Helen Rodrigues Martins

TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM MISTURAS DE POPULAÇÕES DO *Trypanosoma cruzi* PERTENCENTES AOS GENÓTIPOS PRINCIPAIS

Universidade Federal de Ouro Preto
Ouro Preto, MG - 2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Helen Rodrigues Martins

Tratamento com Benzonidazol em Camundongos Infectados com Misturas de Populações do *Trypanosoma cruzi* Pertencentes aos Genótipos Principais

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

Orientadora: Profa. Marta de Lana
Co-orientadora: Profa. Andréa Mara Macedo

Universidade Federal de Ouro Preto
Ouro Preto, MG - 2008

Helen Rodrigues Martins

Os experimentos desta Tese foram realizados no Laboratório de Doença de Chagas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Instituto deCiências Exatas e Biológicas (ICEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e no Laboratório de Genética e Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esse trabalho contou ainda com a colaboração do Laboratório de Biomarcadores, de Diagnóstico e de Monitoração, do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-MG) na realização da técnica de pesquisas de anticorpos antitirpomastigotas vivos pela citometria de fluxo.

Artigo Publicado

Martins HR, Silva RM, Valadares HM, Toledo MJO, Veloso, VM, Vitelli-Avela DM, Carneiro, CM, Machado-Coelho, GLL; Bahia, MT, Martins-Filho, AO, Macedo AM, Lana M (2007). Impact of dual infections on chemotherapeutic efficacy in BALB/c mice infected with major genotypes of *Trypanosoma cruz*i. **Antimicrob Agents Chemother. 51,** 3282-3289.

Artigo Aceito Para Publicação

Martins HR; Figueiredo LM; Valemiel-Silva JC; Carneiro CM,; Machado-Coelho GLL, Bahia MT; Martins-Filho OA, Macedo AM; Lana M. Persistence of positive tissue-PCR in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological test in dual-infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. **Artigo aceito para publicação na revista J. Antimicrob. Chemother. em fevereiro de 2008 (DNK092).**

Apoio Financeiro: UFOP, UFMG, CNPq, FAPEMIG.

Aos meus pais,
por sua dedicação e amor
e por sempre estimularem e
apoiarem meus sonhos sem restrições.

Ao Marcelo Cruz,
por seu apoio que nunca faltou
por sua paciência e compreensão.

HRM

À Profa. Marta de Lana, quero expressar meu carinho e especial agradecimento por todos esses longos anos de agradável convivência e registrar a grande importância que você desempenhou em minha formação acadêmica e pessoal. Professores como você são raridades... Eu sempre me impressiono com sua sagacidade na interpretação dos dados e com sua sutileza em instigar seus alunos à curiosidade e à paixão pela Ciência. Com você aprendi que tudo que se faz com entusiasmo, integridade e dedicação, sempre atingirá à meta desejada. Admiro seu exemplo de humanidade e ética; e, sobretudo lhe agradeço por ter acreditado em meu potencial e me permitir a liberdade de pensar e de fazer...

À Profa. Ándrea Mara Macedo, agradeço a Co-orientação desse trabalho e por ter me recebido tão gentil e prontamente em seu laboratório. Sua clareza de pensamento foi imprescindível para o direcionamento da parte molecular desse trabalho e enriquecedoras para meu desenvolvimento científico.

À Profa. Cláudia Martins Carneiro, não tenho palavras para agradecer tudo que fez por mim para tornar esse trabalho factível e, pela agradável convivência durante todos esses anos. De você levarei sempre a imagem do equilíbrio e da generosidade: sempre disponível entusiasmada e bem humorada, seja qual for a adversidade. Agradeço por sua participação atenciosa e interessada na análise dos dados desse trabalho e, pela revisão criteriosa das publicações referentes ao mesmo.

À Dra. Vanja Maria Veloso, por tudo... a vida nos trás bênçãos e você foi uma delas. Se não bastasse toda a prestatividade em me ensinar cada técnica quando cheguei ao Laboratório de Doença de Chagas com atenção e carinho e, a persistência e o otimismo na montagem de cada um dos experimentos quando tudo parecia impossível; descobri em você uma pessoa admirável e amiga, que levarei comigo pelo resto da vida. Obrigada por todos os fins de semana e feriados de dedicação irrestrita e pela cuidadosa revisão desta tese.

Ao Prof. Max Jean Ornelas Toledo, por ter me iniciado na vida científica e ter despertado em mim o anseio pela pesquisa; por seu exemplo de seriedade e comprometimento no densenvolvimento de cada experiemento.

À Profa. Maria Terezinha Bahia pelas idéias e sugestões valiosas que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho em momentos que as alternativas não eram evidentes.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela colaboração na realização da técnica para a pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos e pelas frutíferas e enriquecedoras reuniões para a elaboração dos artigos desta tese.

