones *et al.*, 1993; Vago *et al.* 1996) para sua detecção. Alternativamente, o diagnóstico pode ser realizado de forma indireta, através da detecção de anticorpos específicos no sangue

periférico (Luquetti,1990). Nesta fase podem ser detectadas diferentes formas clínicas da doença de Chagas forma indeterminada ou assintomática, forma cardíaca, forma digestiva, ou mais raramente, a forma mista (Prata, 1999).

A forma crônica indeterminada ou assintomática é caracterizada pela presença da infecção (revelada por testes parasitológicos e sorológicos), e pela ausência de sintomas e anormalidades radiológicas ou eletrocardiográficas (coração, esôfago e cólon). É a forma clínica mais comum nas áreas endêmicas, podendo persistir o resto da vida de um grande número de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. Sua evolução para a forma crônica sintomática é observada em uma alta percentagem nos indivíduos geralmente após 10-20 anos de infecção, sendo esta evolução de caráter lento e progressivo.

No Brasil, 20% a 30% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma cardíaca, apresentando sinais clínicos como arritmias, disfunção de contratilidade miocárdica, na condução do estímulo elétrico, tromboembolismo, além da ocorrência da morte súbita. Do ponto de vista epidemiológico a cardiopatia crônica é a forma clínica mais importante da doença de Chagas, devido a sua alta morbi-mortalidade e conseqüente impacto médico-social.

Já nos indivíduos portadores da forma digestiva observa-se a presença de infiltrado linfocitário na submucosa e nos plexos mioentéricos do trato digestivo culminando, em parte, em alterações funcionais como perda da motilidade e aumento do diâmetro e largura do órgão. Estas alterações caracterizam o megaesôfago e o megacólon chagásicos, conduzindo estes indivíduos a uma vida de restrições nutricionais e uma redução em sua qualidade de vida (Prata *et al.*, 2001).

1.4. Imunopatologia da doença de Chagas

A resposta imune do hospedeiro apresenta importante papel no controle da infecção pelo *T. cruzi*. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas por outro lado, eventualmente contribui para o aparecimento das manifestações clínicas crônicas devido às respostas auto-ímmunes (Leon & Engman, 2001). No entanto, tanto o parasito quanto a resposta imune podem persistir

indefinidamente no hospedeiro e as lesões teciduais resultantes da atividade prolongada de ambos causam alterações morfofuncionais características da doença (Tarleton, 2001).

Na doença de Chagas, o mais importante sinal para a ativação dos macrófagos é o IFN- γ , que desempenha papel significativo na destruição do *T. cruzi* (Plata *et al.*, 1984; Murray *et al.*, 1985). Esta sinalização é geralmente induzida por moléculas antigênicas na superfície das formas tripomastigotas do parasito. A produção de IFN- γ na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos está associada à resistência (Reed, 1988; Nabors *et al.*, 1991; Minoprio *et al.*, 1993) e a sua depleção exacerba a parasitemia e aumenta a mortalidade (Torrico *et al.*, 1991; Petray *et al.*, 1993). Similarmente, IL-12, relacionada à resposta Th1, promove resistência em camundongos (Silva *et al.*, 1998). Por outro lado, o oposto acontece com o padrão Th2, onde a IL-10 está associada à susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* em camundongos (Silva *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1994). O TNF- α , produzido pelos macrófagos durante a infecção, interage de forma sinérgica com a IL-12 ou com o IFN- γ , ativando outros macrófagos a sintetizarem o óxido nítrico, um importante fator tripanocida. (Miller *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003).

A imunidade celular também é importante na defesa contra o *T. cruzi* e as células T constituem a maior parte das células no infiltrado inflamatório do miocárdio de pacientes com a forma cardíaca da doença (Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997). Animais deficientes destas células são ainda mais susceptíveis à infecção (Tarleton *et al.*, 1996). A necessidade das células T CD4 pode estar relacionada à sua capacidade em auxiliar na produção de anticorpos e citocinas como o IFN- γ (Brenner, 1986; Tarleton *et al.*, 1996).

A imunidade humoral é evidenciada pela presença de anticorpos específicos detectados tanto na infecção humana quanto nos diferentes modelos experimentais. Em infecções agudas, no modelo murino, ocorre uma intensa ativação policlonal de linfócitos B, com hiperprodução de imunoglobulinas (Minoprio *et al.*, 1989). Contudo, a distribuição de isotipos permanece invariável ao longo do curso da infecção e é caracterizada pela predominância de IgG2a e IgG2b (D'Império *et al.*, 1986).

Existem vários fatores que contribuem direta ou indiretamente para lesões produzidas pela infecção por *T. cruzi*. Alguns desses fatores são inerentes ao parasita

(interação parasita-hospedeiro, tropismo, virulência, constituição genética e antigênica, número de inóculo do parasita, reinfeção, cepa do parasita, seleção clonal, populações mistas, etc.); outros são relacionados ao hospedeiro (constituição genética, sexo, idade, raça, estado nutricional, resposta imune, etc) (Tafari, 1999). Além disso, o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro pode ser drasticamente alterado por um quadro de imunossupressão, sendo a única possibilidade de ocorrência da recrudescência da doença de Chagas crônica.

1.5. A doença de Chagas em indivíduos imunocomprometidos

A recrudescência do parasitismo durante a fase crônica da doença de Chagas apresenta-se associada aos indivíduos imunocomprometidos devido à infecção por HIV/AIDS, à ação de drogas imunossupressoras utilizadas durante o tratamento do câncer ou após transplantes. Nestes casos, a doença pode adquirir aspectos clínicos mais graves do que nas formas agudas resultantes de transmissão por triatomíneos ou pós-transfusionais. A literatura registra casos de recrudescência da doença ocorrendo em indivíduos com câncer hematológico (leucemias e linfomas), transplantes de medula óssea, rins e coração, em indivíduos usando altas doses de corticóides e outros imunossupressores (Stolf *et al.*, 1987; Ferreira, 1999; Amato *et al.*, 1997; Genty *et al.*, 1994; Sartori *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, novos aspectos da patologia da doença de Chagas têm sido descritos em indivíduos imunossuprimidos. A literatura registra a ocorrência de formas graves da doença, notadamente meningoencefalites e/ou miocardite relacionados com a reativação do parasita em indivíduos com imunossupressão severa (Del Castilho, 1990, Glukstein *et al.*, 1992, Ferreira *et al.*, 1999, Pacheco *et al.*, 1998). Também têm sido reportados um grande número de casos (cerca de 50) de envolvimento do sistema nervoso central (SNC) em indivíduos portadores de co-infecção doença de Chagas/AIDS (Ferreira *et al.*, 1991, Rocha *et al.*, 1994), apesar de lesões no SNC serem observadas apenas em um número muito pequeno de indivíduos imunocompetentes (Pittella, 1985). Neste caso, a AIDS, atualmente, é um importante risco para pacientes chagásicos crônicos, pois com o aumento da epidemia HIV/AIDS e a migração de pacientes das zonas rurais para os centros urbanos, a probabilidade de coinfeção

HIV/*T. cruzi* tem aumentado (Madalosso *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005), levando ao aumento do número de pacientes com o vírus da AIDS e doença de Chagas concomitantes. De acordo com Ferreira *et al.* (1999) 6% dos indivíduos HIV positivos submetidos à autópsia em Uberlândia, MG (área endêmica da doença de Chagas), apresentavam, também, reativação da doença de Chagas crônica. Até 2004 foram descritos cerca de 120 casos de co-infecção HIV/*T. cruzi* no Brasil (Relatório Técnico, Ministério da Saúde, 2006).

Segundo Rocha *et al.* (2000) a meningoencefalite ou encefalite aguda por *T. cruzi* representa a forma mais frequentemente relacionada à reativação da doença de Chagas em indivíduos HIV positivos. As características morfológicas dessas patologias parecem assemelhar-se, em termos gerais, na AIDS e em outras causas de imunodepressão. O quadro clínico da doença de Chagas reativada na infecção pelo HIV traduz-se por manifestações gerais de infecção, tais como febre, astenia, anorexia e mialgias, e por sinais e sintomas relacionados à meningoencefalite e à cardites chagásicas agudas (Brener *et al.*, 2000).

Em janeiro 2004 entrou em vigor a nova definição de caso de AIDS em adultos e crianças que inclui a reativação da doença de Chagas como uma condição definidora de AIDS para fins de vigilância epidemiológica no Brasil. Essa questão já havia sido discutida desde a segunda revisão da definição de caso de AIDS em adultos de 1992, cuja ênfase foi dada para a sinalização de que algumas doenças endêmicas no Brasil, como a leishmaniose, a doença de Chagas e a paracoccidiodomicose poderiam ter comportamento oportunista em indivíduos infectados pelo HIV, indicando a necessidade de atenção especial dos serviços de saúde, em termos da assistência e da vigilância, visando o estabelecimento de evidências que permitissem incluí-las no futuro como indicativas de AIDS (Ramos-Junior, 2004).

Desta forma, segundo uma revisão atualizada da definição de casos HIV/AIDS e doença de Chagas, pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças, Atlanta, EUA, a reativação conduz os pacientes infectados pelo *T. cruzi* a manifestações clínicas expressas por miocardite e/ou meningoencefalite (75-90%). Estes relatos tornam-se frequentes na literatura evidenciando o caráter clínico e epidemiológico das formas de imunossupressão pelo HIV ou outros mecanismos imunossupressores (Ramos-Junior, 2004, Ferreira, 1999; Lazo *et al.*, 1998; Ramos, 1999; Rocha *et al.*, 2000; Madalosso

et al., 2004; Corti & Yampolsky, 2006). Dentre os outros mecanismos imunossupressores, encontram-se os fármacos empregados após transplantes convencionais de órgãos sólidos e, em especial na doença de Chagas, transplantes cardíacos (Stolf *et al.*, 1987, 1994; Calabrese, 1999; Bochi *et al.*, 1996; Fiorelli *et al.*, 2005).

Por outro lado, considerando o pior prognóstico e a maior mortalidade precoce da cardiomiopatia chagásica em relação a outras etiologias de insuficiência cardíaca congestiva, o benefício potencial do transplante cardíaco nessa indicação torna-se evidente. Mas o risco da reagudização da forma crônica da doença de Chagas, citado previamente, tem se tornado um forte argumento para a contra-indicação de transplante cardíaco para portadores da doença, principalmente, levando-se em conta a escassez de doadores (Brener *et al.*, 2000).

Interessantemente, a reativação sintomática da doença de Chagas não ocorre em todos os chagásicos crônicos expostos a agentes imunossupressivos (Barousse, 1980, Lopes Blanco *et al.*, 1992). Também entre indivíduos com AIDS têm sido descritos tanto casos de ausência de reativação (Pacheco *et al.*, 1998) como a reativação assintomática da doença de Chagas crônica, detectada apenas pelo aumento do parasitismo sangüíneo (Sartori *et al.*, 2002).

Como o curso da infecção experimental pelo *T. cruzi* é também influenciado pela cepa do parasito e pela resposta do sistema imune do hospedeiro, é razoável supor que a possibilidade de reativação da doença de Chagas crônica, em indivíduos imunossuprimidos, seria também dependente da população do parasito presente, e que esta teria uma importância primordial neste fenômeno. Apesar de ser difícil reproduzir uma situação de imunossupressão, vários agentes imunossupressores têm sido utilizados na tentativa de compreender o fenômeno de reativação da doença de Chagas crônica. A utilização experimental de drogas imunossupressoras demonstrou que o tratamento com ciclofosfamida (Cy), após a infecção pelo *T. cruzi* induz ao aumento da miocardite em camundongos (Kumar *et al.*, 1970, Calabrese *et al.*, 1987), fato confirmado por Andrade *et al.* (1980) em experimentos realizados com cães. Entretanto, Pereira *et al.* (1998) avaliando o fenômeno de recrudescência em camundongos imunossuprimidos com Cy mostraram que diferentes índices de reativação da doença de Chagas crônica podem ser observados em animais infectados

com diferentes cepas de *T. cruzi*. Andrade *et al.* (1997) mostraram que animais infectados com cepas dos Tipos I e II e imunossuprimidos com ciclosporina e azatioprina, não apresentaram reativação da infecção crônica.

2 - Justificativa

Recentemente novos aspectos da imunopatologia da doença de Chagas têm sido descritos em indivíduos imunossuprimidos, alguns deles mostrando lesões fatais no sistema nervoso central, relacionadas com a reativação do parasito. De maneira interessante, a reagudização da doença de Chagas não ocorre em todos os indivíduos expostos a agentes imunossupressivos, podendo ser observada, ainda, reativação da parasitemia sem sintomas clínicos aparentes.

Outra característica da doença de Chagas em indivíduos imunossuprimidos é o rápido desaparecimento dos sintomas clínicos após um episódio de recrudescência com o tratamento específico (Ferreira *et al.*, 1998), mesmo na ausência de cura parasitológica. Entretanto, pouco se sabe sobre o sucesso de uma prevenção secundária pelo tratamento dos indivíduos imunossuprimidos e portadores da doença de Chagas crônica. Neste caso, a avaliação do tratamento específico (utilizando o Bz ou o nifurtimox) abre um interessante campo de estudo na investigação da eficácia do tratamento específico sob circunstâncias de imunossupressão associada à doença de Chagas crônica.

Como o curso da doença de Chagas experimental é altamente influenciado pela população do *T. cruzi* e pela resposta imune do hospedeiro, foi proposto avaliar neste estudo a correlação entre a divergência filogenética (distância genética) do *T. cruzi* e o fenômeno de recrudescência em grupos de camundongos cronicamente infectados e tratados com droga imunossupressora (Cy), bem como avaliar a eficácia do tratamento com Bz na prevenção da reativação da infecção pelo *T. cruzi* em animais imunossuprimidos com Cy. Para esta avaliação foram utilizadas quatro amostras clonadas do *T. cruzi*, caracterizadas fenotípica e genotipicamente. Dois dos clones foram classificados como *T. cruzi* I (pertencentes aos clones principais ou genótipos 19 e 20 – Tibayrenc & Ayala, 1988) e dois classificados como *T. cruzi* II (genótipos 32 e 39 - Tibayrenc & Ayala, 1988).

3- Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* na reativação da doença de Chagas experimental em camundongos Swiss após imunossupressão com ciclofosfamida.

3.2. Objetivos Específicos

- I- Verificar a existência de correlação entre a distância genética do parasito e a reativação da doença de Chagas experimental em camundongos Swiss avaliando os seguintes parâmetros:
 - a) Determinação da percentagem de reativação da parasitemia em camundongos tratados com ciclofosfamida no final da fase aguda e na fase crônica da infecção.
 - b) A intensidade do parasitismo tecidual (coração, cérebro e músculo esquelético) em camundongos submetidos à imunossupressão, comparativamente aos animais controles não imunossuprimidos.
 - c) A intensidade das lesões teciduais (coração, cérebro e músculo esquelético) em camundongos submetidos à imunossupressão, comparativamente aos animais controles não imunossuprimidos.

- II- Verificar se o tratamento com benznidazol (durante as fases aguda e crônica da infecção) altera o índice de reativação da doença de Chagas, após a imunossupressão com ciclofosfamida, avaliando os seguintes parâmetros:
 - a) Determinação da percentagem de reativação da parasitemia em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida, após o tratamento específico.
 - b) A intensidade do parasitismo tecidual (coração, cérebro e músculo esquelético) em camundongos submetidos à imunossupressão, comparativamente aos animais não tratados e imunossuprimidos e dos controles não tratados e não imunossuprimidos.

- c) A intensidade das lesões teciduais (coração, cérebro e músculo esquelético) em camundongos submetidos à imunossupressão, comparativamente aos animais não tratados e imunossuprimidos e dos controles não tratados e não imunossuprimidos.

4- Material e Métodos

4.1. Populações de *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas oito amostras clonadas do *T. cruzi*, obtidas previamente por micromanipulação em laboratório e verificadas visualmente no microscópio. Estas amostras pertencem aos quatro clones naturais (clones principais) 19, 20, 39 e 32, ubíquos e isolados de diferentes hospedeiros e áreas-geográficas da América Latina (Tibayrenc *et al.*, 1986, Tibayrenc & Ayala, 1988).

Anonymous (1999) recomenda que a designação de populações híbridas, como clones do genótipo 39, representados pelos clones Bug2148 cl1 e SO3 cl5, sejam denominados *T. cruzi* até melhor elucidação. Porém, com o objetivo de comparar os nossos resultados com os de Toledo *et al.*, (2003), os clones do genótipo 39 foram incluídos junto com clones do genótipo 32 em *T. cruzi* II. Zingales *et. al.* (1998) descreveu o genótipo 39 como um genótipo homogêneo incluído em *T. cruzi* II, e Barnabé *et al.*(2000) também classifica os clones do genótipo 39 como *T. cruzi* II (DTU 2d). As informações sobre estas populações estão apresentadas no quadro 2.

Quadro 2: Hospedeiros e origem geográfica dos 8 clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos clones principais (genótipos) ubíquos 19, 20, 39 e 32.

Linhagem de <i>T. cruzi</i> *	Genótipos	Clones	Hospedeiros	País	Região	Susceptibilidade ao Benznidazol**	
						FA	FC
I	19	Gamba cl1	<i>Didelphis azare</i>	Brasil	São Paulo	38%	25%
		SP104 cl1	<i>Tiatoma espinolai</i>	Chile	Choquimbo	0%	0%
	20	Cuica cl1	<i>Opossum cuica philander</i>	Brasil	São Paulo	0%	0%
		P209 cl1	Homem, fase crônica	Bolívia	Sucre	0%	0%
II	39	Bug2148 cl1	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	Rio Grande do Sul	0%	0%
		MN cl2	Homem, fase crônica	Chile	Santiago	40%	60%
	32	MVB cl8	Homem, fase crônica	Chile	Santiago	78%	60%
		IVV cl4	Homem, fase crônica	Chile	Santiago	42%	82%

FA= fase aguda FC= fase crônica

*Nomenclatura proposta por Anonymous(1999).

**Toledo *et al.*, 2003

4.2- Animais e infecção

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, com idade entre 28 a 30 dias, pesando aproximadamente 20g, nascidos e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto.

Foram inoculados grupos de 72 animais com cada clone, via intraperitoneal, com 10.000 tripomastigotas sanguíneos/animal (delineamento experimental), contados segundo Brener, (1962). Destes, 32 animais foram utilizados nos experimentos realizados durante a fase aguda, e 40 durante a fase crônica.

A infectividade de cada clone foi verificada pela: (1) presença de parasitos no sangue periférico dos camundongos, através do exame de sangue a fresco; (2) positividade da hemocultura.

4.3. Avaliação da reativação da parasitemia, após a imunossupressão com ciclofosfamida, em camundongos inoculados com os diferentes clones do *T. cruzi*.

Para a avaliação da correlação entre a distância genética (divergência filogenética) do parasito e a reativação da doença de Chagas, em camundongos Swiss, foi realizada a imunossupressão dos animais com Cy no final da fase aguda e, durante a fase crônica da infecção.

Foram infectados 32 camundongos com cada clone do *T. cruzi* utilizado neste estudo, sendo divididos em 4 grupos experimentais: 1- 6 camundongos foram imunossuprimidos 60 dias após a inoculação, ou seja, após a supressão natural da parasitemia; 2- 06 camundongos foram mantidos sem imunossupressão, sendo considerados o grupo controle dos experimentos realizados durante a fase aguda; 3 - 10 camundongos foram imunossuprimidos com Cy 170 dias após a inoculação; 4 – 10 camundongos foram mantidos sem imunossupressão, sendo considerados o grupo controle da fase crônica da infecção.