Ao Dr. Helder Magno Valadares, por sua imensa colaboração na realização da análise de microssatélites. Obrigada pelo carinho e amizade com que me recebeu e pela paciência ao me introduzir nos conhecimentos desta metodologia.

Aos Prof.(s) Angélica Alves Lima e Elíseo Alberto Evangelista pela ajuda na padronização da análise de isoenzimas, pelo carinho, pelas boas conversas e pela convivência agradável.

Ao Prof. George Luís Lins Machado Coelho, por seu auxílio na realização das análises estatísticas.

Aos Prof.(s) Hélio Ideo Baba, Renata Guerra de Sá., Luís Carlos Crocco, Milton Guerra e Ieso Miranda, por terem me aberto as portas de seus laboratórios e estarem sempre à disposição em auxiliar em vários aspectos para a concretização desse trabalho.

Ao Prof. Alexandre Barbosa Reis pelos estímulos, pela amizade e pelos diálogos preciosos.

Aos Prof.(s) André Talvani, Evandro M M. Machado e Wanderson Geraldo de Lima dos Laboratórios de Doença de Chagas e Imunopatologia, que embora breve, me propiciaram uma convivência muito afável.

Aos Prof.(s) do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do NUPEB pelos ensinamentos transmitidos durante o curso de doutorado.

Ao Dr. Michel Tibayrenc por sua gentileza e presteza em nos fonecer as amostras de *T. cruzi* empregadas nesse estudo e por ter aceito a orientação de meu pós-doutoramento no Institute de Recherche pour Developement, Montepllier, França.

A todos os alunos de Iniciação Científica que trabalharam comigo na execução desse trabalho e de outros projetos. Cada um, Lorena, Fábio, Ricardo, Reinaldo, Bruna, Marina, Lílian, Jaqueline, Rodrigo, Daniela, Arnaldo, Maykon, Vitor e Lucas, foi peça fundamental para a concretização desta tese que seria impossível sem a plena participação de vocês. Muito obrigada!

Aos colegas dos Laboratórios de Doença de Chagas e de Imunopatologia, pela convivência aprazível durante esses dez anos, pelo companheirismo, pelas discussões e pelo auxílio na realização de experimentos. São tantos, mas com certeza, levo comigo boas lembranças dessa fase da minha vida, da qual cada um de vocês fez parte.

Aos bioteristas Cláudio, José Henrique, Marcos, Rosário, Selma e, especialmente, a Cristina pelo cuidado com os animais e pelo desvelo em atender às demandas do Laboratório de Doença de Chagas.

Às técnicas Ana Salomé e Maria Chaves pelo suporte técnico na realização dos experimentos e por estarem sempre prontas a ajudar.

Aos colegas do NUPEB, pela agradável convivência e prestatividade em fornecer ajuda sempre que necessário. Agradeço em especial a Daniela Santos, ao Roenick Olmo, ao Matheus Gomes e ao Rodolfo Guinchetti, que jamais mediram esforços em ajudar nos experimentos ou em esclarecer minhas dúvidas.

Aos colegas dos Laboratórios de Bioquímica e Genética da UFMG por terem me recebido tão pronta e amigavelmente. Agradeço especialmente a Neuza por ter nos auxiliado com a compra de materiais e a Kátia pelo seu auxílio na análise de microssatélites.

À Cida, por sua solicitude em nos ouvir e compreender nossas necessidades.

À Viviane Michelline Veloso pela cuidadosa revisão do português.

À minha família, por seu amor, por me apoiar, por compreender minhas escolhas e as conseqüentes ausências delas advindas.

Ao Marcelo, pelo companheirismo, por me amparar nas adversidades e permanecer firme, sem jamais titubear, seja qual for o caminho...

A Deus , fiel e benevolente,
que maravilhas tem operado em minha vida

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS NA AMÉRICA LATINA 2
1.2 TRATAMENTO ESPECÍFICO DA DOENÇA DE CHAGAS 4
1.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS 6
1.4 QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL COM OS NITRODERIVADOS 8
1.5 O ***Trypanosoma cruzi***: DIVERSIDADE GENÉTICA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS 12
1.5.1 Organização do Genoma 12
*1.5.2 Estrutura Populacional do **T. cruzi** 14*
*1.5.3 Correlação entre a Genética do **T. cruzi** e as Propriedades Biológicas 17*
*1.5.4 Os Genótipos Principais do **T. cruzi** e suas Propriedades Biológicas 18*
1.6 INFECÇÕES MISTAS 20