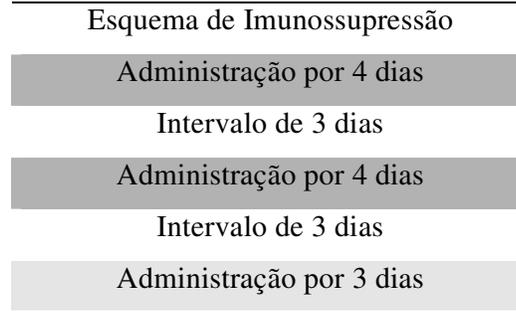
4.4. Avaliação do efeito do tratamento com benznidazol (durante as fases aguda e crônica da infecção) no índice de recrudescência da doença de Chagas, após a imunossupressão com ciclofosfamida.

Para a avaliação do efeito do tratamento com Bz na reativação da parasitemia, devido à imunossupressão com Cy, os animais infectados com os diferentes clones do *T. cruzi* foram tratados durante as fases aguda (10 dias após a inoculação) e crônica (120 dias após a inoculação). Um mês após o término do tratamento os animais foram submetidos à imunossupressão com Cy.

Para esta avaliação foram inoculados 40 animais com cada clone do *T. cruzi* utilizado neste estudo. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: 1- 10 animais tratados com Bz durante a fase aguda da infecção e imunossuprimidos com Cy; 2- 10 animais tratados com Bz durante a fase aguda da infecção; 3- 10 animais tratados com Bz durante a fase crônica da infecção e imunossuprimidos com Cy; 4 - 10 animais tratados com Bz durante a fase crônica da infecção. Como grupo controle não tratado com Bz foram utilizados os mesmos animais avaliados no item anterior, sendo neste caso importante ressaltar que a imunossupressão sempre foi realizada no mesmo período da infecção.

4.5. Esquema de imunossupressão com ciclofosfamida

Para a imunossupressão foi utilizado o imunossupressor Genuxal – Ciclofosfamida fabricado pelo laboratório Baxter Oncology GmbH – Frankfurt – Alemanha. A administração da Cy foi realizada por via intraperitoneal, na concentração de 50mg/Kg de peso corporal . O medicamento foi diluído em salina e cada camundongo recebeu 11 doses do imunossupressor, divididas em três ciclos como mostrado no Quadro 3.

Quadro 3: Esquema de imunossupressão com ciclofosfamida**4.6. Determinação do índice de reativação da doença de Chagas**

Para a determinação do índice de reativação da parasitemia dos animais imunossuprimidos foi realizada a coleta de sangue diariamente e a parasitemia foi quantificada de acordo com Brener (1962).

4.7. Esquema de tratamento com benznidazol

Para o tratamento foi utilizado o agente quimioterápico benznidazol [2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitro-1-imadazolacetamida)] (Roche), administrado por via oral, em doses diárias de 100 mg/Kg de peso corporal, durante 20 dias consecutivos (Filardi & Brener, 1987). A droga foi ressuspendida em água, utilizando a goma arábica como agente suspensivo, de tal maneira que 0,25mL foi administrado segundo Marretto & Andrade (1994).

O tratamento foi iniciado no 10^o dia de infecção (após a detecção do parasita) nos animais submetidos ao tratamento durante a fase aguda, e 120 dias após a inoculação, naqueles tratados durante a fase crônica.

Um mês após o término do tratamento foi realizada a hemocultura e a coleta de sangue a fresco para a realização da sorologia por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Em seguida os animais foram submetidos à imunossupressão com Cy. O índice de recrudescência da parasitemia foi determinado pela positividade do exame de sangue a fresco durante a imunossupressão com Cy.

A determinação da cura parasitológica foi realizada pelo exame de sangue a fresco após a imunossupressão Cy. Nos animais que não apresentaram reativação da

parasitemia a cura parasitológica foi determinada pela hemocultura e sorologia convencional, através do teste sorológico ELISA.

4.8. Exames parasitológicos

4.8.1. Exame de sangue a fresco

O exame de sangue a fresco foi realizado a partir do quarto dia de infecção. Quando foi observada a presença de flagelados no sangue examinado estes foram quantificados de acordo com a técnica de Brener (1962), sendo traçadas as curvas de parasitemia dos grupos controles e dos imunossuprimidos.

4.8.2. Hemocultura

A hemocultura foi realizada aos 30 dias após o tratamento nos animais que apresentaram o exame de sangue a fresco negativo, antes e após a imunossupressão com Cy. Para tal 0,4 mL de sangue foram coletados assepticamente no seio venoso retro-orbital e distribuídos em um tubo falcon de 15mL contendo 3mL de LIT (Liver Infusion Tryptose). Os tubos foram incubados em estufa a 28°C e homogeneizados a cada 48h. As hemoculturas foram examinadas quinzenalmente até 90 dias após a sua realização.

4.9. Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA

Os testes de ELISA foram realizados com amostras de soro coletadas 30 dias após o tratamento (antes de iniciar a imunossupressão), sendo que os grupos de animais não tratados acompanharam o mesmo período para coleta dos grupos tratados.

Foram coletados 0,4 mL de sangue no seio venoso retro-orbital dos animais e transferidos para tubos eppendorf de 1,5mL, sendo estes centrifugados na microcentrífuga a 3000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e estocado a -20°C.

A ELISA foi realizada segundo a metodologia descrita por Voller *et al.* (1976), utilizando microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, sensibilizadas com

100µL/poço, de antígeno da cepa Y diluído em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas por 12 horas a 4°C.

Após a incubação o excesso de solução antigênica foi desprezado e as placas lavadas quatro vezes com solução de lavagem (PBS-Tween). Em seguida as placas foram bloqueadas com 100µL/poço de PBS com soro fetal bovino e incubadas por 30 minutos a 37°C. Depois, foram submetidas a quatro lavagens com solução de lavagem.

Na etapa seguinte as placas foram incubadas com 100µL/poço de soro (1:80) durante 45 minutos a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem e incubadas por 45 minutos a 35°C, com 100µL/poço de conjugado anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase e diluído em PBS-Tween 0,05%. Em seguida, as placas foram novamente lavadas quatro vezes, e foram adicionadas às mesmas 100µL/poço de solução de substrato (3mg de Orto-fenileno-diamino [OPD] + 3µL de H₂O₂ vol.30 +15mL de tampão citrato-fosfato) e depois incubadas a 37°C por 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 32µL de H₂SO₄ 2,5M.

A leitura da reação foi feita em leitor de ELISA (SOFT- MAX PRO 4.0 – Life Sciences edition) com filtro de 490nm. Em todas as placas foram incluídos 2 soros controle positivos e 10 negativos. A absorbância discriminante foi determinada pela média da absorbância dos 10 soros controle negativos somados a dois desvios padrão.

4.10. Análise Histopatológica

Seis camundongos de cada grupo foram sacrificados uma semana após o término da imunossupressão, e os grupos não imunossuprimidos foram sacrificados nos mesmos dias para a realização de análises comparativas.

Para a avaliação do parasitismo tecidual foram utilizadas preparações coradas pela Hematoxilina-eosina e pela técnica imuno-histoquímica de peroxidase-antiperoxidase (PAP) para identificação de amastigotas do *T.cruzi*, descrita por Barbosa *et al.* (1985).

4.10.1. Hematoxilina-Eosina

A avaliação do processo inflamatório, das lesões degenerativas e do parasitismo no coração e cérebro foram realizadas em cortes corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Os fragmentos do coração e cérebro foram fixados em formol a 10% e processados rotineiramente. Subseqüentemente, cortes de 5µm de cada fragmento foram corados pela HE e examinados em microscópio ótico, utilizando a objetiva de 40x. Para a avaliação do parasitismo tecidual foi realizada uma análise semiquantitativa em 60 campos microscópicos (c.m) utilizando-se a seguinte classificação: + = discreto, até 5 ninhos em 60 c.m; ++ = moderado, de 6 a 14 ninhos em 60 c.m; +++ = intenso, de 15 a 20 ninhos em 60 c.m; ++++ = acentuado, mais de 20 ninhos em 60 c.m. Para a avaliação das lesões teciduais foi também realizada uma análise semiquantitativa, de acordo com o seguinte critério: + = discreto, células inflamatórias isoladas ou em pequenos focos; ++ = moderado, infiltrado inflamatório seções do tecido; acentuado = ++++ infiltrado inflamatório multifocal ou infiltrados difusos em largas seções do tecido.

A avaliação das alterações histopatológicas e quantificação do parasitismo dos tecidos foram realizadas em 100 campos microscópicos, utilizando-se a objetiva de 40 x. Os resultados histopatológicos de inflamação e necrose foram classificados como ausentes (-), discreto (+), moderado (++) , e intenso (+++).

4.10.2. Técnica Imuno-histoquímica -PAP para identificação do *T. cruzi*

Os cortes histológicos foram desparafinizados em duas trocas de xilol de 15 minutos cada, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por três minutos cada. Seguiu-se lavagem em água corrente por cinco minutos e em PBS pH 7,2-7,4 por cinco minutos.

Posteriormente, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena em um banho de 30 minutos em PBS/Peróxido de Hidrogênio (240 mL de PBS e 10 mL de Peróxido de Hidrogênio a 30%) à temperatura ambiente. Os cortes histológicos passaram, então, por três banhos consecutivos, de cinco minutos cada, em PBS.

Após a secagem das bordas dos cortes com papel absorvente, aplicou-se o soro normal de cabra diluído na proporção 1:40 em PBS, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações cruzadas inespecíficas.

Em seguida secou-se o excesso de soro normal de cabra e as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (anti-*T. cruzi* produzido em coelho, diluição 1:500 em PBS/Albumina 0,1%) em câmara úmida à 37°C, por uma hora. Seguiram-se três banhos de cinco minutos cada em PBS.

As bordas dos cortes foram secas novamente e aplicou-se o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, produzido em cabra). A seguir, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos. As lâminas retiradas da câmara úmida receberam novamente três banhos de cinco minutos cada, em PBS.

Procedeu-se a secagem de suas bordas, a aplicação do complexo peroxidase-antiperoxidase (PAP diluído 1:250 em PBS/Albumina 0,1%) e as lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Seguiram-se três banhos de cinco minutos cada, em PBS.

A revelação da reação da peroxidase foi obtida através da incubação em solução de DAB (50 mg de Diaminobenzidina em 250 mL de PBS e 500 µl de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante cinco minutos. No intuito de interromper a revelação os cortes foram mergulhados em PBS por três vezes. Posteriormente foram lavados em água corrente por cinco minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris por um minuto, lavados em água corrente por cinco minutos e desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e montados em resina.

4.11. Análise Estatística

Para a análise estatística dos parâmetros de período pré-patente (PPP) e período patente (PP) foi utilizado o teste Mann-Whitney, segundo Conares (1980). A parasitemia foi analisada pelo teste Kolmogorov-Sminorv (Conares, 1980), que compara a área das curvas e a análise das médias das absorbâncias obtidas da técnica de ELISA foram comparadas através do teste de Student.

As taxas de mortalidade e os índices de reativação foram avaliados pelo teste qui-quadrado de Snedecor & Cochran (1989) e análises histopatológicas foram avaliadas com os testes de Mann-Whitney e Krowskal Wallis.

Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95%, sendo que diferenças significativas foram registradas quando o nível P de significância foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$).

5-Resultados

5.1. Parâmetros Biológicos - infectividade, mortalidade, período patente e período pré-patente.

Para a avaliação dos parâmetros biológicos foram consideradas as duas linhagens genéticas do parasito: *T. cruzi* I: clones Gamba c11, SP104 c11, Cuica c11 P209 c11 e *T. cruzi* II: clones Bug2148 c11, MN c12, MVB c18 e IVV c14.

Foram observados 100% de infectividade entre os animais inoculados com todos os clones do *T. cruzi*, independente do grupo genético, e todos os animais, com exceção daqueles inoculados com o clone SP104 c11, apresentaram o exame de sangue a fresco positivo. No clone SP104 c11 4 animais (67%) apresentaram o exame de sangue a fresco positivo, e em 2 (33%) a infecção foi confirmada através da hemocultura.

A taxa de mortalidade foi de 16,7%, 0%, 0% e 66,7% entre os animais inoculados com os clones Gamba c11, clone SP104 c11, Cuica c11 e P209 c11, respectivamente (grupo *T. cruzi* I), enquanto não foi observada mortalidade para os animais inoculados com os clones pertencentes ao grupo *T. cruzi* II.

O período pré-patente (PPP) variou de 6 a 14 dias entre os animais inoculados com os clones pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* I, observando-se maior PPP (14 dias) para os animais infectados com os clones Gamba c11 e SP104 c11, e 12 dias para os animais infectados com o clone Cuica c11. O menor PPP (6 dias) foi observado entre os animais inoculados com o clone P209 c11. Para os animais inoculados com clones pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* II o PPP variou entre 7 a 11 dias, sendo de 7 dias para os animais inoculados com o clone MVB c18, 8 dias para os animais inoculados com o clone Bug2148 c11, 9 dias para aqueles inoculados com o clone MN c12 e 11 dias para aqueles inoculados com clone IVV c14.

O período patente (PP) observado entre os animais inoculados com os clones pertencentes ao grupo *T. cruzi* I, foi maior para os animais inoculados com os clones, Cuica c11 Gamba c11 e P209 c11 (71, 65 e 52 dias, respectivamente). Entre os animais inoculados com o clone SP104 c11 o período de patência da parasitemia foi de 7 dias. Os animais inoculados com os clones pertencentes ao grupo *T. cruzi* II apresentaram um PP de 4, 6, 9 e 10 dias para os animais inoculados com os clones MVB c18, IVV c14, MN c12 e Bug2148 c11, respectivamente.

5.2. Curva de parasitemia padrão dos diferentes clones pertencentes aos grupos genéticos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II

O gráfico 1 representa as curvas de parasitemia, representada pela média de parasitas encontrados em de camundongos inoculados com os clones pertencentes ao grupo *T. cruzi* I: Gamba cl1(Graf. 1A), SP104 cl1(Graf.1B), Cuica cl1(Graf. 1C) e P209 cl1(Graf. 1D).

Os clones pertencentes ao grupo *T. cruzi* I induziram curvas com perfis semelhantes, com exceção do clone SP104 cl1. No grupo de animais inoculados com o clone Gamba cl1 (Graf. 1A) o pico máximo de parasitemia ocorreu no 35^o dia de infecção, atingindo 73.000 tripomastigotas/0,1mL de sangue. A partir do 48^o dia de infecção foi observada uma redução dos níveis de parasitemia que persistiu em níveis baixos até o 79^o dia de infecção. Por sua vez, nos animais inoculados com o clone SP104 cl1 (Graf. 1B), pertencente ao mesmo grupo genético que o clone Gamba cl1 (genótipo 19) foram observados baixos níveis de parasitemia com pico no 16^o dia de infecção, quando foram detectados 833,33 tripomastigotas/0,1mL de sangue (Graf. 1B).

Entre os animais inoculados com o clone Cuica cl1 (Graf. 1C), detectou-se elevados níveis de parasitemia, com pico de 493.333 tripomastigotas/0,1mL de sangue no 30^o dia de infecção. Após o 40^o dia de infecção foi observada uma redução dos níveis de parasitemia. Perfil semelhante de curva de parasitemia foi observado nos animais infectados com o clone P209 cl1 (Graf. 1D), porém com pico de parasitemia mais elevado (6.094.000 tripomastigotas/0,1mL de sangue) detectado no 30^o dia de infecção.

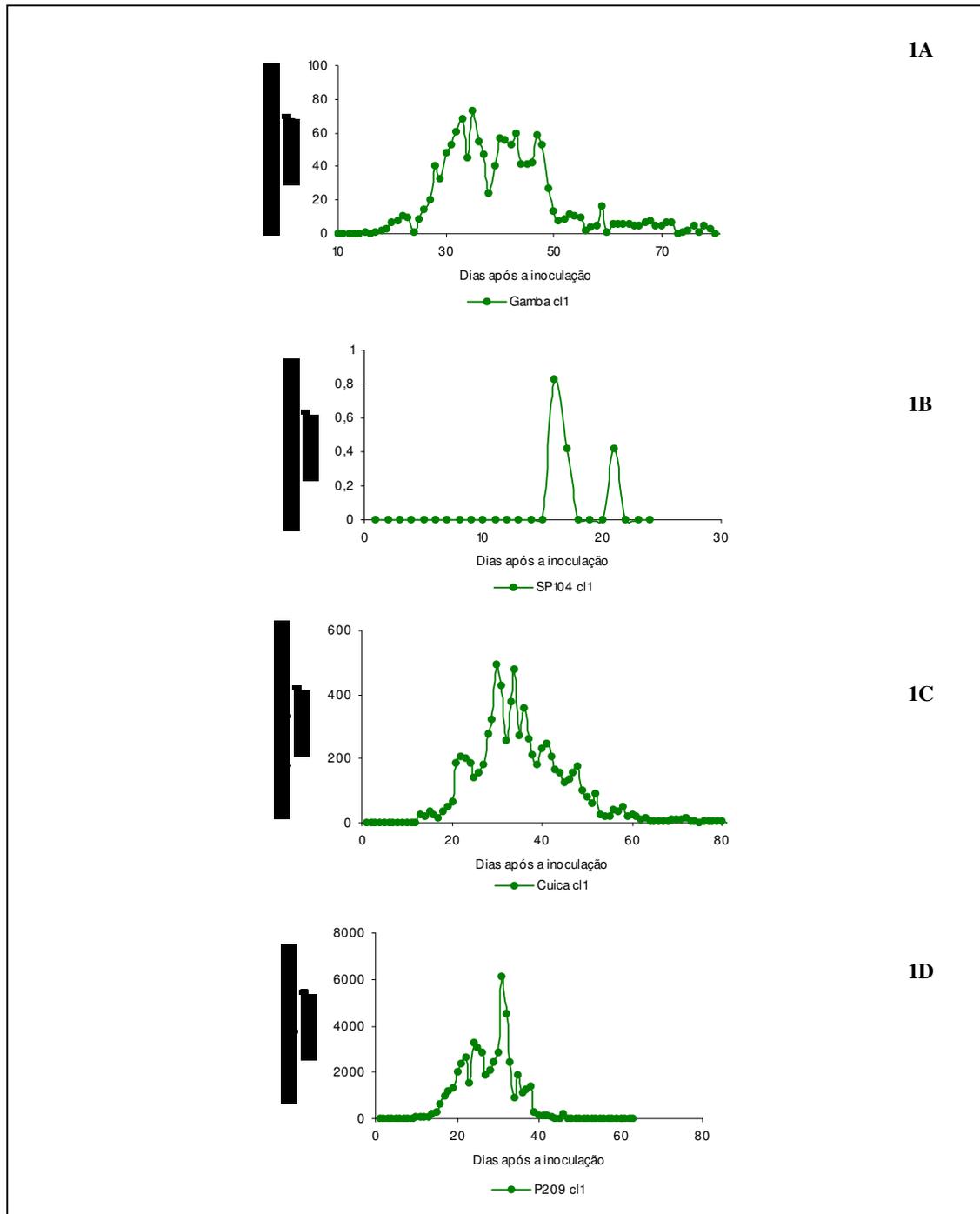


Gráfico 1: Curvas de parasitemia realizadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneas dos clones pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* I: Gamba cl1(1A), SP104 cl1 (1B), Cuica cl1 (1C) e P209 cl1(1D).