2. OBJETIVOS 23

2.1 OBJETIVO GERAL 24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24

3. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS 25

3.1 CLONES DO ***Trypanosoma cruzi*** 26
3.2 ANIMAIS 26
3.3 INFECÇÃO DOS ANIMAIS 27
3.4 TRATAMENTO 28
3.4.1 Fármaco e Esquema de Tratamento 28
3.5 CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO 29
3.5.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF) 29
3.5.2 Hemocultura (Hc) 29
3.6 ANÁLISE DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL EM INFECÇÕES MISTAS E MONOINFECÇÕES POR CLONES DO ***Trypanosoma. cruzi*** CONSIDERANDO DIFERENTES PARÂMETROS BIOLÓGICOS 29
3.6.1 Parasitemia 30
3.6.2 Mortalidade 30
3.6.3 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol 31
3.6.3.1 Testes Empregados no Controle de Cura 31
3.6.3.1.1 Avaliações Parasitológicas 31
3.6.3.1.1.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF) 31
3.6.3.1.1.2 Hemocultura (Hc) 31
3.6.3.1.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 31
3.6.3.1.1.3.1 Extração de DNA de Sangue 31
3.6.3.1.1.3.2 Amplificação específica do KDNA do ***T. cruzi*** 32
3.6.3.1.2 Avaliações Sorológicas 33
3.6.3.1.2.1 Sorologia Convencional pela ELISA (ELISA) 33
3.6.3.1.2.2 Sorologia Não Convencional para Pesquisa de Anticorpos Antitripomastigotas Vivo pela Citometria de Fluxo (AATV) 34
3.6.3.2 Critério de Cura 34
3.6.3.3 Comparação dos Perfis de Susceptibilidade ao BZ 35
3.6.4 Análise da Freqüência de Positividade do kDNA nos Tecidos 36
3.6.4.1 Necropsia dos Animais 36
3.6.4.2 Extração de DNA em Tecidos e PCR 37

3.7 IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DO ***Trypanosoma cruzi*** PRESENTES NAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS POR COMBINAÇÕES DE CLONES PERTENCENTES AOS GENÓTIPOS PRINCIPAIS 37
*3.7.1 Identificação dos Isolados do **T. cruzi** Recuperados pela Hemocultura 37*

3.7.1.1 Análise Isoenzimática 37
3.7.1.1.1 Obtenção da Massa Úmida do ***T. cruzi*** e do Extrato Enzimático 38
3.7.1.1.2 Eletroforese de Isoenzimas e Revelação 38
3.7.1.2 Análise de Microssatélites 40
3.7.1.2.1 Extração de DNA Total do Sedimento Proveniente da Massa Úmida do ***T. cruzi*** 40
3.7.1.2.2 PCR de Microssatélites 40
3.7.1.2.3 Determinação do Tamanho dos Alelos de Microssatélites 42
3.7.1.2.4 Padronização da Análise de Microssatélites para os Clones do ***T. cruzi*** Pertencentes aos Genótipos Principais 43
3.7.1.2.4.1 Avaliação da Sensibilidade dos Locos de Microssatélites para Detecção dos Clones do ***T. cruzi*** nas Infecções Mistas 44
3.7.1.2.4.2 Análises Adicionais do Clone Cuica cl1 44
3.7.1.2.4.2.1 Clonagem de Células do Clone Cuica cl1 do ***T. cruzi*** 45
3.7.1.2.4.2.1.1 Obtenção de Células do Clone Cuica cl1 para Separação em "*FASC Cell Sorter*" 45
3.7.1.2.4.2.1.2 Separação das Células Únicas do Clone Cuica cl1 do ***T. cruzi*** em "*FACS Vantage Cell Sorter*" 45
3.7.1.2.4.2.2 PCR de Microssatélites em Células Únicas do Clone Cuica cl1 do ***T. cruzi*** 46
3.7.1.2.4.2.3 Manuseio Laboratorial do Clone Cuica 46
*3.7.2 Identificação pelo Perfil de Microssatélites dos Isolados do **T. cruzi** em DNA Obtido Diretamente do Sangue ou Tecidos 47*
3.7.3 PCR "full nested" para Detecção dos Alelos de Microssatélites 47

4. RESULTADOS 50

4.1 PARASITEMIA 51
4.2 MORTALIDADE 55
4.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AO BENZONIDAZOL EM INFECÇÕES MISTAS POR CLONES DO ***Trypanosoms cruzi*** PERTENCENTES AOS GENÓTIPOS PRINCIPAIS 56
4.3.1 Estabelecimento do Critério de Cura para Avaliação da Eficácia Terapêutica do Benzonidazol 56
*4.3.2 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo as Linhagens do **T. cruzi** 60*
*4.3.3 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo os Genótipos Principais do **T. cruzi** 62*
*4.3.4 Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo as Monoinfecções e Infecções Mistas com Diferentes clones do **T. cruzi** 64*
4.4 ANÁLISE DA FREQÜÊNCIA DE POSITIVIDADE DO KDNA DO ***T. cruzi*** NOS TECIDOS 68
4.4.1 Positividade Global da PCR em Diferentes Tecidos de Animais Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT) 68
4.4.2 Positividade Global da PCR no Conjunto de Tecidos de Animais Infectados e Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT) Agrupados Segundo a Combinação Genotípica 71
4.4.3 Positividade da PCR em Tecidos de Animais Infectados Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT) Considerando Cada Tecido e Combinação Genotípica Individualmente 74
4.4.4 PCR em Tecidos em Animais Tratados Curados (TC) 76
4.5 IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DO ***Trypanosoma cruzi*** PRESENTES NAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS POR COMBINAÇÕES DE CLONES PERTENCENTES AOS GENÓTIPOS PRINCIPAIS 79
*4.5.1 Análise Molecular dos Padrões de Referência dos Oito Clones do **T. cruzi** Pertencentes aos Genótipos Principais em Estudo 79*
4.5.1.1 Padronização da Análise de Isoenzimas para os Oito Clones do ***T. cruzi*** em Estudo 79
4.5.1.2 Padronização da Análise de Microssatélites para os Oito Clones do ***T. cruzi*** em Estudo 81
*4.5.2 Análises Adicionais do Clone Cuica cl1 do **T. cruzi** 86*

4.5.2.1 Manuseio Laboratorial do "clone" Cuica do ***T. cruzi*** 88
4.5.3 Identificação dos Isolados do ***Trypanosoma cruzi*** *Obtidos por Hemocultura dos Animais Infectados com Misturas dos Genótipos Principais pelas Análises de Isoenzimas e Microssatélites 90*
4.5.3.1 Mudanças do Perfil Genético em Amostras do ***T. cruzi*** Isoladas de Animais Infectados com Misturas dos Genótipos Principais por Hemocultura e Cultivados em Meio LIT 95
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DO ***Trypanosoma cruzi*** POR MICROSSATÉLITES EM DNA OBTIDOS DIRETAMENTE DO SANGUE E DE TECIDOS DE ANIMAIS INFECTADOS COM MISTURAS DOS GENÓTIPOS PRINCIPAIS. 98
5. DISCUSSÃO 99
6. CONCLUSÕES 117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 121
8. ANEXOS 149

Figura 1. Dendograma mostrando a divergência filogenética entre os 8 clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais em estudo.. 19

Figura 2. Perfis representativos das curvas de parasitemia obtidos em monoinfecções e infecções mistas por estoques de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais. 54

Figura 3 Perfil sorológico de camundongos BALB/c infectados com diferentes clones e combinações dos genótipos principais do *Trypanosoma cruzi*,. 548

Figura 4. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol dos clones do *T. cruzi* e suas diferentes combinações segundo as linhagens do *T. cruzi* (*T. cruzi* I, *T. cruzi* e *T. cruzi* II).. 62

Figura 5. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol dos clones do *T. cruzi* e suas diferentes combinações segundo os genótipos principais do *T. cruzi* (20, 1, 39 e 32).. 63

Figura 6. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol de monoinfecções e infecções mistas com estoques do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos diferentes genótipos. 66

Figura 7. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48), coletados na FA e FC. 69

Figura 8. Comparação entre a positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48), coletados na FA e FC. 70

Figura 9. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados com esse parasito e tratados com BZ (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48) agrupados por combinação genotípica e coletados na FA e FC. 72

Figura 10. Comparação entre a positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48) agrupados segundo a combinação genotípica e coletados na FA e FC..... 73

Figura 11. Comparação entre a positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48), coletados na FA e FC..... 75

Figura 12. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em tecidos de camundongos BALB/infectados com diferentes combinaçõs genotípicas deste parasito (20+19, 20+39, 20+32, 19+39, 19+32 e 39+32) classificados como infectados não tratados, tratados não curados e tratados curados..... 77

Figura 13. Positividade da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em tecidos de camundongos BALB/c infectados com diferentes combinações genotípicas deste

parasito (20+39, 19+39, 19+32 e 39+32), tratados durante a fase aguda da infecção e considerados curados pelo critério proposto por Kretlli & Brener (1982). 78

Figura 14. Perfis eletroforéticos das enzimas GPI, G6PD, ICD e PGM dos clones do *Trypanosoma cruzi*, pertencentes aos genótipos principais 19, 20, 39 e 32..... 80

Figura 15. Rede de Wagner sem raiz construída pelo método de máxima parcimônia, a partir dos dados obtidos das análises para sete locos de microssatélites (TcTAC15, TcTAT20, TcAAT8, TcAAAT6, TcATT14, TcGAG10 e TcCAA10) para os clones do *T. cruzi* utilizados neste trabalho..... 83