O gráfico 2 representa as curvas de parasitemia obtidas de camundongos inoculados com os clones pertencentes ao grupo *T. cruzi* II. A análise destas curvas demonstrou similaridade entre os clones do grupo. Os animais inoculados com os clones Bug2148 cl1 (Graf. 2A) e MN cl2 (Graf. 2B) pertencentes ao genótipo 39, e com os clones MVB cl8 (Graf. 2C) e IVV cl4 (Graf. 2D), pertencentes ao genótipo 32 (grupos geneticamente próximos), apresentaram curvas de parasitemia muito semelhantes, com níveis de parasitemia baixos (pico máximo de 2500 a 6000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue), tendo sido observada a negatificação da parasitemia aos 20 dias de infecção.

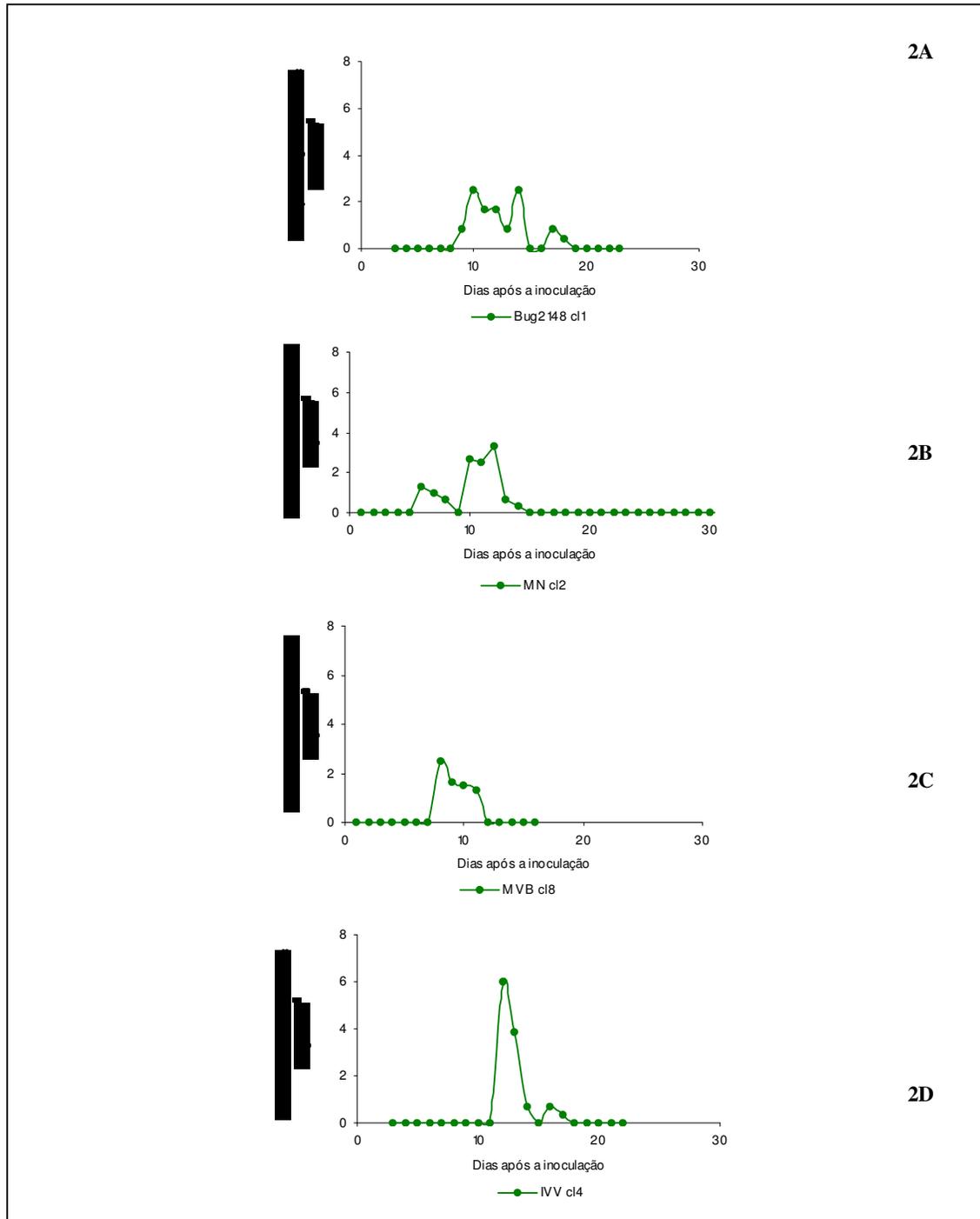


Gráfico 2: Curvas de parasitemia realizadas em camundongos Swiss inoculados com 10.000 tripomastigotas sanguíneas dos clones pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* II: Bug2148 cl1 (2A), MN cl2 (2B), MVB cl8 (2C) e IVV cl4(2D).

5.3. Índice de reativação da parasitemia de camundongos inoculados com parasitos pertencentes aos grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II após imunossupressão com ciclofosfamida

O índice de reativação da parasitemia foi determinado pela positividade do exame de sangue a fresco durante o esquema de imunossupressão com Cy.

O grupo genético *T. cruzi* I apresentou 77,5% de reativação quando imunossuprimidos ao final da fase aguda e 51,25% quando a imunossupressão foi realizada na fase crônica da infecção. Em relação aos animais inoculados com os clones pertencentes ao grupo genético *T. cruzi* II observou-se a reativação em apenas um animal inoculado com o clone IVV c14 imunossuprimido durante a fase aguda da infecção (4,7%) e na fase crônica não foi observada a reativação da parasitemia.

Os resultados do índice de reativação agrupados por genético *T. cruzi* I e *T. cruzi* II estão apresentados no gráfico 3.

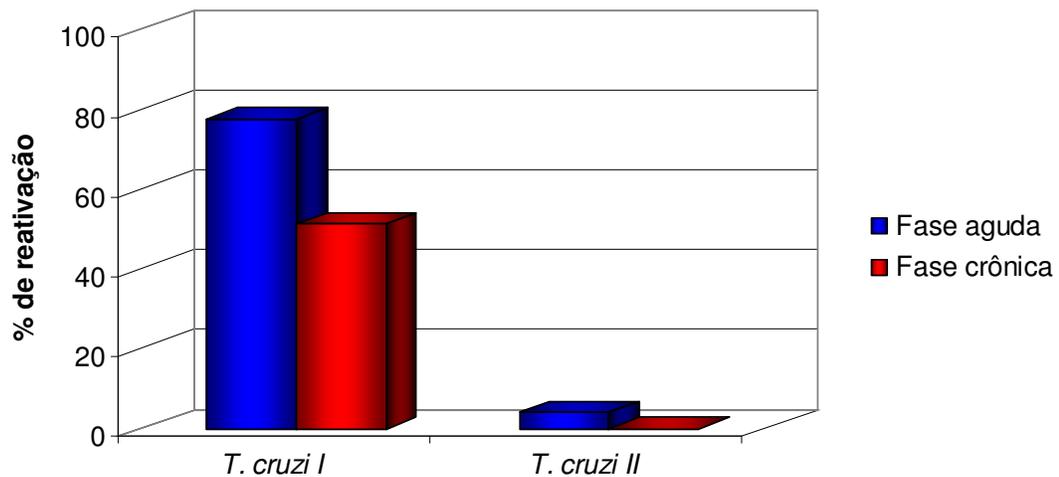


Gráfico 3: Percentagem de reativação da parasitemia em camundongos Swiss imunossuprimidos com ciclofosfamida durante as fases aguda e crônica da infecção, infectados com diversos clones de *T. cruzi*, agrupados por linhagem genética (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II).

Entre os animais infectados com clones pertencentes ao grupo *T. cruzi* I foram observados altos índices de reativação da parasitemia após a imunossupressão com Cy, tanto no final da fase aguda como na fase crônica da infecção, havendo uma variação na

percentagem de reativação da parasitemia entre os animais infectados com clones geneticamente próximos. Os animais infectados com os clones Gamba c11, Cuica c11 e P209 c11 apresentaram 100% de reativação da parasitemia quando imunossuprimidos no final da fase aguda, e aqueles infectados com o clone SP104 c11 apresentaram 10% de reativação da parasitemia, índice significativamente menor ($P \leq 0,05$) do que o observado nos animais infectados com parasitos da mesma linhagem genética. Por outro lado, quando os animais foram submetidos à imunossupressão com Cy durante a fase crônica da infecção foi observado um índice de reativação significativamente maior ($P \leq 0,05$) entre os animais inoculados com o clone SP104 c11 (80%), intermediários com os clones Gamba c11 e Cuica c11 (50%), e significativamente menores ($P \leq 0,05$) naqueles inoculados com o clone P209 c11 (25%).

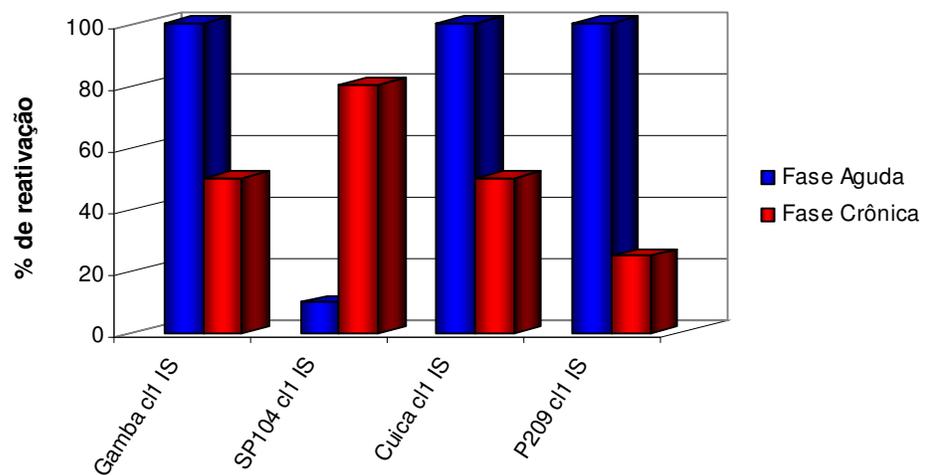


Gráfico 4: Percentagem de reativação da parasitemia em camundongos Swiss infectados com os clones Gamba c11, SP104 c11, Cuica c11 e P209 c11, pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I e imunossuprimidos com ciclofosfamida durante as fases aguda e crônica da infecção.

5.4. Curvas de parasitemia dos animais infectados com os clones pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I, tratados ou não com benznidazol e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida durante a fase aguda da infecção.

O gráfico 5 representa as curvas de parasitemia de camundongos submetidos ou não ao tratamento com Bz e imunossuprimidos com Cy durante a fase aguda (60 dias

após a inoculação), inoculados com os clones Gamba c11 (Graf. 5A), SP104 c11 (Graf. 5B), Cuica c11 (Graf. 5C), P209 c11 (Graf. 5D).

Após a imunossupressão, observou-se a reativação da parasitemia nos grupos de camundongos inoculados com os clones pertencentes ao genótipo *T. cruzi* I (genótipos 19 e 20). Nos animais inoculados com o clone Gamba c11 foi observada a reativação da parasitemia nos animais não tratados com Bz. Os níveis de parasitemia foram elevados quando o animal foi imunossuprimido no final da fase aguda (81.666 tripomastigotas/0,1mL de sangue), sendo o pico de parasitemia similar ($P>0,05$) ao observado nos animais não imunossuprimidos (cerca de 73.0000). A imunossupressão também induziu a reativação da parasitemia no grupo de animais submetidos ao tratamento com Bz (356.000 tripomastigotas/0,01mL de sangue). Estes níveis foram maiores do que o observado entre os animais imunossuprimidos e não tratados com Bz.

Os animais inoculados com o clone SP104 c11, pertencente ao mesmo grupo genético, também apresentaram reativação da parasitemia após a imunossupressão com Cy. Entretanto os níveis de parasitemia atingidos foram mais baixos em relação ao clone Gamba c11, apresentando um pico máximo de 833 tripomastigotas/0,1mL de sangue no final da fase aguda, valor semelhante ao encontrado nos animais não imunossuprimidos (833,33 tripomastigotas/0,1mL de sangue) (Graf. 5B).

Também os camundongos inoculados com o clone Cuica c11 apresentaram a reativação da parasitemia induzida pela Cy, tendo atingido níveis máximos de 250.000 tripomastigotas/0,1mL de sangue quando tratados no final da fase aguda, estes níveis foram significativamente menores ($P\leq 0,05$) do que o observado nos animais não imunossuprimidos, que apresentaram o pico de parasitemia de 493.333 tripomastigotas/0,1mL de sangue (Graf. 5C). Foi observado níveis altos de parasitemia (230.000 tripomastigotas/0,1mL de sangue) nos animais tratados durante a fase aguda. Estes níveis foram semelhantes ($P>0,05$) aos observados nos animais imunossuprimidos e não tratados com Bz (250.000 tripomastigotas/0,1mL de sangue). Naqueles inoculados com o clone P209 c11, a Cy também induziu a reativação da parasitemia entre os animais tratados durante a fase aguda da infecção nos quais foram observados níveis altos de parasitemia (8.953.000 tripomastigotas/0,01mL de sangue). Estes níveis foram maiores ($P\leq 0,05$) do que os observados nos animais imunossuprimidos na ausência do tratamento com Bz, como pode ser observado no Gráfico 5D.

A taxa de mortalidade dos animais inoculados com os clones pertencentes ao grupo de *T. cruzi I* e imunossuprimidos com Cy foi de 0% tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção, com exceção daqueles inoculados com clone P209 c11 que apresentaram uma percentagem de 16,7% de mortalidade na fase aguda da infecção.

Por outro lado não foi observada a reativação da parasitemia entre os animais infectados com clones pertencentes ao grupo *T. cruzi II*: Bug2148 c11, MN c12 e MVB c18. Neste grupo apenas um animal inoculado com o clone IVV c14 apresentou reativação da parasitemia após a imunossupressão durante a fase aguda, porém com níveis muito baixos de parasitemia (1.666 tripomastigotas/0,1mL sangue). A taxa de mortalidade nesses animais também foi 0%, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção.

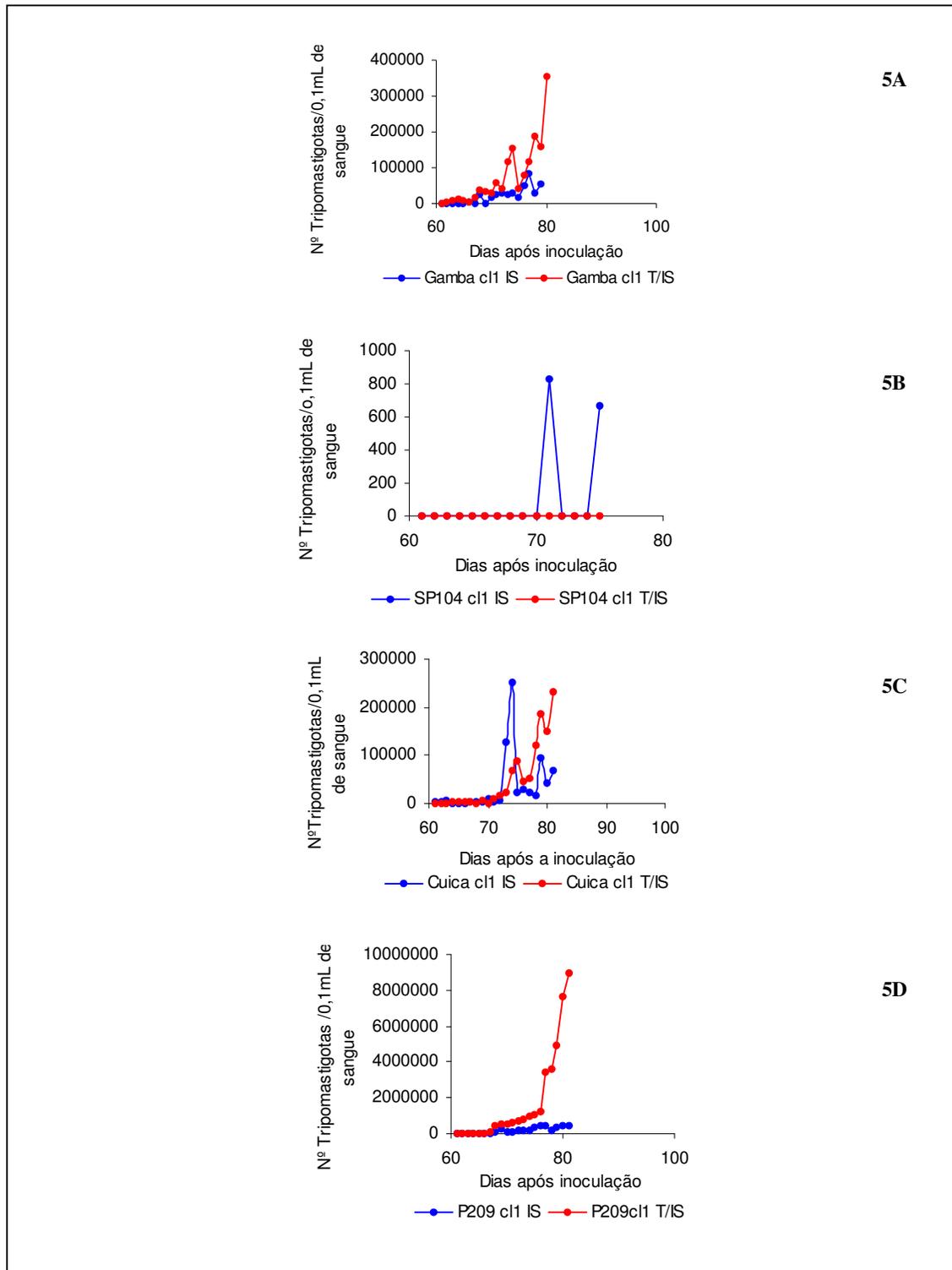


Gráfico 5: Curva de parasitemia de camundongos Swiss infectados com os clones Gamba c11, SP104 c11, Cuica c11 e P209 c11, (*T. cruzi* I) tratados ou não com benznidazol e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida durante a fase aguda da infecção.

5.5. Curvas de parasitemia dos animais infectados com os clones pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I, tratados ou não com benznidazol e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida durante a fase crônica da infecção.

O gráfico 6 representa as curvas de parasitemia obtidas de camundongos tratados ou não com Bz durante a fase crônica (120 dias após a inoculação) e imunossuprimidos com Cy (170 dias após a inoculação), inoculados com os clones Gamba c11 (Graf. 6A), SP104 c11(Graf.6B), Cuica c11 (Graf. 6C), P209 c11(Graf. 6D).

A imunossupressão realizada durante a fase crônica também induziu a reativação da parasitemia nos animais inoculados com o clone Gamba c11, porém com nível máximo de 666 tripomastigotas/0,1mL de sangue. Por outro lado, quando os animais foram tratados com Bz a imunossupressão induziu a reativação com pico de parasitemia semelhante ao dos animais não tratados tendo sido observado 1200 tripomastigotas/0,1 mL de sangue (Graf. 6A).