Figura 16. Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise dos alelos de microssatélites amplificados para o loco TcAAAT6 no seqüenciador automático de DNA A.L.F. feita em misturas teóricas de DNA de *Trypanosoma cruzi* (X+Y). 85

Figura 17. Eletrofluograma obtido a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos alelos do loco TAC15 de microssatélites em células únicas do clone Cuica cl1 do *Trypanosoma cruzi*.. 86

Figura 18. Perfis eletroforéticos das enzimas GPI, G6PD, ICD e PGM observados no estoque Cuica cl1 de *Trypanosoma cruzi* em cultura acelular e em camundongos *Swiss* (5ª e 15ª passagens)..... 88

Figura 19. Eletrofluograma obtido a partir da análise no sequenciador automático de DNA A.L.F. dos alelos de microssatélites do loco SCLE10 do clone Cuica cl1 de *Trypanosoma cruzi*, após sua manutenção em cultura acelular e em camundongos *Swiss* (5ª e 15ª passagens)..... 89

Figura 20. Perfis eletroforéticos da enzima GPI representativos dos resultados obtidos para isolados de animais com diferentes combinações genotípicas do *Trypanosoma cruzi*.. .. 90

Figura 21. Eletrofluograma obtido a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F dos alelos de microssatéites amplificados para o loco SCLE10 de isolados de animais infectados com a mistura P209 cl1+Gamba cl1 de *Trypanosoma cruzi*..... 93

Figura 22. Eletrofluograma obtidos a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F dos alelos de microssatéites amplificados para o loco SCLE10 de isolados de animais infectados com a mistura OPS21cl11+Bug2148 cl1 de *Trypanosoma cruzi*..... 94

Figura 23. Diagrama representativo dos perfis enzimáticos detectados na caracterização enzimática de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais e de isolados provenientes de animais infectados com misturas desses genótipos. 96

Tabela I. Alvos e fármacos promissores para o tratamento da doença de Chagas 8

Tabela II. Características dos clones do *Trypanosoma cruzi* empregados nesse estudo.....27

Tabela III. Misturas do clones *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais utilizados na infecção de camundongos BALB/c combinados segundo o padrão de virulência e susceptibilidade ao Benzonidazol.....28

Tabela IV. Condições eletroforéticas e de revelação usadas para os sistemas enzimáticos estudados.....39

Tabela V. Seqüência de iniciadores usados para amplificar os locos de microssatélites do *T.cruzi*.....42

Tabela VI. Misturas teóricas de *clone*s de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a genótipos distintos utilizadas na padronização da análise de microssatélites.....44

Tabela VII. Comparação entre o percentual de positividade dos testes sorológicos e parasitológicos em amostras biológicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com diferentes combinações genotípicas do *Trypanosoma cruzi*.....59

Tabela VIII. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol de infecções mistas com clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais que apresentaram mudança em relação ao resultado esperado considerando as monoinfecções com cada clone presente na mistura.....67

Tabela IX. Tamanho dos alelos em pares de base identificados nos clones do *Trypanosoma cruzi* nos oito locos de microssatélites analisados. 82

Tabela X. Tamanho dos alelos de microssatélites em pares de base identificados para as populações C1 e C2 presentes no clone Cuica cl1 do *Trypanosoma cruzi*.....87

Tabela XI. Identificação de isolados do *Trypanosoma cruzi* provenientes de camundongos BALB/c infectados com diferentes misturas dos genótipos principais.....92

Tabela XII. Perfis de microssatélites inesperados detectados em isolados provenientes de camundongos BALB/c com infecções mistas por clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais.....96

AATV	Pesquisa de Anticorpos Anti-tripomastigotas Vivos pela citometria de fluxo
ATP	Adenosina Trifosfato
BZ	Benzonidazol
C	Centígrados
CEBIO	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
d.a.i.	Dias Após a Infecção
dATP	2'-desoxinucleotídeo de Adenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxinucleotídeo de Citocina-5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxinucleotídeo de Guanina-5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxinucleotídeo de Timina-5'-trifosfato
dNTP's	2'-desoxinucleotídeos-5'-trifosfato
DIS	Dissociado
DNA	Ácido Desoxirribunucléico
DO	Densidade Óptica
DPMP	Dia do Pico Máximo de Parasitemia
DTU	Discrete Typing Unity
EDTA	Ácido Etilenodietildinitritoteracético
ELISA	*Enzyme Linked-Immuno-sorbent Assay*
ESF	Exame de Sangue a Fresco
FA	Fase Aguda
FC	Fase Crônica
µg	Microgramas (10^{-6} gramas)
ng	Nanogramas (10^{-9} gramas)
fg	Fentogramas (10^{-12} gramas)
G6PD	Glicose-6-fosfato Desidrogenase
Guanidina-HCl	Cloridrato de Guanidina
GPI	Glicose Fosfato Isomerase
h	Horas
Hc	Hemocultura
HGPRT	Hipoxantina-guanina Fosforibosil Transferase
ICD	Isocitrato Desidrogenase
IC	Índice de Cura
ICE	Índice de Cura Esperado
ICO	Índice de Cura Observado