Os animais inoculados com o clone SP104 c11 e imunossuprimidos durante a fase crônica apresentaram reativação da parasitemia que atingiu o pico máximo de 2666 tripomastigotas/0,1mL de sangue, porém ao serem tratados com Bz e imunossuprimidos não houve reativação da parasitemia (Graf. 6B).

Nos animais inoculados com o clone Cuica c11 a imunossupressão também induziu a reativação da parasitemia, sendo observado um pico máximo de parasitemia de 833 tripomastigotas/0,1mL de sangue, nos animais tratados e não tratados com Bz (Graf. 6C). Naqueles inoculados com o clone P209 c11 (Graf. 6D), a Cy também induziu a reativação da parasitemia entre os animais tratados durante a fase crônica da infecção, sendo observado maiores ($P \leq 0,05$) níveis de parasitemia nos animais tratados (19.000 tripomastigotas/0,01mL de sangue) do que nos animais imunossuprimidos na ausência do tratamento com Bz (2.000 tripomastigotas/0,1mL sangue), como pode ser observado no Gráfico 6D.

A taxa de mortalidade dos animais dos grupos citados acima também foi de 0%, com exceção daqueles inoculados com o clone P209 c11 que apresentaram uma taxa de 10% de mortalidade durante a fase crônica e aqueles inoculados com os clones MVB c18 que apresentaram uma percentagem de 20% de mortalidade durante fase crônica da infecção e com o clone MN c11 que apresentaram uma taxa de 20% de mortalidade durante a fase aguda.

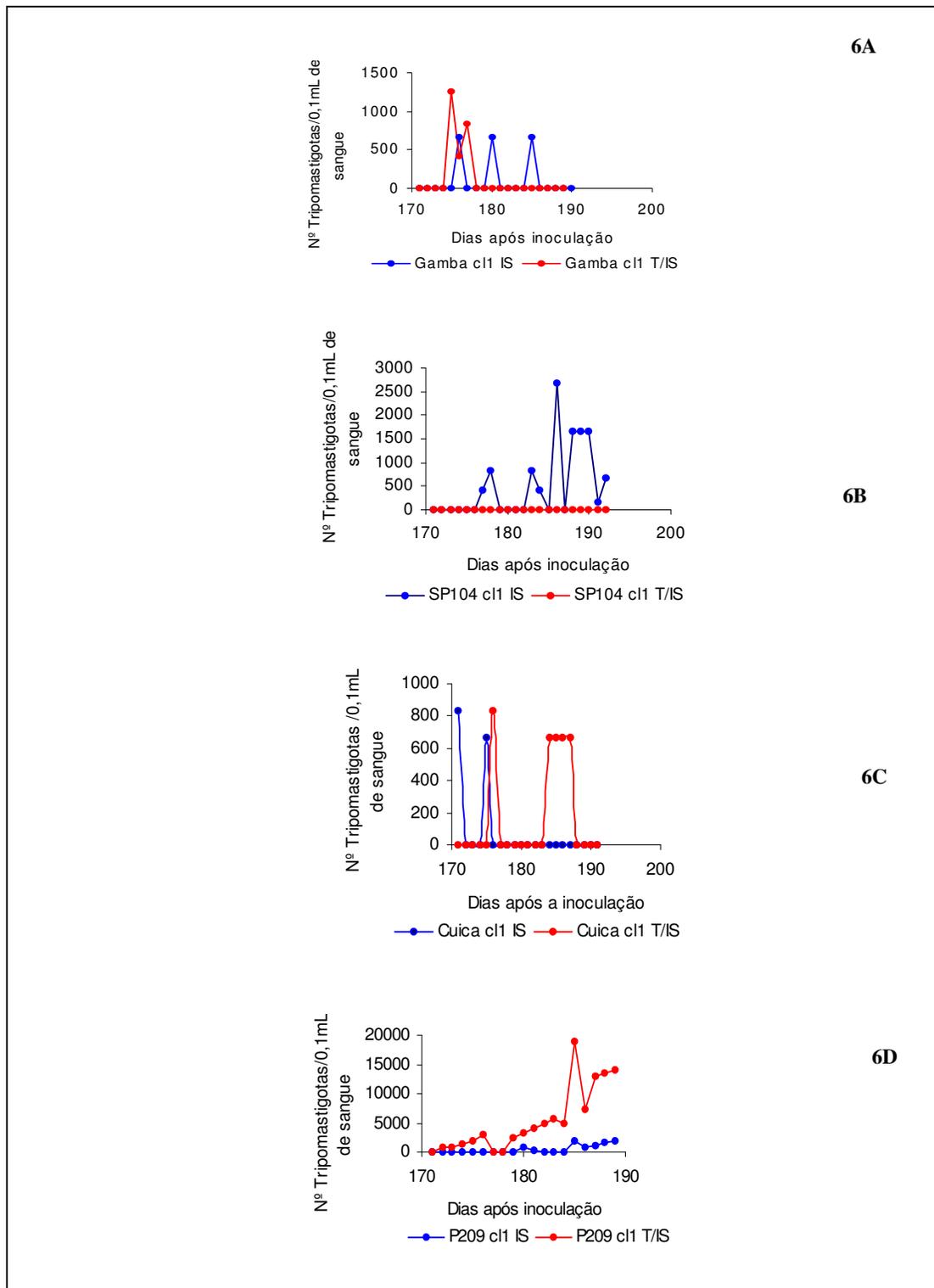


Gráfico 6: Curvas de parasitemia dos animais infectados com os clones pertencentes a linhagem genética *T. cruzi* I, tratados ou não com benznidazol e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida durante a fase e crônica da infecção.

5.6. Avaliação da eficácia do tratamento específico com benznidazol na prevenção da reativação da parasitemia em animais imunossuprimidos com ciclofosfamida.

Para avaliar a eficácia do tratamento com Bz na prevenção da reativação da parasitemia após a imunossupressão com Cy foram inoculados grupos de animais com os clones do grupo *T. cruzi* I, que apresentaram reativação da parasitemia após imunossupressão com Cy. A seguir os animais foram tratados com Bz durante a fase aguda e crônica da infecção.

A tabela 1 mostra os resultados da percentagem total de reativação da parasitemia, após imunossupressão com Cy, e/ou testes de hemocultura positivos em camundongos inoculados com os quatro clones de *T. cruzi* I e tratados com Bz durante as fases aguda e crônica da infecção. O *T. cruzi* foi detectado através do exame de sangue a fresco realizado durante a imunossupressão com Cy e/ou da hemocultura em 88,9%, 33,3%, 100% e 100% dos animais inoculados com os clones Gamba c11, SP104 c11, Cuica c11 e P209 c11 e tratados com Bz durante a fase aguda da infecção. Nos animais tratados com Bz durante a fase crônica o parasito foi detectado em 100%, 0%, 100% e 77,8% dos animais inoculados com os clones Gamba c11, SP104 c11, Cuica c11 e P209 c11, respectivamente. É interessante salientar que a imunossupressão com Cy foi mais eficaz, em relação à hemocultura em detectar a falha terapêutica nos animais infectados com os clones Gamba c11 e P209 c11.

Tabela 1: Percentagem total de reativação da parasitemia, após imunossupressão com ciclofosfamida, e/ou testes de hemocultura positivos em camundongos inoculados com os clones Gamba c11, SP104 c11, Cuica c11 e P209 c11 (*T. cruzi* I) e tratados com benznidazol durante as fases aguda e crônica da infecção.

Clone	Fase da infecção	Grupo de animais	Hemocultura +/-total	Reativação da parasitemia +/-total (%)	Total de positividade +/-total (%)
Gamba c11	FA	IS	8/9 (88,9%)	8/9 (88,9%)	8/9 (88,9%)
		NIS	9/10 (90%)	0/10(0%)	9/10 (90%)
	FC	IS	10/10 (100%)	6/10 (60%)	10/10 (100%)
		NIS	7/9 (77,8%)	0/10 (0%)	7/9 (77,8%)
SP104 c11	FA	IS	3/9 (33,3%)	0/9 (0%)	3/9 (33,3%)
		NIS	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
	FC	IS	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
		NIS	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
Cuica c11	FA	IS	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
		NIS	10/10 (100%)	0/10 (0%)	10/10 (100%)
	FC	IS	10/10 (100%)	1/10 (10%)	10/10 (100%)
		NIS	8/8 (100%)	0/8 (0%)	8/8 (100%)
P209 c11	FA	IS	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
		NIS	10/10 (100%)	0/10 (0%)	10/10 (100%)
	FC	IS	7/9 (77,8%)	5/9 (55,5%)	7/9 (77,8%)
		NIS	7/10 (70%)	0/10 (0%)	7/10 (70%)

FA = fase aguda, FC = fase crônica
IS = imunossuprimido, NSI = Não imunossuprimido

O gráfico 7 mostra o índice de reativação da parasitemia detectada nos animais imunossuprimidos durante as fases aguda e crônica da infecção após o tratamento com Bz. O tratamento específico com Bz, realizado durante a fase aguda da infecção, não foi eficaz em prevenir a reativação da parasitemia, após a imunossupressão, entre os animais infectados com os clones Gamba c11 (88,9%), Cuica c11 (100%) e P209 (100%), mas foi eficaz em prevenir a reativação da parasitemia nos animais infectados com o clone SP104 c11, nos quais não foi detectada a reativação da parasitemia em nenhum dos animais imunossuprimidos com Cy após o tratamento com Bz.

Quando os camundongos foram tratados com Bz durante a fase crônica da infecção, a imunossupressão com Cy também induziu a dois padrões distintos de resposta: proteção nos animais infectados com os clones SP104 c11 e Cuica c11, sendo encontrado 0% e 10% de reativação de parasitemia respectivamente. A segunda resposta foi o aumento da percentagem de reativação da parasitemia entre os animais infectados com o clone Gamba c11 e P209 c11, pois quando foram imunossuprimidos após o tratamento com Bz passaram a apresentar, respectivamente, 60% e 55,5% de reativação da parasitemia, em contraste com o índice de 50% (Gamba c11) e 25% (P209 c11) observado nos animais não tratados com Bz e imunossuprimidos.

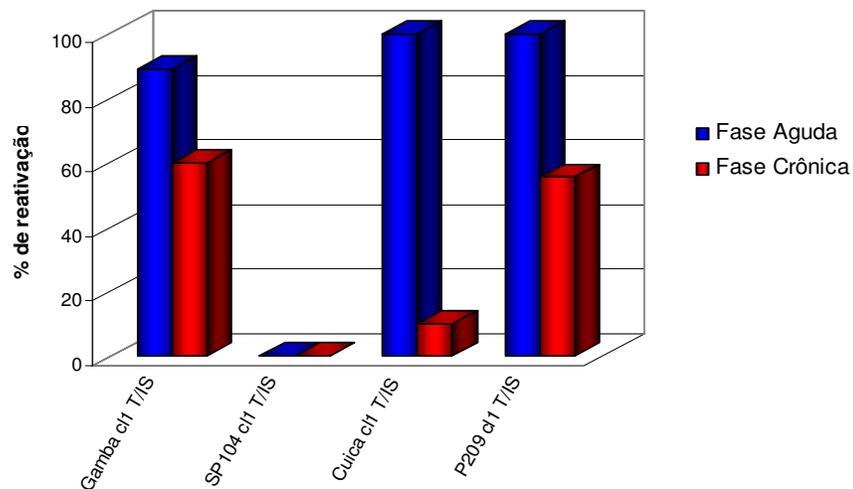


Gráfico 7: Percentagem de reativação da parasitemia em camundongos Swiss infectados com os clones Gamba c11, SP104 c11, Cuica c11 e P209 c11, pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I, tratados com benznidazol e imunossuprimidos com ciclofosfamida durante as fases aguda e crônica da infecção.

De uma forma geral, quando estes dados são agrupados nas duas linhagens genéticas do parasito pode-se observar que o tratamento com Bz, realizado durante a fase aguda da infecção, preveniu a reativação da parasitemia entre os animais inoculados com clones pertencentes à linhagem *T. cruzi* I, sendo observado 72,22% de reativação entre os animais tratados com Bz e imunossuprimidos. Durante a fase crônica o tratamento realizado também reduziu a percentagem de reativação da parasitemia 51,25% (animais imunossuprimidos e não tratados) para 31,37% (animais imunossuprimidos após o tratamento com Bz) (Gráfico 8).

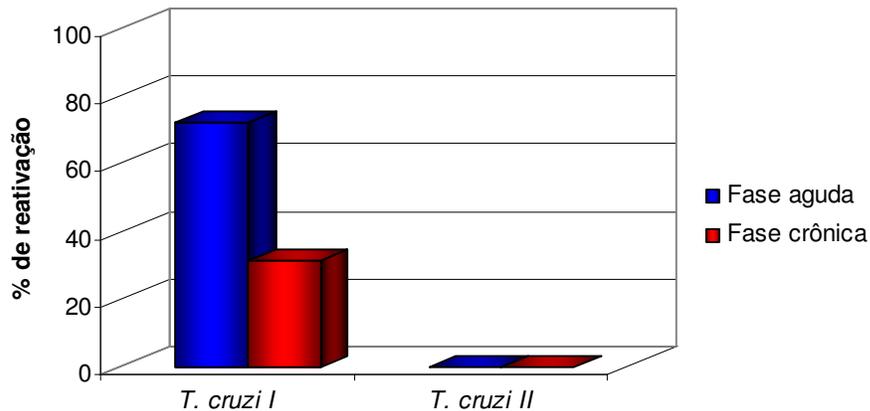


Gráfico 8: Percentagem de reativação da parasitemia em camundongos Swiss infectados com diversos clones de *T. cruzi*, agrupados nas duas linhagens genéticas (*T. cruzi I* e *T. cruzi II*), tratados com benznidazol e imunossuprimidos com ciclofosfamida durante as fases aguda e crônica da infecção.

Para verificar o efeito do tratamento com Bz na evolução de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG e das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b, a ELISA foi realizada no soro dos camundongos tratados, coletado antes do início da imunossupressão com Cy. Os resultados da média da absorbância obtida pela ELISA estão representados na Tabela 2. As médias das absorbâncias obtidas de 10 camundongos tratados com Bz foram comparadas aos obtidos de camundongos não tratados inoculados com os mesmos clones através do teste de Student. O tratamento realizado durante a fase aguda induziu a uma queda significativa ($P \leq 0,05$) dos níveis de anticorpos, independente da classe ou subclasse de anticorpos avaliada. Apenas nos soros dos animais inoculados com clones pertencentes aos genótipos 32 e 39 não foi detectada diferença significativa dos níveis de anticorpos da subclasse IgG1 entre os animais tratados com Bz e os não tratados. É importante salientar que esta queda dos níveis de anticorpos não está relacionada à cura parasitológica, pois a mesma foi detectada tanto nos animais inoculados com clones pertencentes à linhagem genética *T. cruzi I* (mais resistentes ao Bz), quanto com clones pertencentes à linhagem *T. cruzi II* (menos resistentes ao Bz).

Por outro lado, o efeito do tratamento com Bz sobre os níveis de absorbância nos soros coletados dos animais inoculados com os mesmos clones do *T. cruzi* foi menos

intenso quando o tratamento foi realizado durante a fase crônica da infecção (Tabela 2). De maneira geral o tratamento não induziu a alterações significativas na absorvância obtida através da ELISA quando comparados aos obtidos nos soros dos animais infectados com os mesmos clones. Apenas nos animais inoculados com os clones do genótipo 19 e 32 foi detectada uma queda significativa nos níveis de anticorpos da classe IgG, da subclasse IgG1 nos animais inoculados com clones do genótipo 19 e de IgG 2b nos animais inoculados com clones do genótipo 32.

Tabela 2: Média da absorvância pela reação imunoenzimática ELISA realizada em soros obtidos de animais infectados com clones pertencentes aos grupos genéticos 19, 20, 32 e 39, comparativamente aos animais infectados com os mesmos clones e tratados com benznidazol durante as fases aguda e crônica da infecção.

Genótipo <i>T. cruzi</i>	Média da Absorvância a 492nm ± desvio padrão							
	Classe e Subclasses de Imunoglobulinas							
	IgG		IgG1		IgG2a		IgG2b	
	NT	T	NT	T	NT	T	NT	T
Fase aguda								
19	0,41±0,17	0,18±0,05	0,41±0,22	0,14±0,07	0,43±0,20	0,13±0,06	0,25±0,14	0,09±0,05
20	0,65±0,06	0,25±0,08	0,83±0,20	0,21±0,07	0,69±0,08	0,18±0,18	0,54±0,09	0,17±0,10
32	0,25±0,05	0,14±0,01	0,22±0,12	0,24±0,15	0,42±0,14	0,16±0,06	0,18±0,05	0,10±0,05
39	0,36±0,11	0,25±0,07	0,28±0,21	0,24±0,18	0,32±0,14	0,21±0,10	0,20±0,11	0,12±0,03
Fase crônica								
19	0,47±0,12	0,43±0,15	0,61±0,33	0,35±0,16	0,73±0,21	0,70±0,22	0,44±0,16	0,48±0,17
20	0,55±0,14	0,54±0,06	0,54±0,21	0,55±0,19	0,75±0,33	0,81±0,07	0,52±0,10	0,55±0,17
32	0,32±0,10	0,24±0,05	0,25±0,13	0,26±0,16	0,35±0,21	0,33±0,09	0,19±0,7	0,27±0,11
39	0,47±0,15	0,34±0,12	0,36±0,19	0,46±0,31	0,34±0,13	0,30±0,08	0,19±0,10	0,25±0,13

Os pares em negrito indicam diferença significativa entre as duplas, definidas pelo Teste de Student ($P \leq 0,05$).

Em cada grupo experimental foram utilizados 20 animais.

5.7. Análise histopatológica dos tecidos cardíaco e/ou esquelético e encefálico de camundongos inoculados com clones os Gamba cl1 e SP104 cl1 (genótipo 19), Cuica cl1 e P209 cl1 (genótipo 20), pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I, e Bug2148 cl1 e MN cl2 (genótipo 39) e MVB cl8 e IVV cl4 (genótipo 32) pertencentes à linhagem *T. cruzi* II e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida e/ou tratamento com benznidazol.

A análise do parasitismo tecidual e das lesões histopatológicas foi realizada de acordo com a linhagem genética, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, dos clones utilizados para a infecção dos animais.

Para a avaliação do parasitismo tecidual foram analisados cortes histológicos do músculo cardíaco e esquelético e do encéfalo de animais necropsiados tanto na fase aguda (84 dias de infecção) quanto crônica (194 dias de infecção), avaliados através da técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpo anti-*T. cruzi* e corados pela HE.

Na tabela 3 estão representados o parasitismo tecidual detectado no músculo cardíaco e/ou esquelético de camundongos inoculados com os clones Gamba cl1, SP104 cl1, Cuica cl1 e P209 cl1 (*T. cruzi* I), e Bug 2148 cl1, MN cl2, MVB cl18 e IVV cl4 (*T. cruzi* II), e imunossuprimidos pela Cy no 60^o (fase aguda) após a inoculação.

Nos animais não imunossuprimidos o *T. cruzi* foi detectado apenas nos tecidos de um animal inoculado com o Clone Gamba cl1, necropsiado no final da fase aguda da infecção (84 dias). Por outro lado, nos animais imunossuprimidos no final da fase aguda o parasito pôde ser detectado nos animais infectados com todos os clones pertencentes ao genótipo 19 (Gamba cl1 e SP104 cl1), sendo importante ressaltar que todos os animais que apresentavam parasitismo tecidual também apresentaram reativação da parasitemia (Tabela 3). Nos animais inoculados com os clones do genótipo 20 (Cuica cl1 e P209 cl1) o parasitismo tecidual foi detectado apenas no músculo esquelético dos animais inoculados com o clone P209 cl1. Nos animais inoculados com clones pertencentes à linhagem *T. cruzi* II o parasito foi detectado apenas nos tecidos de um animal inoculado com o clone IVV cl4, que coincidentemente foi o único animal pertencente a esta linhagem genética que apresentou reativação da parasitemia após a imunossupressão com Cy.

Durante a fase crônica da infecção foi observado parasitismo tecidual apenas nos animais infectados com o clone P209 cl1, e apenas após a imunossupressão com Cy (170^o dia após a inoculação) sendo detectado parasitismo discreto no tecido cardíaco e

no músculo esquelético de 50% dos animais (Tabela 3). Não foram detectados parasitos no tecido encefálico em nenhum dos animais necropsiados tanto durante a fase aguda quanto na fase crônica da infecção.

Tabela 3: Parasitismo tecidual detectado no músculo cardíaco e/ou esquelético de camundongos inoculados com os clones Gamba c11, SP104 c11, Cuica c11 e P209 c11 (*Trypanosoma cruzi I*), Bug 2148 c11, MN c12, MVB c18 e IVV c14 (*T. cruzi II*), e imunossuprimidos pela ciclofosfamida (submetidos ou não ao tratamento com benznidazol) no 60^a (fase aguda) após a inoculação.

Clone	Animais inoculados com <i>T. cruzi</i> (+/total)					
	Animais não tratados com Benznidazol					
	N-IS			IS		
	Coração	Músculo	Total	Coração	Músculo	Total
Gamba c11	1/6 (D)	0/6	1/6	1/3 (D)	0/3	1/3
SP104 c11	0/5	0/5	0/5	0/6	3/6 (D)	3/6
Cuica c11	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
P209 c11	0/6	0/6	0/6	0/6	3/6 (D a I)	3/6
Bug 2148 c11	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
MN c11	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
MVB c18	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
IVV c14	0/6	0/6	0/6	1/4 (D)	0/4	1/4
Animais tratados com Benznidazol						
Gamba c11	0/6	0/6	0/6	2/6 (D)	0/6	2/6
SP104 c11	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Cuica c11	0/6	0/6	0/6	2/5 (M/I)	1/5 (D)	2/5
P209 c11	0/6	2/6 (D)	0/6	3/6 (D)	5/6 (D a I)	5/6

D=discreto, M=moderado, I=intenso

N-IS= Não imunossuprimido

IS= Imunossuprimido

Após o tratamento com Bz, realizado durante a fase aguda da infecção, apesar do índice de reativação da parasitemia não ter sido alterado de forma significativa, a alteração da frequência e da intensidade do parasitismo tecidual foi variável entre os animais inoculados com os diferentes clones. Nos animais inoculados com o clone Gambá c11 foi observado parasitismo tecidual em 2/6 animais após a imunossupressão com Cy, similar ao observado nos animais não submetidos ao tratamento específico, onde o parasito pode ser detectado em 1/3 animais, considerando apenas aqueles imunossuprimidos. Por outro lado, foi observada uma redução do parasitismo tecidual nos animais inoculados com o clone SP104c11 (genótipo 19) após o tratamento específico, não tendo sido detectado parasitismo tecidual em nenhum dos animais

tratados com Bz, em contraste com os animais não tratados onde o parasito foi detectado no músculo esquelético de 3/6 animais após a imunossupressão com ciclofosfamida. Nos animais inoculados com o clone Gamba c11 foi observado um parasitismo tecidual discreto apenas em dois animais após a imunossupressão com Cy. Por outro lado, nos animais inoculados com parasitos pertencentes aos clones do genótipo 20 (Cuica c11 e P209 c11) foram detectados parasitos no músculo cardíaco e/ou esquelético com maior frequência do que o detectado nos animais imunossuprimidos e não tratados com Bz, sendo o parasitismo considerado de discreto a intenso.

Nos animais tratados com Bz durante a fase crônica da infecção foi observado parasitismo tecidual apenas em 1 animal inoculado com o clone P209 c11.

A Figura 1 representa o padrão histológico referente ao parasitismo tecidual nos diferentes grupos de animais. Em 1A, 1B e 1C está apresentado, de forma representativa, o parasitismo tecidual discreto observado no tecido cardíaco dos animais inoculados com os clones Gamba c11 e IVV c14 imunossuprimidos ou não, necropsiados no final da fase aguda da infecção. Em 1D e 1E estão apresentados, também de forma representativa, o parasitismo moderado a intenso observado nos tecidos dos animais imunossuprimidos infectados com clone Cuica c11 (fase aguda), imunossuprimidos após o tratamento com Bz. Estes dados mostram que o tratamento com Bz não induziu a uma alteração significativa do parasitismo tecidual dos animais inoculados com os clones do genótipo 19, e a um aumento deste parasitismo naqueles inoculados com os clones do genótipo 20.

Entretanto, quando o tratamento com Bz foi realizado durante a fase crônica apenas o clone P209 c11 continuou a apresentar parasitismo tecidual, mas com menor frequência, sendo o parasitismo considerado discreto. As figuras 1F e 1G são representativas do parasitismo tecidual observado nos animais infectados com o clone P209 c11 após a imunossupressão com Cy (tratados ou não com Bz).

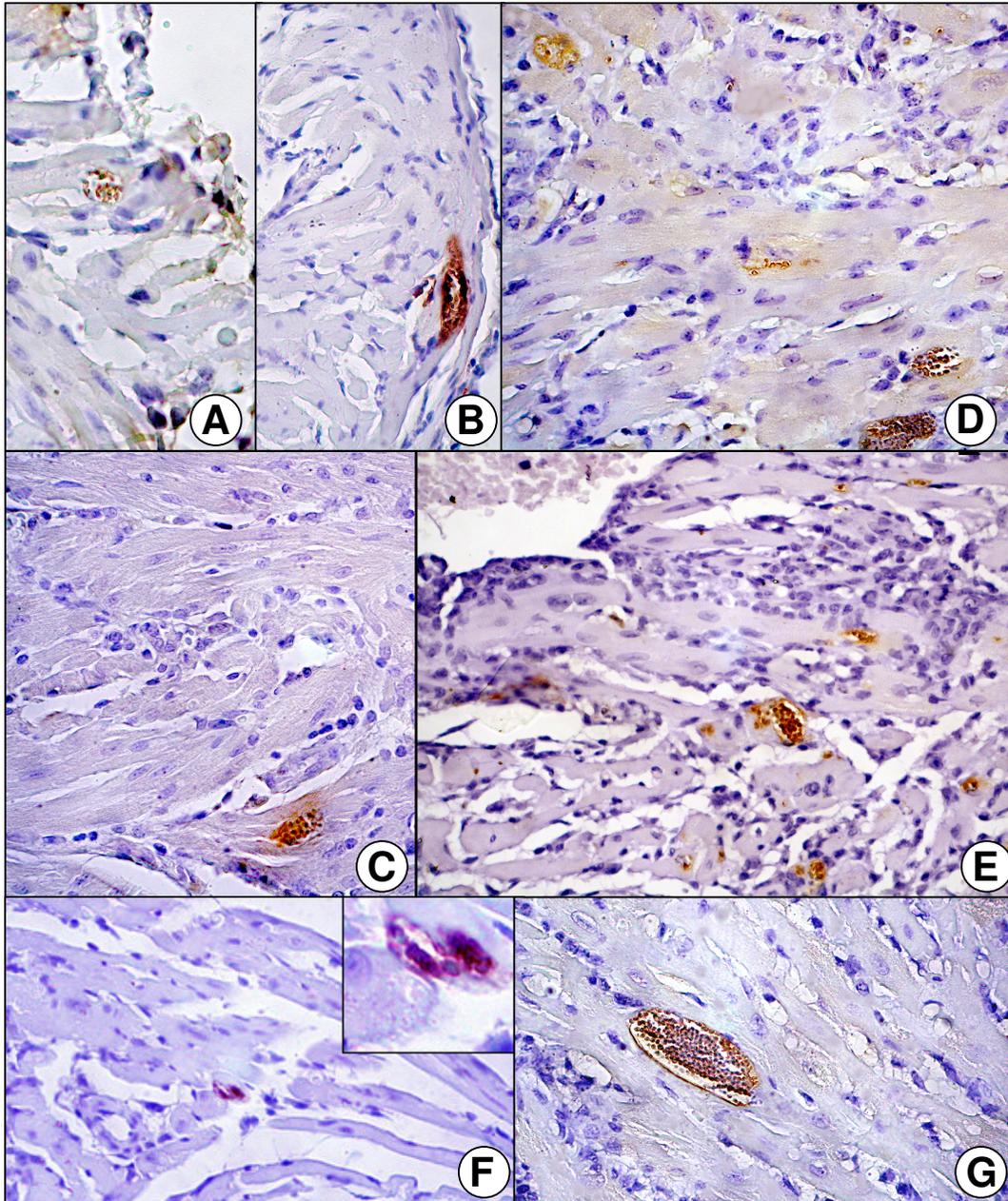


Figura 1 – Fotomicrografias representativas do miocárdio de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentando ninhos de amastigotas. A, B e C - fase aguda: são representativas do parasitismo tecidual discreto observado no tecido cardíaco dos animais inoculados com os clones Gambá cl1 e IVV cl4 imunossuprimidos ou não. D e E representam o parasitismo moderado a intenso observado nos tecidos dos animais imunossuprimidos infectados com o clone Cuica cl1 imunossuprimidos após o tratamento com benznidazol realizado durante a fase aguda da infecção. F e G - fase aguda: são representativas do parasitismo tecidual observado nos animais infectados com o clone P209 cl1 após a imunossupressão com ciclofosfamida (tratados ou não com Bz)). Imunohistoquímica anti-*T. cruzi*, Peroxidase anti-peroxidase, X600.

Na tabela 4 estão representadas as medianas da intensidade do processo inflamatório no átrio de camundongos infectados com clones pertencentes à linhagem genética de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II comparativamente aos camundongos inoculados com os mesmos clones e submetidos à imunossupressão com Cy e /ou ao tratamento com Bz.

Tabela 4- Mediana da intensidade do processo inflamatório no átrio de camundongos infectados com clones do *T. cruzi* pertencentes ao grupo *T. cruzi* I e *T. cruzi* II comparativamente aos camundongos inoculados com os mesmos grupos genéticos do parasito e submetidos a imunossupressão com ciclofosfamida e/ou ao tratamento com benznidazol.

Grupo genético do <i>T. cruzi</i>	Animais infectados - Mediana (maior valor/menor valor)			
	Controle	Imunossuprimido	Tratado com Bz	Tratado com Bz e imunossuprimido
	Fase aguda			
<i>T. cruzi</i> I	2 (1/3)	2 (1/3)	^a 2 (1/3)	1 (1/3)
<i>T. cruzi</i> II	1 (1/3)	1 (1/2)	^b 1 (1/2)	1 (1/2)
	Fase crônica			
<i>T. cruzi</i> I	2 (1/3) _A	1 (0/3) _{A,C}	1 (1/3) _{A,C}	1 (1/2) _{B,C}
<i>T. cruzi</i> II	1 (1/2)	1 (1/2)	1 (1/2)	1 (1/2)

Letras diferentes indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

Letras minúsculas indicam comparação vertical

Letras maiúsculas indicam comparação horizontal

O processo inflamatório nos diferentes grupos infectados, necropsiados na fase aguda, está demonstrado na Figura 2. O infiltrado inflamatório é constituído predominantemente de células mononucleadas, independente da situação avaliada. Verifica-se em 2A-D cortes histológicos do miocárdio de animais pertencentes ao *T. cruzi* I e em 2E-H, *T. cruzi* II. De uma maneira geral verificou-se um processo inflamatório pouco mais intenso nos animais inoculados com clones pertencentes à linhagem *T. cruzi* I, nos diferentes grupos, em relação aos animais inoculados com parasitos da linhagem *T. cruzi* II, entretanto esta diferença não foi significativa ($P \geq 0,05$).

O processo inflamatório observado no miocárdio, durante a fase crônica da infecção, está representado na Figura 3. A semelhança do observado na fase aguda, o infiltrado apresentou-se constituído predominantemente por células mononucleadas. Novamente o processo inflamatório foi um pouco mais exuberante nos animais inoculados com parasitos pertencentes à linhagem *T. cruzi* I, nos diferentes grupos

experimentais, em relação aos inoculados com clones da linhagem *T. cruzi* II (Figura 3A). Nos grupos de animais inoculados com clones da linhagem *T. cruzi* I foi observada uma tendência de diminuição na intensidade do processo inflamatório nos animais imunossuprimidos e tratados com Bz, embora esta tendência tenha sido significativa apenas nos experimentos realizados durante a fase crônica da infecção nos animais tratados com Bz.

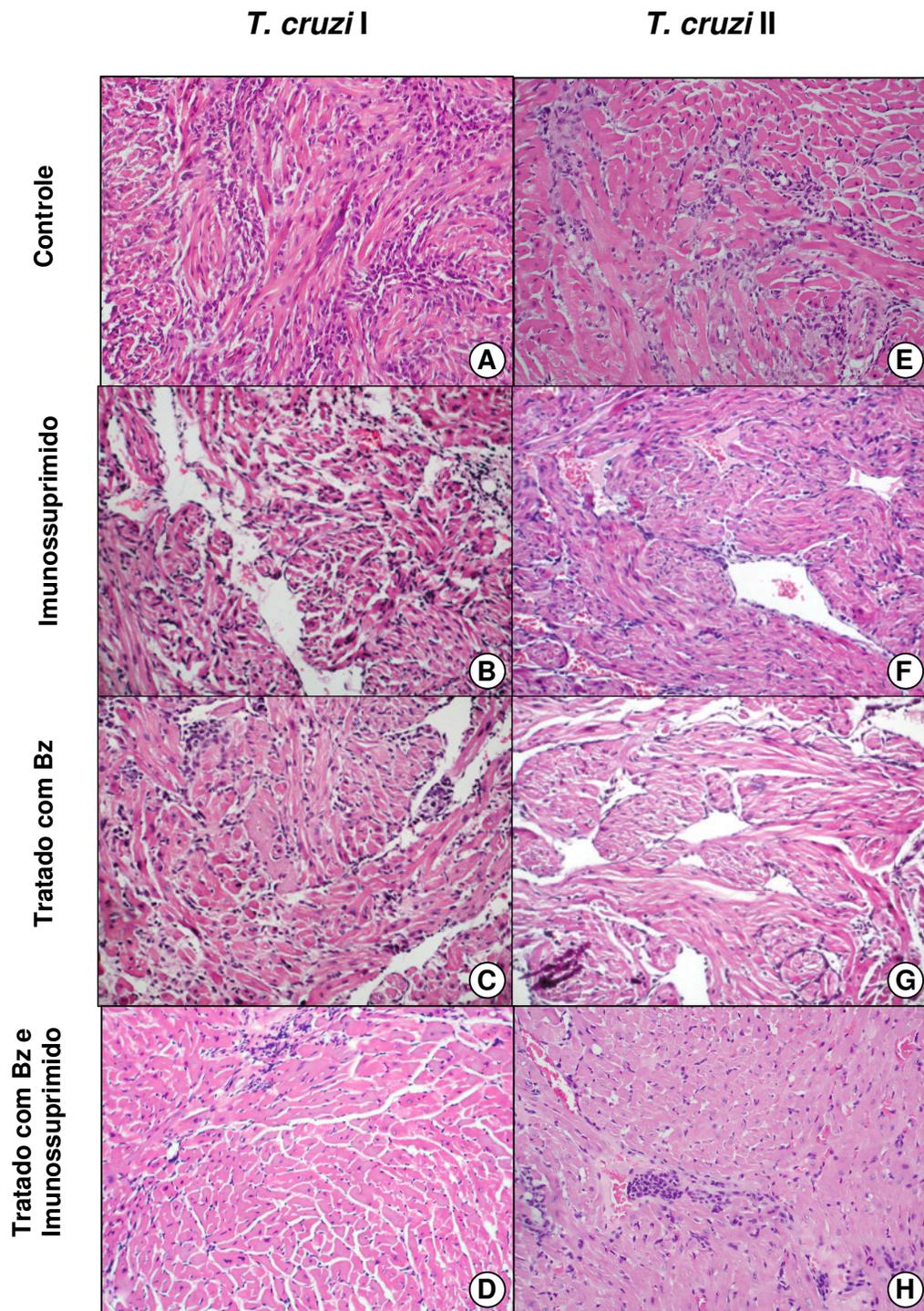


Figura 2– Fotomicrografias do miocárdio de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e necropsiados durante a fase aguda da infecção. **A-D** – *T. cruzi* I; **E - H** – *T. cruzi* II. **A e E**- Infectado; **B e F**- Infectado e imunossuprimido; **C e G**- Infectado e tratado com benznidazol; **D e H**- Infectado, imunossuprimido e tratado com benznidazol – Hematoxilina Eosina, X300.

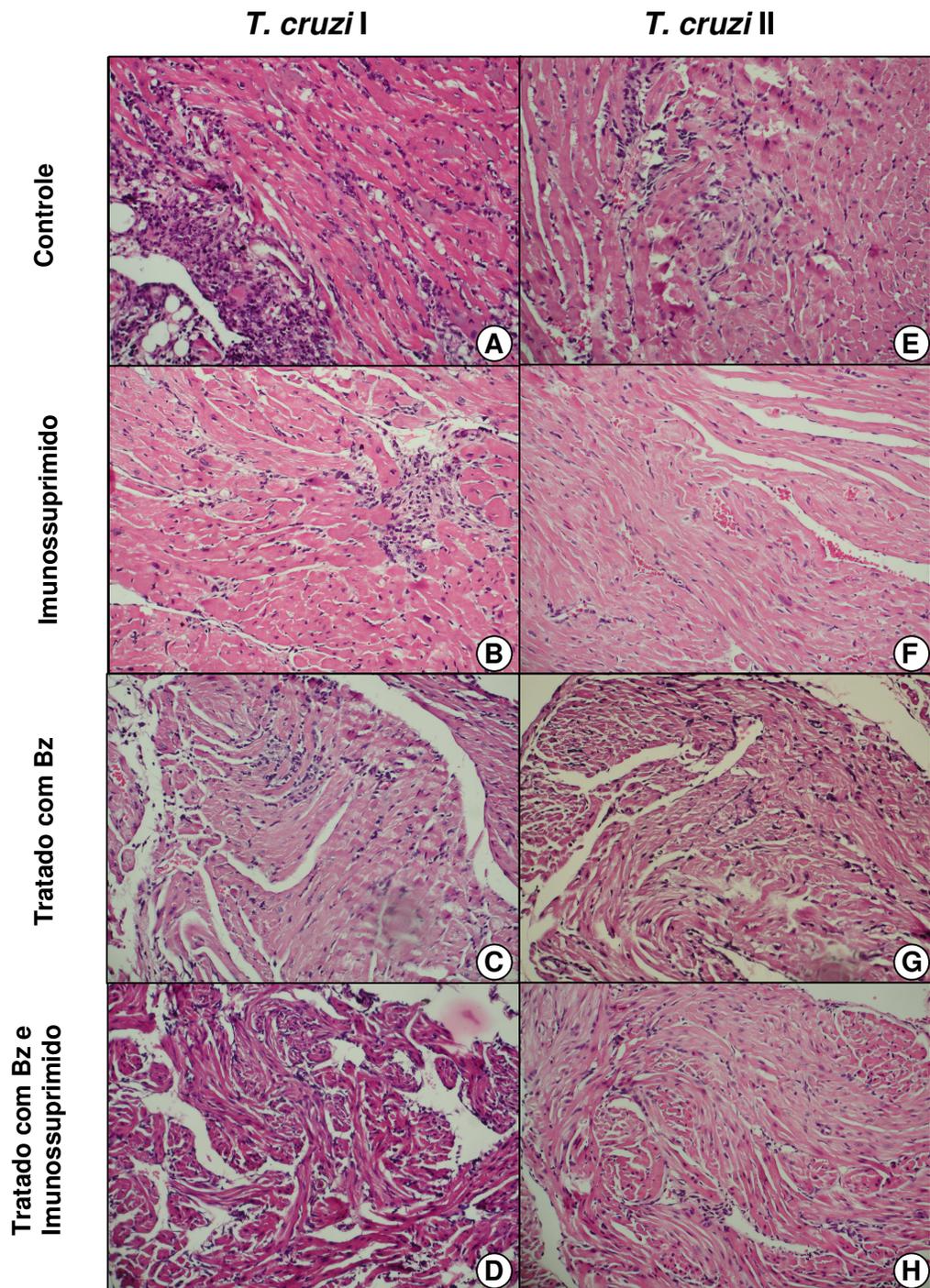


Figura 3 – Fotomicrografias do miocárdio de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e necropsiados durante a fase crônica da infecção. A-D – *T. cruzi* I; E - H – *T. cruzi* II. A e E- Infectado; B e F- Infectado e imunossuprimido; C e G- Infectado e tratado com benznidazol; D e H- Infectado, imunossuprimido e tratado com benznidazol – Hematoxilina Eosina, X300.