IgG	Imunglobulina G total
INT	Infectado Não tratado
IP	Intraperitoneal
IT	Infectado Tratado
kDNA	DNA do Cinetoplasto
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LIT	*Liver Infusion Triptose* (Infusão de fígado e triptose)
M	Molar
mM	Milimolar (10^{-3} Molar)
mL	Mililitros (10^{-3} Litros)
µL	Microlitro (10^{-6} Litros)
MB	Mega base (10^{6} pares de bases)
mim	Minutos
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MOR	Taxa de Mortalidade
mRNA	Ácido Ribonucléico Messageiro
MTT	Brometo de 3-{4,5-Dimetiltiazol-2-1}-2,5Difeniltetrazolium
NADP	Nicotinamida Adenina Difosfato
NF	Nifurtimox
nm	Nanômetro (10^{-9}m)
NI	Não Infectado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
P	Nível de probabilidade de significância
PAR	Níveis de Parasitemia
Pb	Pares de Bases
PBS	*Phosphate Buffer Solution* (Solução Tampão fosfato)
PBS- 10% SFB	Solução Tampão fosfato contendo 10% de Soro Fetal Bovino
PBS-T	Solução Tampão fosfato contendo 0,05% de Tween-20
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
PGM	Fosfoglicomutase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHYLIP	Phylogeny Inference Package
PMP	Pico Máximo de Parasitemia
PMS	Sulfato de Fenazina.

PP	Período Patente
PPFP	Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos
PS	Parcialmente Susceptível
R	Resistente
RAPD	Randomly Amplified Polimorphic DNA
rpm	Rotações por Minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
S	Susceptível
SFB	Soro Fetal Bovino
SL	Splice Líder
SNP	Polimorfismo Único de Nucleotídeos
TC	Tratados Curados
TNC	Tratados Não Curados
TS	Tripomastigotas Sangüíneos
Tris-HCl	Cloridrato de hidroximetilaminometano
U	Unidades
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UPGMA	*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*
p/v	Peso por volume
v/v	Volume por volume
WHO	World Heath Organization
Z	Zimodema

O objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto de infecções mistas por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos quatro genótipos principais na eficácia terapêutica do Benzonidazol (BZ) em camundongos BALB/c. Para esta proposta, foram empregados dois clones do *T. cruzi* de cada genótipo com diferentes níveis de virulência e de susceptibilidade ao BZ, que foram combinados aos pares totalizando 24 misturas distintas avaliadas comparativamente às respectivas monoinfecções. O tratamento com BZ reduziu os níveis de parasitemia além de outros parâmetros relacionados na maioria das infecções mistas, exceto nas da combinação dos genótipos 39+32. As taxas de mortalidade dos animais tratados (IT) e seus controles (INT) não diferiram significativamente entre as monoinfecções e as infecções mistas. A cura após tratamento foi definida empregando o critério de cura clássico, proposto por Krettli & Brener (1982) por meio de métodos parasitológicos (exame de sangue a fresco-ESF, hemocultura-Hc e PCR no sangue) e sorológicos (ELISA e pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos-AATV) e, permitiu classificar os animais em tratados não curados (TNC=72,2%), tratados curados (TC=19,1) e dissociados (DIS=8,7%). Em geral, o ESF apresentou baixa positividade para a detecção da falha terapêutica (18,1%). A Hc apresentou sensibilidade satisfatória para a maioria das infecções, exceto nos animais infectados com o genótipo 39 e com a combinação 39+32; enquanto a PCR foi o método parasitológico mais sensível, a despeito da diversidade genética do *T. cruzi*. Os dados demonstraram que a ELISA não deve ser utilizada em amostras coletadas antes de três meses após tratamento, uma vez que pode apresentar resultados falsos negativos. A AATV foi mais eficiente na categorização dos animais em relação à resposta terapêutica e na definição precoce de cura. Os dados do presente estudo elegem a AATV e a PCR em sangue como as técnicas mais adequadas para a definição precoce de cura após tratamento da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* no modelo murino. Um importante achado deste estudo foi a observação de resultados positivos da PCR em tecidos de animais considerados curados pelo critério clássico, sugerindo infecção residual. Uma importante questão levantada por esses resultados é se a cura parasitológica de fato existe. A avaliação dos perfis de susceptibilidade ao BZ das infecções mistas foi realizada pela comparação entre os índices de cura observado e o esperado e, revelou mudança em direção ao padrão de menor susceptibilidade ao BZ nas combinações 19+39 e 19+32. Entretanto, quando os resultados foram analisados em nível dos clones do *T. cruzi*, foram observadas mudanças em nove das 24 misturas tendo sido detectados tanto aumento como diminuição na susceptibilidade ao fármaco. A caracterização molecular da amostra Cuica cl1, até então considerada um clone, demonstrou ser constituída de fato por duas populações geneticamente distintas cuja dinâmica populacional pode mudar dependendo da manutenção laboratorial. Entretanto, essas duas populações não apresentaram diferenças no perfil de susceptibilidade ao BZ. Em geral, a PCR de microssatélites apresentou boa correlação com a análise de isoenzimas na identificação dos clones presentes nas amostras isoladas de animais TNC e INT e confirmou a relação filogenética previamente determinada entre os clones por meio das análises de isoenzimas e RAPD. Apesar da análise de microssatélites apresentar baixa eficiência na identificação dos clones diretamente no sangue e nos tecidos de animais INT e TNC, os resultados obtidos dessas amostras biológicas foram similares aos obtidos para clones caracterizados após o isolamento pela Hc. Foram detectadas misturas em 7,7% dos isolados provenientes de animais INT e TNC obtidos por Hc. Em algumas misturas, resultados interessantes foram detectados revelando a presença do clone mais susceptível nas monoinfecções. Considerando a estrutura clonal do *T. cruzi,* um resultado inesperado foi a identificação de 15,5% dos isolados apresentando subpopulações do parasito com alelos de microssatélites distintos comparados aos clones originais. Esses achados sugerem que em alguns casos o tratamento com Benzonidazol pode resultar em um desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro e levar ao estabelecimento de um curso da infecção distinto. Em conjunto, esses achados sugerem que infecções mistas podem apresentar um importante impacto na eficácia terapêutica. Estudos futuros são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas mudanças genéticas e no perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol observado nas infecções mistas e o real benefício do tratamento para o hospedeiro.

The aim of this work was to investigate the impact of mixed infections of Balb/c mice with isolates of four *T. cruzi* genotypes on the Benznidazole (BZ) therapeutic efficacy. For this purpose two *T. cruzi* clones from each major genotype, with distinct virulence and BZ-susceptibility, were combined into twenty-four mixed infections and comparatively studied with the respective single infections. BZ-treatment reduced significantly the parasitemia and other related parameters in most mixed infections, except for 39+32. The BZ-treatment of single and mixed infections did not promoted significant changes in mortality, although decrease was observed in five mixtures. The cure assessed by classical criterion (Krettli & Brener, 1982) were performed by parasitological (Fresh Blood examination-FBE, Haemoculture-Hc and Blood-PCR) and serological methods (ELISA and detection of anti-trypomastigotes antibodies by flow-cytometry-ALTA) and allowed to classify the treated animals as treated not cured (TNC=72,2%), treated cured or dissociated (TC= 19,1%, DIS=8,7%). In general, the FBE displayed lower sensibility to detect therapeutic failure (18.1%). The Hc presented satisfactory sensibility to detect infection and therapeutic failure (89,4% and 79,3%), except for the genotype 39 and the combinations 39+32, whereas Blood-PCR was the most sensitive method to detect both (95,3% and 96,9%), independently to the *T. cruzi* genetic diversity. Our data demonstrated that ELISA should not be used before three months after treatment due to the risk of negative false results. NCS-FC-ALTA was more efficient than ELISA to define the early BZ-therapeutic response. Our findings elect NCS-FC-ALTA and Blood-PCR as the most suitable methods to early detect therapeutic failure in murine *T. cruzi*. A major finding of this study was the observation of positive Tissue-PCR in animals considered cured by the classical criterion, may indicating residual infection. These results may raise the question whether in fact parasitological cure of *T. cruzi* infections exist. Another relevant issue of this study was the assessment of BZ-susceptibility of mixed infections by comparing the observed and expected results (theoretical resultant of BZ-susceptibility from single-infection combinations), demonstrating a shift toward a lower BZ-susceptibility pattern at major genotypes level for the genotype combinations 19+39 and 19+32. However, at *T. cruzi* clone level, our data demonstrated that indeed 9 out of the 24 mixed infection tested shifted their expected profile toward lower or higher BZ-susceptibility. The molecular characterization of Cuica cl1 sample, previously being considered a *T. cruzi* clone, showed to be in fact composed of two genetically distinct subpopulations that presented changes in population dynamics depending on laboratorial condition of maintenance. However, difference in BZ-susceptibility was not observed between those populations. Generally, analysis of microsatellite patterns of clones isolated from not treated (INT) or treated not cured animals (TNC) showed good correlation with isoenzyme profiles confirming the phylogenetic relationship among the clones of *T. cruzi* major genotypes previously analyzed by isoenzyme and RAPD (Tibayrenc *et al.,* 1993). Despite microsatellite analysis presented low efficiency in the identification of clones directly from blood and tissues samples from INT or TNC, the results obtained from these biological samples were very similar to those obtained for clones characterized after isolation by Hc. Mixtures were detected in 7.7% of the isolates obtained from INT and TNC animals by Hc. Interestingly, our data demonstrated that in some mixed infection the *T. cruzi* clone isolated after BZ treatment was indeed BZ-susceptible in single-infections. Considering the clonal structure of *T. cruzi* an unexpected result was the identification of 15,5% of isolates from TNC with parasite subpopulations distinct microsatellite alleles when compared to the original clones used in the inoculation. These findings suggest that in some cases BZ-treatment can result in unbalanced parasite-host relationship and establish a distinct course of the infection as well as unexpected BZ susceptibility. Taken together, the data presented in this study suggest that mixed infections may have important impact on BZ-therapy efficacy. Further studies are still needed to better understand the mechanisms underlying the changes in the parasite's genetic and drug susceptibility in mixed infections and the real benefits of the etiological treatment for the host.