No encéfalo foi avaliado o processo inflamatório, sob a forma de nódulos gliais (NG – Figura 4) e infiltrados perivasculares (IPV – Figura 5), nos diferentes grupos experimentais, necropsiados tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção. O número médio de nódulos gliais presentes no encéfalo de camundongos infectados com clones pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, comparativamente aos animais infectados com os mesmos clones e submetidos à imunossupressão com Cy e/ou ao tratamento com Bz estão representados na tabela 5. Foi observada uma tendência de diminuição do processo inflamatório do encéfalo com a imunossupressão, tanto entre os animais tratados com Bz, quanto naqueles não tratados. Entretanto esta diferença foi significativa apenas nos animais inoculados com clones pertencentes à linhagem *T. cruzi* II.

Tabela 5: Número médio de nódulos gliais e infiltrados perivascular presentes no encéfalo de camundongos infectados com clones do *T. cruzi* pertencentes ao grupo *T. cruzi* I e *T. cruzi* II comparativamente aos animais inoculados com os mesmos grupos genéticos do parasito e submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida e/ou ao tratamento com benznidazol.

Grupo genético do <i>T. cruzi</i>	Animais infectados - Média ± Desvio padrão			
	Controle	Imunossuprimido	Tratado com Bz	Tratado com Bz e imunossuprimido
	Fase aguda			
<i>T. cruzi</i> I	^a 0,91±0,79 _A	^a 0,83±1,40 _A	^a 0,67±1,15 _A	^a 0,42±1,24 _A
<i>T. cruzi</i> II	^b 3,58±3,0 _A	^a 0,67±0,98 _B	^a 0,42±0,79 _{A,B}	^a 0,67±1,15 _{A,B}
	Fase crônica			
<i>T. cruzi</i> I	^a 1,08±1,24 _A	^a 0,75±0,72 _A	^a 0,25±0,59 _A	^a 0,5±0,95 _A
<i>T. cruzi</i> II	^b 2,75±3,04 _A	^a 0,83±1,47 _B	^a 1,11±1,76 _{A,B}	^a 0,58±1,0 _B

Letras iguais indicam grupos semelhantes

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$)

Letras vermelhas significam valores de $P = 0,062$ (limítrofe de significância)

Letras minúsculas indicam comparação na vertical

Letras maiúsculas indicam comparação na horizontal

Os aspectos microscópios observados no encéfalo dos camundongos inoculados com os clones de *T. cruzi* pertencentes às linhagens I e II estão apresentados nas figuras 4 e 5, representados pelas observações obtidas dos animais sacrificados durante a fase aguda da infecção. Na Figura 4 observa-se a presença de NG em todos os grupos avaliados, tanto em *T. cruzi* I quanto em *T. cruzi* II. Porém, verifica-se, ao contrário do observado no miocárdio, um processo inflamatório mais exuberante no grupo *T. cruzi*

II, constituído por NG apresentando-se mais estruturados, compactos, com maior quantidade de células mononucleadas. Este aspecto foi mais acentuado no grupo apenas infectado (Figura 4 A e 4E), no qual também foi verificada a presença de infiltrados perivasculares mais estruturados nos animais inoculados com parasitos pertencentes à linhagem *T. cruzi* II (Figura 5 A e 5E).

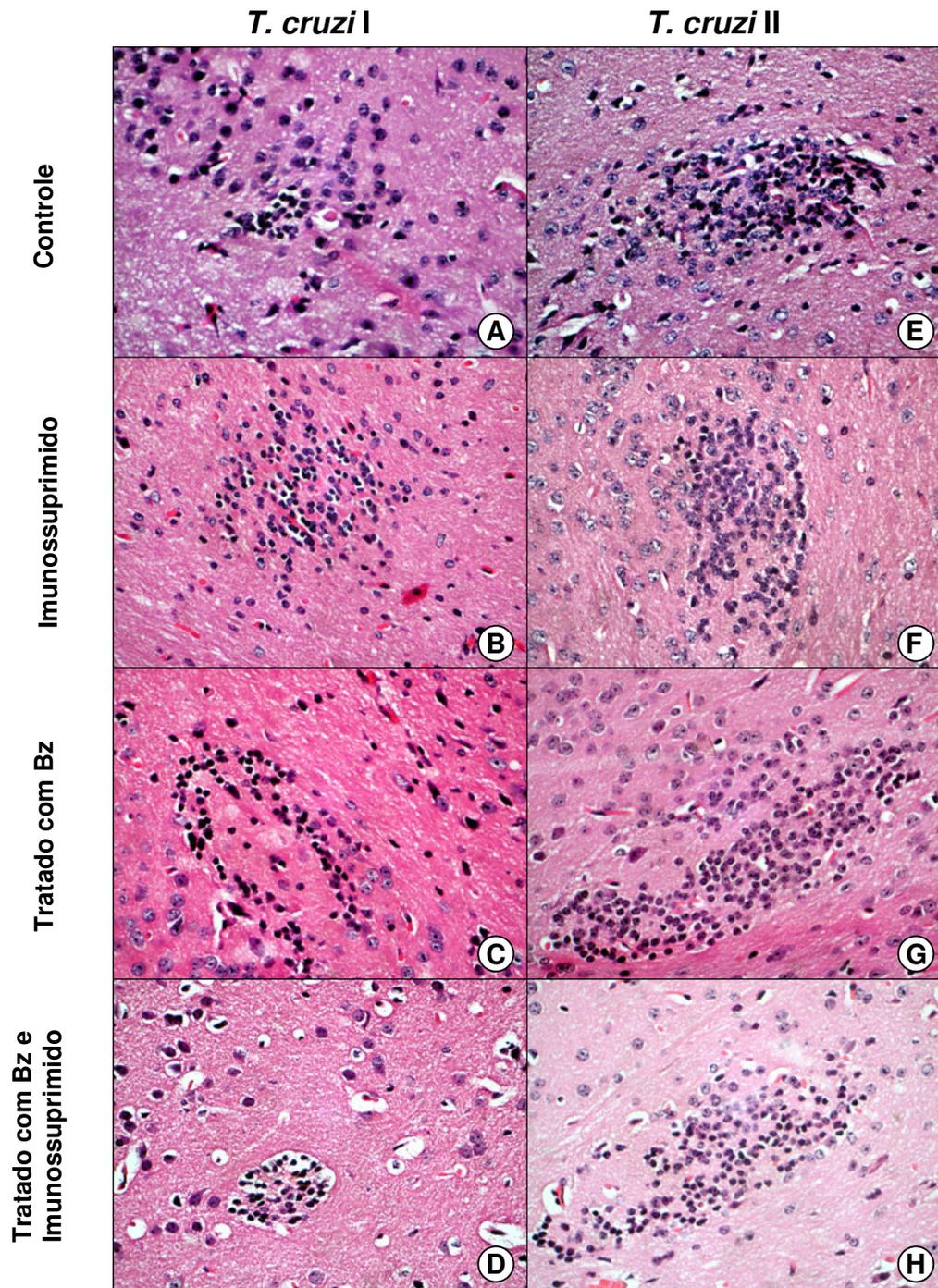


Figura 4 – Fotomicrografias do encéfalo de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e necropsiados durante a fase aguda da infecção. A-D – *T. cruzi* I; E-H – *T. cruzi* II. A e E- Infectado; B e F- Infectado e imunossuprimido; C e G- Infectado e tratado com benznidazol; D e H- Infectado, imunossuprimido e tratado com benznidazol – Hematoxilina Eosina, X300.

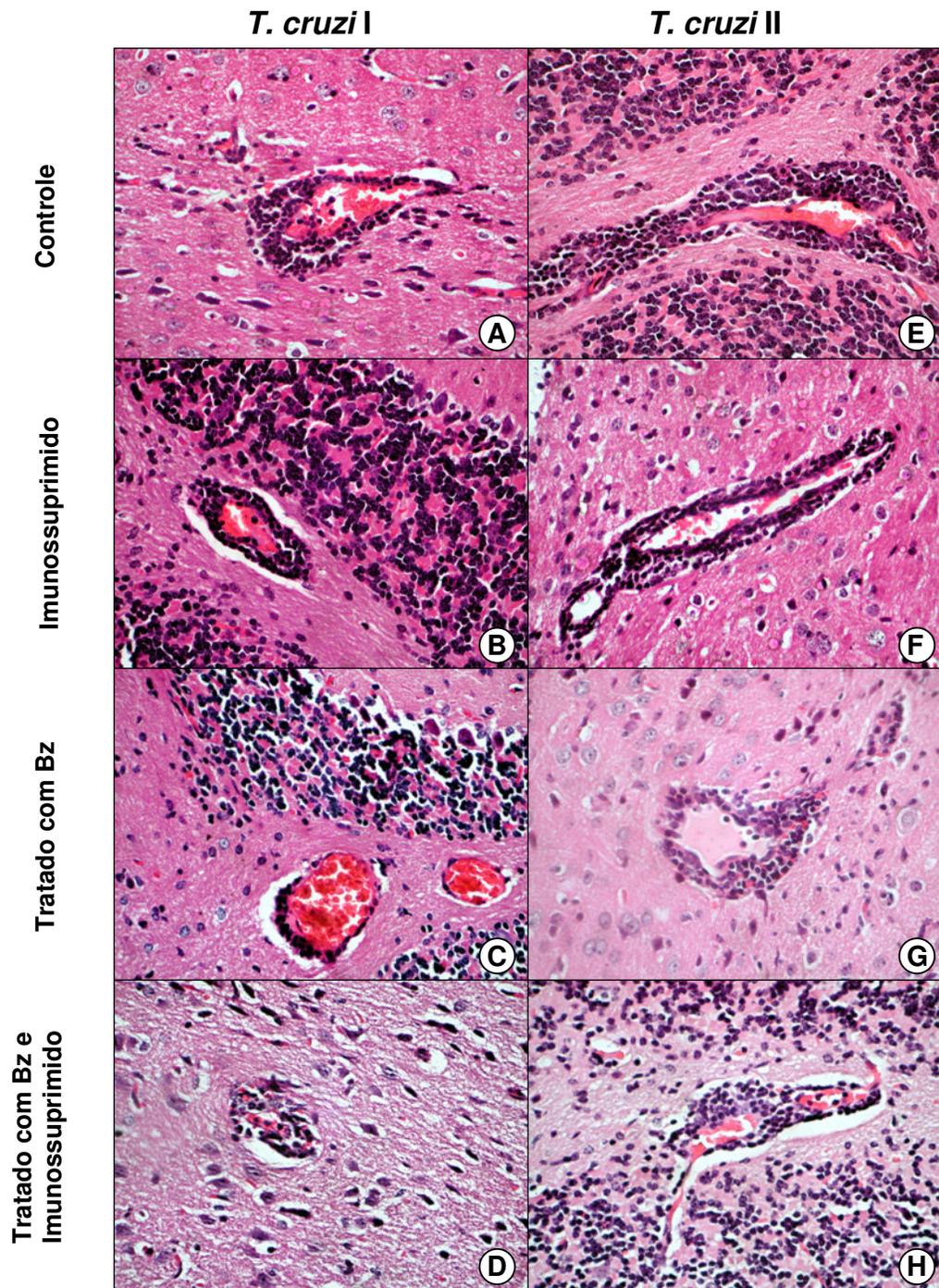


Figura 5 – Fotomicrografias do encéfalo de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e necropsiados durante a fase aguda da infecção. **A-D** – *T. cruzi* I; **E-H** – *T. cruzi* II. **A e E**- Infectado; **B e F**- Infectado e imunossuprimido; **C e G**- Infectado e tratado com benznidazol; **D e H**- Infectado, imunossuprimido e tratado com benznidazol – Hematoxilina Eosina, X300.

6 - Discussão

A reativação da doença de Chagas crônica é associada a eventos de imunossupressão vinculados a quimioterapia antineoplásica e/ou corticoidoterapia, em receptores de transplantes de rins, coração e medula óssea, e aos quadros de co-infecção com o HIV (Ferreira & Borges 2002; Ferreira *et al.*, 1997). De forma interessante, este evento de reativação não ocorre, necessariamente, em todos os indivíduos expostos a agentes ou condições imunossupressoras (Barousse *et al.*, 1980). Este fato suporta a hipótese de que tais eventos variem em função da linhagem genética de determinada população do *T. cruzi*, principalmente corroborado pela hipótese da evolução clonal do parasito (Tibayrenc *et al* 1986; Tibayrenc & Ayala 1988).

Esta variabilidade genética do parasito foi observada neste trabalho empregando quatro genótipos principais (clonets ou clones principais): 19 e 20 pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I e, 32 e 39 pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* II. De forma geral foram observadas diferenças marcantes, especialmente em relação ao perfil de curva de parasitemia, aos níveis parasitêmicos, e ao período de patência da infecção entre os animais inoculados com os clones pertencentes às duas linhagens genéticas do *T. cruzi*. Os animais inoculados com clones pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I apresentaram níveis de parasitemia mais elevados, com exceção dos animais inoculados com o clone SP104 cl1, pertencente à mesma linhagem genética, que apresentaram baixos níveis de parasitemia e curto período de patência, característica esta vinculada à linhagem genética *T. cruzi* II. Estes resultados corroboram com observações prévias *in vitro* e em camundongos Balb/c (Revollo *et al.*, 1998 Toledo *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2006), e em *Triatoma infestans* (Lana *et al.*, 1998) os quais confirmaram a correlação entre a distância filogenética entre genótipos clonais do *T. cruzi* e suas propriedades biológicas. Os resultados obtidos neste trabalho, utilizando camundongos Swiss como modelo experimental, mostraram, de forma geral, o mesmo padrão de resultados obtidos por Toledo *et al.*, (2002) em modelo de camundongos Balb/c, tendo sido observado apenas diferença em relação aos níveis de parasitemia, que foram mais elevados no modelo camundongo Swiss.

Os resultados apresentados pelos diferentes autores que mostraram a correlação entre a distância filogenética de populações do *T. cruzi* e as suas propriedades biológicas indicam uma possível existência de correlação entre a possibilidade de

reativação da doença de Chagas em condições de imunossupressão e as características genéticas de uma determinada população do *T. cruzi*.

Neste trabalho foi utilizada a Cy como agente imunossupressor. A Cy faz parte de um subgrupo de substâncias designadas por agentes alquilantes, são fármacos citotóxicos ou citostáticos, também conhecidos como antineoplásicos. O seu mecanismo de ação consiste em provocar danos em alvos celulares, induzindo ligação cruzada e/ou fragmentação das hélices de DNA impedindo a divisão celular, afetando as células em todas as fases do ciclo celular de forma inespecífica. Este fármaco possui também atividade imunossupressora (Cupps *et al.*, 1982), afetando várias funções imunológicas (Calabrese *et al.*, 1996). Em infecções agudas de camundongos tem sido demonstrado que a Cy, bem como a Ciclosporina, são capazes de modular a inflamação cardíaca, e dependendo do esquema terapêutico e da dose utilizada pode induzir aumento da miocardite e do parasitismo tecidual (Calabrese *et al.*, 2003).

Neste estudo foi demonstrado uma forte correlação entre a distância filogenética de um conjunto de 8 clones representativos dos 4 grupos genéticos principais do *T. cruzi* e a reativação da infecção pelo *T. cruzi* em condições de imunossupressão. A imunossupressão com Cy foi capaz de induzir a reativação da parasitemia, tanto após administração no final da fase aguda, quanto na fase crônica da infecção, sendo isso observado apenas nos animais inoculados com clones pertencentes à linhagem *T. cruzi* I. Nos animais inoculados com a linhagem *T. cruzi* II foi observada a reativação da parasitemia apenas em um animal inoculado com o clone IVV cl4. Entretanto, o índice de reativação da parasitemia foi variável entre os diferentes clones, tendo sido observados menores índices nos animais inoculados com o clone SP104 cl1 (genótipo 19). Entretanto, quando os camundongos foram imunossuprimidos durante a fase crônica da infecção foram observados maiores índices de reativação nos animais inoculados com clones do genótipo 19. Por outro lado, os níveis de parasitemia durante a reativação induzida pela Cy tenderam a ser maiores nos animais inoculados com clones do genótipo 20, tanto naqueles imunossuprimidos durante a fase aguda, quanto na fase crônica da infecção. De forma interessante os animais inoculados com o clone SP104 cl1 (genótipo 19), que apresentaram o menor índice de reativação da parasitemia quando imunossuprimidos durante a fase aguda, apresentaram os maiores índices de reativação quando imunossuprimidos na fase crônica da infecção, porém sempre

apresentando baixos níveis de parasitemia. Estes dados mostraram que as características da reativação da infecção são variáveis, e podem ser relacionadas com a população do parasito e também com a fase da infecção. Esta hipótese é reforçada pelos resultados de Andrade *et al.* (1997) que não observaram a reativação da parasitemia de camundongos inoculados com as cepas Y, Peruviana e 21SF, quando imunossuprimidos pela Azatioprina, Betametazona ou Cy durante a fase crônica da infecção. Este resultado é interessante, principalmente ao considerar que estas cepas do *T. cruzi*, especialmente a cepa Y, são marcadamente mais virulentas e patogênicas do que os clones utilizados neste estudo.

Estes resultados provavelmente são reflexos da variabilidade genética observada entre as diferentes populações do *T. cruzi* utilizadas neste estudo, indicando, mais uma vez, a existência de correlação entre a diversidade genética e biológica do *T. cruzi*. Anteriormente, foi demonstrado por Pereira *et al.*, (1998) que diferentes cepas do *T. cruzi* reagem de forma diferente aos efeitos da imunossupressão com Cy, entretanto, os autores não correlacionaram estes achados com as distâncias filogenéticas das diferentes populações do *T. cruzi* avaliadas.

De acordo com Hudson *et al.* (1983) os genótipos clonais 19, 20, 39 e 32 apresentam diferentes relações filogenéticas, sendo que os genótipos 20 e 19 são mais proximamente relacionados, ao passo que os genótipos 39 e 32 são mais distantes dos genótipos 19 e 20, mas são mais próximos entre si. Os genótipos 19 e 20 diferem em poucas características, em particular pelo locus isoenzimático 6PGDH, o qual é heterozigoto no genótipo 20 e homozigoto no genótipo 19 (Tibayrenc & Ayala, 1988).

Neste caso, é possível especular, que a recrudescência da doença de Chagas crônica em indivíduos imunossuprimidos seria definida, pelo menos parcialmente, pela característica genética da população do *T. cruzi* presente. Interessantemente, a reativação sintomática da doença não ocorre em todos os chagásicos crônicos expostos a agentes imunossupressivos (Barousse, 1980; Lopes Blanco *et al.*, 1992). Também entre os indivíduos com HIV/AIDS têm sido descritos tanto casos de ausência de reativação (Pacheco *et al.*, 1998), como a reativação assintomática da doença de Chagas crônica, detectada apenas pelo aumento do parasitismo sanguíneo (Sartori *et al.*, 2002). Especificamente após o transplante cardíaco, a incidência de manifestações clínicas

decorrentes da reativação da infecção pelo *T. cruzi* é de frequência variável (0% a 43%) (Bocchi *et al.*, 1993; 1996).

É interessante observar que a imunossupressão induziu também, o aumento do parasitismo tecidual (músculo cardíaco e esquelético). O parasito foi detectado nos tecidos de 8/22 camundongos imunossuprimidos na final da fase aguda, em contraste de 1/24 entre os animais não imunossuprimidos. Naqueles imunossuprimidos durante a fase crônica o parasito foi detectado em três animais, mas em nenhum daqueles não imunossuprimidos.

Toledo *et al.*, 2004a, ao avaliar o parasitismo tecidual em animais infectados com os clones pertencentes aos mesmos genótipos estudados neste trabalho observou parasitismo tecidual discreto, mas com maior frequência, em animais infectados com os clones pertencentes aos genótipos 19, 20 e 32, avaliados durante a fase aguda da infecção e nos animais infectados com clones do genótipo 39, avaliados durante a fase crônica da infecção. É importante ressaltar que neste estudo os animais foram necropsiados no final da fase aguda da infecção (aproximadamente 84 dias), em contraste com Toledo *et al.* (2002), onde a necropsia foi realizada no pico de parasitemia.

De uma maneira geral verificou-se um processo inflamatório pouco mais exuberante no músculo cardíaco dos animais inoculados com os clones da linhagem *T. cruzi* I, em relação ao *T. cruzi* II, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção. A intensidade do processo inflamatório não foi significativamente alterada pela imunossupressão com Cy em nenhuma das fases da doença. De forma interessante, outros autores demonstraram que o tratamento com Cy após a infecção pelo *T. cruzi*, tanto no modelo canino quanto no modelo murino, induz ao aumento da miocardite (Andrade *et al.*, 1987; Silva & Rossi, 1990). De acordo com Calabrese *et al.*, 1996, a transiente abolição da atividade T-supressora pode ser o fator que explicaria este aumento da miocardite. Entretanto, como nos estudos acima o tratamento imunossupressivo foi iniciado nos primeiros dias após a inoculação dos animais e, neste estudo, a administração foi realizada no final da fase aguda e na fase crônica da infecção, esta contradição poderia ser explicada pelo mecanismo de ação da Cy, que atua apenas nas células em proliferação, assim a sua ação poderia estar alterada durante as diferentes fases da infecção. Esta hipótese pode ser reforçada pelos resultados de

Calabrese *et al.*, (2003), que mostraram um intenso infiltrado linfoplasmocitário e poucos parasitos no miocárdio de camundongos que receberam Cy 2 dias antes da inoculação. Em contraste aos animais que receberam o tratamento com Cy 5 dias após a inoculação e apresentaram um aumento da carga parasitária associada a uma redução do infiltrado inflamatório no miocárdio. Também em ratos foi demonstrado que uma única dose de Cy administrada 5 dias após a inoculação dos animais com a cepa Y previne a miocardite e a denervação simpática, induzindo, ao mesmo tempo um aumento da carga parasitária (Guerra *et al.*, 2001).

De forma inversa, no encéfalo, foi observado um processo inflamatório mais intenso nos animais inoculados com clones pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* II, nos quais o tratamento com Cy induziu a uma redução significativa do processo inflamatório, apesar de não ter sido detectado parasitos neste tecido. Este fato é interessante, pois estudos experimentais que correlacionam divergências filogenéticas, alterações histopatológicas, e tropismo tecidual têm associado o genótipo 20 do *T. cruzi* I com invasão do sistema nervoso central (Diego *et al.*, 1998). Por outro lado, Andrade *et al* (1997) observaram um aumento da reação inflamatória no cérebro de camundongos infectados com as cepas Y, Peruviana (*Biodema* I e II) imunossuprimidos com Cy e Azatioprina na fase crônica da infecção, enquanto nos animais inoculados com a cepa 21SF (*T. cruzi* Biodema III) as lesões foram similares às dos animais não imunossuprimidos. Entretanto, apesar das alterações histológicas detectadas não foram observados parasitos no cérebro dos animais.

Estes dados reforçam a associação entre a reativação de infecções latentes pelo *T. cruzi* com determinados genótipos do parasito, levantando perguntas para investigações futuras sobre os parâmetros que devem ser utilizados para prevenir a reativação da doença sob condições de imunossupressão. Alguns autores mostraram que o tratamento com Bz é efetivo em suprimir a parasitemia e as manifestações clínicas na doença recorrente (Nishioka *et al.*, 1993; Sartori *et al.*, 2002), entretanto é observada uma alta taxa de recorrência após a descontinuidade do tratamento (Rezende *et al.*, 2006). Neste caso, outro aspecto importante para ser avaliado é o efeito protetor do tratamento com Bz na prevenção secundária da reativação da parasitemia sob condições de imunossupressão. O efeito protetor do Bz na reativação da parasitemia em pacientes chagásicos crônicos tratados com corticosteróides foi demonstrado por Rassi *et al*,

(1999) e corrobora com achados experimentais em camundongos onde uma droga tripanocida (no caso o nifurtimox) previna a reativação da doença quando usada em associação com drogas imunossupressoras (Meckert *et al.*, 1988).

Neste caso, como o curso da infecção experimental pelo *T. cruzi* e a resposta ao tratamento específico são marcadamente influenciados pela população do parasito e pela resposta do sistema imune do hospedeiro, é razoável supor que a resposta terapêutica durante os episódios de reativação em indivíduos imunossuprimidos, poderia ser marcadamente dependente da população do parasito presente.

Esta hipótese foi confirmada pelos resultados obtidos neste estudo, tendo sido demonstrado que a eficácia do tratamento com Bz em prevenir a reativação da parasitemia em condições de imunossupressão pode ser relacionada com a fase da infecção em que o tratamento foi realizado e com a população do *T. cruzi* presente. O tratamento específico, de maneira geral, não alterou o índice de reativação da parasitemia quando o tratamento foi realizado durante a fase aguda da infecção, mas foi capaz de induzir a uma diminuição da reativação da parasitemia quando os animais foram tratados com Bz durante a fase crônica. Entretanto, foi observada uma variação na resposta ao tratamento entre os diferentes clones avaliados, pois o tratamento com Bz realizado durante a fase aguda preveniu a reativação da parasitemia nos animais inoculados com o clone, SP104 c11 (genótipo 19), mas não com o Gamba c11 (genótipo 19) e nem com o Cuica c11 ou o P209 c11 (genótipo 20). Além disso, é interessante ressaltar que nos animais inoculados com clones do genótipo 20 foram observados, de maneira geral, índices de parasitemia maiores quando imunossuprimidos após o tratamento com Bz, assim como um parasitismo mais intenso no tecido cardíaco, em relação aos animais imunossuprimidos, mas não submetidos ao tratamento específico.

Também nos animais tratados com Bz durante a fase crônica foram observados dois padrões distintos: (1) proteção, entre os animais inoculados com os clones SP104 c11 (genótipo 19) e Cuica c11 (genótipo 20); (2) aumento do índice de reativação entre os animais inoculados com os clones Gamba c11 (genótipo 19), P209 c11 (genótipo 20), porém, nestes animais não foi detectado o aumento do parasitismo tecidual em relação aos não tratados. Além disso, é importante salientar que o tratamento com Bz não foi eficaz em reduzir significativamente o processo inflamatório no coração e no encéfalo, em relação aos animais imunossuprimidos que não receberam o tratamento específico.

Estes resultados estão de acordo com Toledo *et al.*, 2004a, que demonstraram uma redução no parasitismo tecidual induzida pelo tratamento com Bz em camundongos inoculados com clones do genótipo 19, mas não naqueles inoculados com clones do genótipo 20.

Os dados apresentados mostraram claramente a correlação entre a linhagem genética do *T. cruzi* e a eficácia do Bz na prevenção secundária da reativação da doença de Chagas sob condições de imunossupressão. Neste caso seria importante investigar se a evolução dos níveis de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b após o tratamento específico também poderiam ser relacionados com a linhagem genética do *T. cruzi*. De acordo com Andrade *et al.*, 1999, a variabilidade genética do parasito pode determinar o tropismo tecidual e exercer um importante papel na patogênese da doença. Desta forma, o conhecimento sobre a indução das diversas classes e subclasses de imunoglobulinas por diferentes populações do *T. cruzi* poderia contribuir para o conhecimento do mecanismo de patogênese da doença de Chagas.

Em humanos ocorre produção de quatro subclasses de imunoglobulina G (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), e o controle na produção destas subclasses é mediado por diferentes citocinas (Kowano *et al.*, 1994). Dados na literatura mostram que IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β (perfil anti-inflamatório) são responsáveis por auxiliar a indução das subclasses IgG1 e IgG3 (Briere *et al.*, 1994, Reed & Scott, 1993), e que IL-12, INF- γ , TNF- α (perfil inflamatório) levam à produção de IgG2, sendo que a produção de IgG1 e IgG2 é antagonicamente regulada. A resposta mediada por anticorpos, estimulada por citocinas inflamatórias induz principalmente a produção de IgG2. Este anticorpo opsoniza o parasito, importante tanto para a sua destruição pelo complemento, como para a fagocitose por macrófagos. Os anticorpos das subclasses IgG1 e IgG4 têm sua produção desencadeada por citocinas anti-inflamatórias, não ativam o complemento e não se ligam a receptores Fc dos macrófagos. Por outro lado, estes anticorpos estão envolvidos na defesa do hospedeiro mediada por células efectoras não fagocitárias, como mastócitos e eosinófilos (Mosmann & Coffman, 1989; Romagnani, 1991).

A correlação entre o tratamento com Bz e a evolução de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG e das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b, foi realizada em soro coletado dos camundongos tratados com Bz antes do início da imunossupressão com Cy.

O tratamento com Bz induziu uma queda significativa ($P \leq 0,05$) nos níveis de absorvância determinados pela ELISA, independente da classe ou subclasse de anticorpos avaliada. Apenas nos soros dos animais inoculados com clones pertencentes aos genótipos 32 e 39 não foi detectada diferença significativa dos níveis de anticorpos da subclasse IgG 1 entre os animais tratados com Bz e os não tratados. É importante salientar que esta queda da absorvância não pode ser relacionada à cura parasitológica, pois o mesmo perfil sorológico foi detectado tanto nos animais inoculados com clones pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I (mais resistentes ao Bz), quanto com clones pertencentes à linhagem *T. cruzi* II (menos resistentes ao Bz). Esta queda dos níveis de anticorpos após o tratamento realizado durante a fase aguda e crônica recente da doença de Chagas foi demonstrada anteriormente tanto em infecções experimentais de cães (Guedes *et al*, 2002), como em humanos (Andrade *et al*, 1992; Sosa-Estani *et al*, 1998).

Por outro lado, o efeito do tratamento com Bz sobre os níveis de absorvância nos soros dos animais tratados durante a fase crônica apresentou-se menos marcante. De maneira geral o tratamento não induziu a alteração significativa na absorvância obtida através da ELISA, quando comparados aos obtidos nos soros dos animais não tratados. Apenas nos animais inoculados com os clones do genótipo 19 e 32 foi detectada uma queda significativa nos níveis de anticorpos da classe IgG, da subclasse IgG1 nos animais inoculados com clones do genótipo 19, de IgG 2b nos animais inoculados com clones do genótipo 32. Estes dados mostraram que as alterações dos níveis de anticorpos IgG e das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b após o tratamento específico com Bz ocorreu de forma similar entre os animais infectados com os diferentes clones utilizados neste estudo. Além disso, é importante ressaltar que estes clones apresentam diferentes níveis de resistência ao Bz (Quadro 2). Neste caso, as variações dos níveis de anticorpos observados na sorologia realizada logo após o tratamento devem ser avaliadas com cuidado.

Nossos resultados mostraram pela primeira vez a correlação entre a divergência filogenética do *T. cruzi* e a reativação da doença de Chagas sob condições de imunossupressão, sendo esta mais relacionada a parasitos pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I. Além disso, ficou demonstrado que a prevenção secundária da reativação da doença de Chagas pelo tratamento com Bz pode ser ao menos parcialmente, dependente das características genéticas da população do *T. cruzi*

envolvida. Este fato deve ser seriamente considerado especialmente em indivíduos chagásicos crônicos que vão receber tratamentos vinculados à quimioterapia antineoplásica e/ou corticoidoterapia e em receptores de transplantes de rins, coração e medula óssea. Os resultados obtidos neste estudo mostram também a importância de se avaliar outros medicamentos imunossupressores normalmente utilizados nas situações citadas.

7 - Conclusões

Os resultados obtidos no estudo da infecção experimental de camundongos Swiss com *T. cruzi* nos permite concluir que:

1. Existe correlação entre os parâmetros biológicos avaliados (curva de parasitemia, período pré-patente, período patente) e a divergência filogenética do *Trypanosoma cruzi*.
2. A reativação da infecção pelo *T. cruzi* induzida pela ciclofosfamida pode ser correlacionada com as características genéticas de uma determinada população do *T. cruzi*.
3. A reativação da parasitemia induzida pela ciclofosfamida é associada a parasitos pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I.
4. A imunossupressão com ciclofosfamida realizada ao final da fase aguda induziu a um aumento do parasitismo tecidual no coração e no músculo esquelético dos animais inoculados com os clones da linhagem genética *T. cruzi* I.
5. O tratamento específico com benznidazol, realizado no final da fase aguda, não foi efetivo em prevenir a reativação da parasitemia induzida pela imunossupressão com ciclofosfamida.
6. A prevenção da reativação da parasitemia, induzida pela imunossupressão pela Cy administrada durante a fase crônica da infecção, foi obtida após o tratamento específico com benznidazol e, este efeito protetor mostrou-se relacionado com a população do *T. cruzi*.
7. O tratamento com benznidazol realizado durante a fase aguda da infecção induz a uma queda significativa dos níveis de anticorpos, independente do grau de resistência ao fármaco ou da linhagem genética do *T. cruzi*.
8. O tratamento com benznidazol, realizado durante a fase aguda da infecção, induziu

diferentes respostas em relação à frequência e a intensidade do parasitismo do coração e/ou do músculo esquelético entre os animais inoculados com os diferentes clones avaliados.

8- Referências Bibliográficas

- AMATO J.G.P., AMATO N. V., AMATO V.S., ET AL. (1997). Lesões cutâneas como únicas manifestações de reativação pelo *Trypanosoma cruzi* em receptora de rim por transplante. *Rev. Soc. Bras. Med. Hyg.* **97**, 367-70.
- ANDRADE SG. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Pat. Trop.* **1**, 65-121.
- ANDRADE S.G., ANDRADE Z. & SADIGURSKY M. (1980). Combined treatment with a nitrofuranic and a corticoid in experimental Chagas disease in the dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**, 766-773.
- ANDRADE S.G., CARNEIRO A., SOUZA A.J.M., LIMA E.S. & ANDRADE Z. (1997). Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Exp. Path.* **78**, 391-399.
- ANDRADE S.G., CARVALHO M.L, FIGUEIRA R.M., ANDRADE Z.A. (1970). Recovery and characterization of trypanosomas inoculated into immune animals (re-inoculation with different strains of *T. cruzi*). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **12(6)**, 395-402
- ANDRADE L.O, MACHADO C.R., CHIARI E., PENA S.D., MACEDO A.M. (1999). Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* **100(2)**, 163-72.
- ANDRADE S.G., MAGALHÃES J.B. & PONTES A.L. (1985). Evaluation of chemotherapy with benzonidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health.* **63**, 721-726.
- ANDRADE S.G. & MAGALHÃES J.B. (1997). Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **30(1)**, 27-35.
- ANDRADE S.G., RASSI A., MAGALHÃES J.B., FERRIOLLI E.F. & LUQUETTI A.O. (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **30(1)**, 27-35.
- ANDRADE Z.A., ANDRADE S.G, SADIGURSKY M. (1987). Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. *Am. J. Pathol.* **127(3)**, 467-73.
- ANONYMOUS. (1999). Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94 (suppl.1)**, 429-4432.
- BARBOSA A.J. (1985). Immunocytochemical method for the identification of *Trypanosoma cruzi* amastigotas in routine histological sections. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo.* **27(6)**, 293-7.

- BARNABBE C., BRISSE S., & TIBAYRENC M. (2000). Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitol.* **120 (Pt5)**, 513-526.
- BAROUSSE A.P. (1980). Chagas disease and immunosuppression. *Medicina (B Aires)*. **40 (6 Pt 2)**, 896
- BARRET T.V., HOFF R.H., MOTT K.E., MILES M.A., GODFREY D.G., TEIXEIRA R., ALMEIDA DE SOUZA J.A. & SHERLOCK L. A. (1980) Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**, 84-90.
- BICE D.E. & ZELEDON R. (1970) Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J.Parasitol.* **56**, 663-670.
- BOCCHI E.A.; BELLOTI G.; MOCELIN A.O. *et al.* (1996) Heart Transplantation for Chronic Chagas' Heart disease. *Ann. Thorac. Surg.* **61**, 1727-1733.
- BOCCHI E.A.; BELLOTI G.; UIP D. *et al.* (1993). Long-tem follow-up after heart transplantation in Chagas' disease. *Transpl. Proc.* **25**, 1329-1330.
- BRENER Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.* **4**, 389-396.
- BRENER Z. (1965). Comparative studies of different strains of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **59**, 19-26.
- BRENER Z. (1969). The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **63**, 215-220. 44
- BRENER Z. (1977). Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO, Scientific Publication* **347**, 11-21.
- BRENER Z., ANDRADE Z.A., BARRAL-NETO M. (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan. 2ed. 431p.
- BRENER & CHIARI E. (1963). Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst. Med. Trop.* São Paulo **16**, 39-46.
- BRENER Z., CHIARI E. & ALVARNGA N.J. (1974). Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **16**, 39-46.

- BRIERE F., SERVET-DELPRATE C.H., BRIDON, J.M. (1994). Human interleukin 10 induces nave surface immunoglobulin D+ (slgD+) B cells to secrete IgG1 e IgG3. *J. Exp. Med.* **179**, 757-762.
- BRONFEN E., DE ASSIS ROCHA F.S., MACHADO G.B., PERILLO M.M., ROMANHA A.J., CHIARI E. (1989). Isolation of *Trypanosoma cruzi* samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **84(2)**, 237-240.
- CALABRESE KS. (1999) Imunosuppressive Drugs as a Tool to Explore Immunopathology in Experimental Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94**, 273-276.
- CALABRESE K.S., PARADELA A.S.R.C., VALLE T.Z., TEDESCO R.C., LEONARDO R., MORTARA R.A., GONÇALVES da COSTA S.C. (2003). T cells subpopulations in myocardial inflammatory infiltrates detected by confocal microscopy: dose dependence in mice treated with cyclophosphamide during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathol. Biol.* **51**, 129-134.
- CALABRESE K.S., BAUER P.G. & GONÇALVES DA COSTA F.C. (1987). Evolution and distribution of *Trypanosoma cruzi* in some organs of Cyclophosphamide treated mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**, 505-514.
- CARNEIRO M., ROMANHA A.J., CHIARI E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **86(4)**, 387-93.
- CHIARI E., DIAS J.C., LANA M., CHIARI C.A. (1989). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **22(1)**, 19-23.
- CLARK C.G. & PUNG O.J. (1994). Host specificity of ribosomal DNS variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 175-179.
- CONARES W.J. (1980). Pratical non parametric statistics. Jonh Wilwu & Sons. New York, 2^aed., Chapter 6.
- CORTI M. & YAMPOSKY C. (2006). Prolonged survival and immune reconstitution after chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev. Soc. Brasl. Med. Trop.* **39(1)**, 85-88.
- CUPPS T.R., EDGAR L.C., FAUCI A.S. (1982). Supression of human B lymphocyte function by Cyclophosphamide. *J. Immunol.* **128 (6)**, 2453-2457.
- DIEGO J.A., PALAU M.T., GAMALLO C., PENIN P. (1998). Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*.

- Trop Med Int Health.* **3(3)**, 222-33.
- DEL CASTILHO M., MENDONZA G., OVIEDO J., BRANCO R.P., ANSELMO A.E. & SILVA M. (1990). AIDS and Chagas disease with central nervous system tumor-like lesion. *Am. J. Med.* **88**, 693-694.
- D' IMPÉRIO LIMA M.R., EISEN H., MINOPRIO P., JOSKOWIEZ M., COUTINHO A. (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* **127**, 353-356.
- FERREIRA M.S. & BORGES, A.S. (2002) Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**, 443-457.
- FERREIRA M.S., NISHIOKA S.A., ROCHA A., SILVA A.M., FERREIRA S.G., OLIVIER W. & TOSTES Jr S. (1991). Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalites in a hemophiliac patient. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 723-727.
- FERREIRA M.S., NISHIOKA S.A., SILVESTRE M.T.A., BORGES A.S., NUNES-ARAÚJO F.R.F., ROCHA A. (1997). Reactivation of Chagas disease in patients with AIDS: report oh three new cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **25(6)**, 1397-400.
- FERREIRA M.S. (1999). Chagas disease and immunossupression. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**, 223-237.
- FILARDI L.S. & BRENER Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**, 755-759.
- FIGLIOLI A.I., STOLF N.A.G., HONORATO R., BOCCHI E., BACAL F., UIP D., STRABELLI T., ISSA V., AMATO V.A., FIGLIOLI L.R., OLIVEIRA S.A. (2005). Later Evolution After Cardiac Transplantation in Chagas' Disease. *Transplantation Proceedings.* **37**, 2793-2798.
- FRANCO D.J., VAGO A.R., CHIARI E., MEIRA F.C., GALVÃO L.M. & MACHADO C.R. (2003). *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol.* **104**, 54-61.
- GALLO P.; FABIÃO NETO O.M.; SUAREZ J.M.M.; BORBA R.P. (1992). Acute central nervous system infection by *Trypanosoma cruzi* and AIDS. *Arq. Neuropsiquiatr.* **50**, 375-377.
- GLUCKSTEIN D., CIFERRI F. & RUSKIN J. (1992). Chagas disease another cause of cerebral mass in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* **92**, 429-432.

- GUEDES P.M.M.; VELOSO V.M.V., TAFURI W.L., GALVÃO L.M.C., CARNEIRO C.M., LANA M., CHIARI E., SOARES K.A., BAHIA M.T. (2002). The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop.* **84**, 9-17.
- GUERRA L.B., ANDRADE L.O., GALVÃO L.M.C., MACEDO A.M., & MACHADO C. R.S. (2001). Cyclophosphamide-induced immunosuppression protects cardiac noradrenergic nerve terminals from damage by *Trypanosoma cruzi* infection in adult rats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**, 505-509.
- HIGUCHI M.L., RIES, M.M., AIELLO V.D., BENVENUTI L.A., GUTIERREA P.S., BELLOTTI, G., PILEGGI F. (1997). Association of an increase in CD8 T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**, 485-489.
- HUDSON L., GROVER F., GUTTERIDGE W.E., KLEIN R.A., PETERS W., NEAL R.A., MILES M.A., SCOTT M.T., NOURISH R., AGER B.P. (1983). Suggested guidelines for work with live *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 416-419.
- JONES E.M., COLLEY D.G., TOSTES S., LOPES E.R., JONES-VNENCAK C.L., MCCURLEY T.L. (1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**, 348-357.
- KAWANO Y., NOMA T., YATA J. (1994) Regulation of human IgG subclass production by cytokines IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J. immunol.*, **153**, 4948-4958.
- KUMAR R., KLINE I.K. & WALKER A.H. (1970). Immunosuppression in experimental acute and subacute chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**, 932-939.
- LAMBRECHT F.L. (1965). Biological variations in Trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **7**, 2009-20012.
- LANA M., PINTO A.S., BARNABÉ C., QUESNEY V., NÖEL S., TIBAYRENC, M. (1998) *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology.* **96**, 61-66.
- LAURENT J. P., BARNABÉ C., QUESNEY V., NOËL S. & TIBAYRENC M. (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* **114**, 213-218.
- LAZO J., MENESES A.C.O., ROCHA A., FERREIRA M.S., MARQUEZ J.O., CHAPADEIRO E., LOPES E.R. (1998). Chagasis Meningoencephalitis in the

- immunodeficient. *Arq. Neuropsiquiatr.* **56(1)**, 93-97.
- LEON J.S. & ENGMAN D.M. (2001). Autoimmunity in Chagas' heart disease. *Int. J. Parasitol.* **31**, 555-561.
- LOPEZ-BLANCO A.O., CAVALLI N.H., JASOVICH A., GOTLIEB D. & GONZALES CAPPAS S. (1992). Chagas disease and kidney transplantation follow-up of nine patients for 11 years. *Transplantation.* **24**, 3089-3090.
- LUQUETTI A O. (1990). Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis. Multicentre trial. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz.* **85**, 497.
- NUSSEINZWEIG, V AND GOBLE, F. (1966). Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *Exp. Parasitol.* **18**, 224-230.
- MADALOSSO G., PELLINE G.C.A., VASCONCELOS J.M., RIBEIRO F.A., WEISSMANN L., FILHO O.S.G., OLIVEIRA P.C.A. & VIDAL E.J (2004). Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS-defining illness in Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo.* **46**, 199-202.
- MARRETTO J.P.M. & ANDRADE S.G. (1994). Biochemical behavior of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **27**, 209-215.
- MARTINS H.R., TOLEDO M.J.O., VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., TAFURI W.L., BAHIA M.T., VALADARES H.M., MACEDO A.M., LANA M. (2006). *Trypanosoma cruzi*: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. *Experimental Parasitology.* 237-246.
- MECKERT P.M.C., CHAMBO J.G, LAGUENS RP. (1988). Modification of the pattern of infection and evolution of cardiopathy in experimental Chagas' disease after treatment with immunosuppressive and trypanocidal drugs. *Medicina (B Aires)* **48**, 7-11.
- MELO R.C. & BRENER Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* **64**, 475-482.
- MILES M.A., APT B.W.; WIDMER G., POVOA M.M., SCHOFIELD C.J. (1984). Isoenzyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78(4)**, 526-35.
- MILES M.A., TOYÉ P.J., OSWALDO S.C. & GOLDFREY D.G. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**, 217-225.

- MILES M.A., PÓVOA M., SHAW J.J., LAINSON R. & TOYÉ P. J. (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autoctonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*. **272**, 819-821.
- MILLER G. E., COHEN S. & RITCHEY A. K. (2002). Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory Cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol.* **6**, 531-541.
- MINOPRIO P., ELY C.M., MURPHY E., HONTEBEYRIE-JOSKOWICK M., COFFMAN, R., COUTINHO, A., O' GARRA, A. (1993). Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN- gama dependent. *J. Immunol.* **151**, 4200-4212.
- MINOPRIO P., ITOHARA, S., HEUSSER, C., TONEGAWA, S., COUTINHO A. (1989). Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCR T cells. *Immunol. Rev.* **112**, 183-207.
- MOSMANN T.R. & COFFMAN R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145-173.
- MURRAY H.W., SPITALNY G.L. & NATHAN C.T. (1985). Action of mouse peritoneal macrophages *in vivo* and *in vitro* by interferon-gamma. *J. Immunol.* **146**, 3591-3598.
- NABORS G.S. & TARLETON R.L. (1991). Differential control of IFN- gama and IL-12 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 3591-3597.
- NISHIOKA S.A., FERREIRA M.S., ROCHA A., BURGARELLI M.K.N., SILVA A.M., DUARTE M.I.S., SCHIMITT F.C. (1993). Reactivation of Chagas' disease successfully treated with benznidazole in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **88**, 493-496.
- PACHECO R.S. & BRITO C.M. (1999). Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94** (Suppl 1), 199-201.
- PACHECO R.S., FERREIRA M.S., MACHADO M.I., BRITO C.M.M., DA-CRUZ A.M. & COUTINHO S.G. (1998). Chagas disease and HIV co-infection: genotypic characterization of the *Trypanosoma cruzi* strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **93**, 165-169.
- PEREIRA E.S., SANTOS, L.M.T., ARAÚJO M.S.S., BRENER Z. (1998) Recrudescence induced by Cyclophosphamide of chronic *Trypanosoma cruzi*

- infection in mice is influenced by the parasite strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**, 217-224.
- PETRAY P.B., ROTTENBERG M.E., BERLOT G., CORRAL R.S., DIAZ A., ORN A., GRINSTEIN S. (1993). Effect of anti-gama-interferon and anti-interleukin-4 administration on the resistance of mice against infection with reticulotropic and myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Lett.* **35**,77.
- PITTELLA J.E.H. (1985). Brain involvement in the chronic cardiac form of Chagas disease. *J. Trop. Med. Hyg.* **88**, 313-317.
- PLATA F., WIETZERBIN J. PONS F.G. FALCOFF E. EISEN H. (1984). Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Eur. J.Immunol.* **14**, 930-935.
- PRATA A. (1999). Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas Disease 90 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94(suppl. I)**, 81-88.
- PRATA A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* **1**, 92-100.
- RAMOS-JÚNIOR A.N. (2004). Inclusão da reativação da doença de Chagas como uma condição definidora de AIDS para fins de vigilância epidemiológica no Brasil. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **37(2)**, 192-193.
- RASSI A, AMATO NETO V., SIQUERIRA A.F., FERRIOLLI FILHO F., AMATO V.S., RASSI JUNIOR A. (1999). Protective effect of benznidazole against parasite reactivation in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with corticoids for associated diseases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **32(5)**, 475-82.
- RASSI A. JR., RASSI A., LITTLE W.C. (2000).Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol.* **23(12)**, 883-889.
- REED S.G. (1988). *In vivo* administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immunosuppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* **140**, 4342-4347.
- REED S.G., BROWNELL C.E. RUSSO D.M. SILVA J.S. GRABSTEIN K.H. ORRISSEY P.J. (1994). IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi*. *Infection.* **153**, 3135-3140.
- REED S.G., SCOTT P. (1993). T-cell and Cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* **5(4)**, 524-31.
- REIS D.D., JONES E.M., TOSTES S.JR., LOPES E.R., GAZZINELLI G., COLLEY D.G.; MCCURLEY T.L. (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in

- chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- alfa + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *AM. J. Trop. Méd. Hyg.* **48**, 637-642.
- RELATÓRIO TÉCNICO, MINISTÉRIO da SAÚDE (2006). Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Trypanosoma cruzi* – vírus da imunodeficiência humana. *Rev.Soc.Bras.Med. Trop.* **39(4)**, 392-415.
- REVOLLO S., OURY B., LAURENT J.P., BARNABE C., QUESNEY V., CARRIERE V., NOEL S. & TIBAYRENC M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp. Parasitol.* **89**, 30-39.
- REZENDE R.E.F., LESCANO M.A., RAMALHO L.N.Z., FIGUEIREDO J.F. C., DANTAS R.O., MENEGHELLI U.G., MODENA J.L.P. (2006). Reactivation of Chagas' disease in a patient with non-Hodkin's lymphoma: gastric, oesophageal and laryngeal involvement. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**, 74-78.
- ROCHA A., FERREIRA M.S., NISHIOKA A.S., LOPES E.R. (2000). Doença de Chagas – Interação com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). In: *Trypanosoma cruzi* doença de Chagas. BRENER Z., ANDRADE Z.A. & BARRAL-NETO M. Guanabara Koogan. 406-415.
- ROCHA A., MENEZES A.C.O., SILVA A.M., FERREIRA M.S., NISHIOKA A.S., BURGARELLI M.K.N., ALMEIDA E., TURCATO JR G., METZE K. & LOPES E.R. (1994). Pathology of patients with Chagas disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 261-268.
- ROCHA M.O.C, RIBEIRO A.L., TEIXEIRA M.M. (2003). Clinical Management of chronic Chagas cardiomyopathy. In: Cap. Chagas heart Disease. *Front. Biosc.* **8**, 44-54.
- RODRIGUES, D.B.R, CRREIA D., MARRA M.D., GIRALDO L.E.R., LAGES-SILVA E., SILVA-VERGARA, M.L., BARATA C.,H., JUNIOR V.R. (2005). Cytokine serum levels in patients infected by human immunodeficiency vírus with and without *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38(6)**, 483-487.
- ROMAGNANI S. (1991).Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **21(2)**, 152-158.
- ROMANHA A.J., SILVA PEREIRA A.A., CHIARI E. & ALVAREZ-VALIN F. (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp.Biochem.Physiol.* **62**, 139-142.
- SANTOS F.R., PENA S.D. & EPPLIN J.T. (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.* **90**, 655-656.

- SARTORI A.M., CAIAFFA-FILHO H.H., BEZERRA R.C., GUILHERME C.S., LOPES M.H. & SHIKANAI-YASUDA M.A. (2002). Exacerbation of HIV viral load simultaneous with reactivation of chronic Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**, 521-523.
- SILVA J.C., MORRISSEY, K.H., GRABSTEIN K.H., MOHLER, K.M., ANDERSON, D., REED, S.G. (1992). Interleukin-10 and Interferon-gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* **175**,169-174.
- SILVA J.S., ALIBERTI J.C., MARTINS G.A., SOUZA, M.A.; SOUTO, J.T.; PADUA, M.A. (1998). The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz. J. Med. Bio. Res.* **31**,111.
- SILVA J.S., MACHADO F.S., MARTINS G.A. (2003). The role nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **8**, 314-25.
- SILVA J.S. & ROSSI M.A. (1990). Intensification of acute *Trypanosoma cruzi* myocarditis in Balb/c mice pretreated with low doses of cyclophosphamide or gamma irradiation. *J. Exp. Path.* **71**, 33-39.
- SNEDECOR G.W. & COCHRAN W.G. (1989). Statistical Methods. 8^a-ed., Iowa State, University Press. Ames, p. 503.
- SOUTO R.P., FERNANDES O., MACEDO A.M., CAMPBELL D.A. & ZINGALES B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**, 141-152.
- SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E.L.; RUIZ, A.M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B.M.; YAMPOTIS, C. (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59** (4), 526-529,
- STOLF N.A.G. (1994). Complicações após transplante cardíaco. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* **63**, 247-250.
- STOLF N.A.G., HIGUSHI L., BOCCHI E., BELLOTTI G., AULER J.O.C., UIP D., NETO A., PILLEGGI F. & JATENE A.D. (1987). Heart transplantation in patients with Chagas disease cardiomyopathy. *J. Heart. Transplant.* **6**, 307-312.
- TAFURI, W.L. (1999). Immunopathology of Chagas Disease – A Historical Overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**, Suuppl.1, 247-248.
- TARLETON R.L. (2001). Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* **31**: 550-554.

- TARLETON R.L., GRUSBY M.J., POSTAN M., GLIMCHER L.H. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int. Immunol.* **8**,13-22.
- TIBAYRENC M. & AYALA F. J. (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution.* **42**, 277-292.
- TIBAYRENC M. & BRENIÈRE S. F. (1988). *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **83**, 249-255.
- TIBAYRENC M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* **36**, 47-115.
- TIBAYRENC M., NEUBAUER K., BARNABE C., GUERRINI F., SKARECKY D. & AYALA F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1335-1339.
- TIBAYRENC M., WARD P., MOYA A. & AYALA F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 115-119.
- TOLEDO M.J., DE LANA M., CARNEIRO C.M., BAHIA M.T., MACHADO-COELHO G.L.L., VELOSO V.M., BARNABÉ C., TIBAYRENC M. & TAFURI W.L.(2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp. Parasitol.* **100**, 161-172.
- TOLEDO M.J., BAHIA M.T., CARNEIRO C.M., MARTINS-FILHO O.A., TIBAYRENC M., BARNABE C., TAFURI W.L. & DE LANA M.(2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **47**, 223-30.
- TOLEDO M.J., BAHIA M.T, VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., MACHADO-COELHO G.L.L., ALVES C.F., MARTINS H.R., CRUZ R.E.,TAFURI W.L & DE LANA M. (2004a). Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 1045-1053.
- TOLEDO M.J., TAFURI W.L., BAHIA M.T., TIBAYRENC M. & DE LANA M. (2004b). Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **4**, 11-22.

- TORRICO F., HEREMANS H., RIVERA, M.T., VAN MARCK E.,BILLIAU A., CARLIER Y. (1991). Endogenous IFN-gama is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* **146**, 3626-3632.
- VAGO A.R., ANDRADE L.O., LEITE A.A., D'AVILA R.D., MACEDO A.M, ADAD S.J., TOSTES S.J.R., MOREIRA M.C.,FILHO G.B. & PENA S.D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease : differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* **156**, 1805-1809.
- VAGO A R., MACEDO AM, OLIVEIRA R.P., ANDRADE L.O, CHIARI E., GALVÃO, L.M.C., REIS D.D., PEREIRA M.E.S., SIMPSON AJG., TOSTES S., PENA S.D.J. (1996). Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.* **149**, 2153-2159.
- VILLARREAL D.; BARNABÉ, C.; SERENO D.; TIBAYRENC, M. (2004). Lack of correlation between in vitro susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Experimental Parasitology.* **108**, 24-31, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease. Second Report of the WHO Expert Committee. *WHO Technical. Report. Series.* 905, Geneva, 109p, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tropical Disease Research: progress 2003-2004 Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. Programme Report n.17, Geneva, 2005.
- ZINGALES B., SOUTO RP., MANGIA R.H., LISBOA CV., CAMPBELL D.A., COURA J.R., JANSEN A., FERNANDES O. (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.* **28(1)**,105-12.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)