1. *I*NTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Doença de Chagas na América Latina

A doença de Chagas é endêmica no Continente Americano, sendo encontrada praticamente em todos os países da América Latina. Essa moléstia foi descoberta e descrita pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas em seu trabalho clássico de 1909, intitulado "Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem" (Chagas, 1909). Entretanto, durante muitos anos, essa descoberta foi negligenciada, mesmo com as advertências desse pesquisador de que a endemia provavelmente representava um importante problema de saúde pública. Deste modo, até a metade do século XX, ocorreu uma ampla expansão da doença sem nenhuma intervenção dos órgãos governamentais, exceto por ações isoladas, o que contribuiu para a existência de um grande contingente de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (Dias, 2007).

Na década de 90, foram iniciados os grandes programas de Controle da Doença de Chagas objetivando a eliminação do vetor e o controle dos bancos de sangue. A Iniciativa dos Países do Cone Sul (1991) representou a primeira ação conjunta nesse sentido e, posteriormente, outras iniciativas semelhantes foram estabelecidas como o Pacto Andino, o Programa de Controle da América Central (1997) e, mais recentemente, a iniciativa densenvolvida por nove países da Bacia Amazônica (Revisado por Schofield *et al.*, 2006; Dias, 2007; Guhl, 2007; Ponce, 2007). Essas medidas promoveram a redução da incidência da doença de Chagas em aproximadamente 67% (Moncayo & Yanine, 2006).

Embora os indicadores epidemiológicos sejam positivos, é necessário considerar as diferenças regionais, uma vez que a distribuição do vetor e da doença de Chagas, bem como as práticas das medidas de controle não são homogêneas por toda a área endêmica (Dias & Schofield, 1999; Guhl 2007). Em países como o Peru, a Colômbia, o México e parte da Bolívia, por exemplo, não há programas de intervenção e vigilância em larga escala e, conseqüentemente, novos casos são esperados a cada ano (Dias *et al.*, 2002; Moncayo, 2003; Schofield *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas, vem ocorrendo uma crescente descentralização das ações de saúde em diferentes países da América Latina, o que tem contribuído para a descontinuidade da vigilância epidemiológica em várias regiões endêmicas (Dias *et al.*, 2002; Dias, 2007). Dados recentes comprovam que a interrupção da vigilância epidemiológica pode comprometer a sustentação do sucesso do Programa de Controle da transmissão do *T. cruzi*. Na Argentina e na Venezuela, casos agudos da doença foram detectados em comunidades rurais decorrentes

da reinfestação pelo vetor de zonas já borrifadas anteriormente, devido à interrupção das ações de vigilância (Gurtler, 2005; Anez *et al.*, 2004). No Nordeste do Brasil, o *Triatoma brasiliensis* infectado pelo *T. cruzi* tem sido encontrado no domicílio em regiões onde os programas de controle sofreram descontinuidade (Sarquis *et al.*, 2004). Esses relatos indicam o risco de reinfestação, por vetores silvestres, das zonas borrifadas com inseticidas (Schofield *et al.*, 2006; Diotaiuti *et al.*, 2000; Assis *et al.*, 2007); e também, de colonização de novas áreas, onde a ação antrópica possa propiciar a aproximação de espécies vetoras silvestres com o potencial de domiciliação (Coura *et al.*, 2002; Luitgards-Moura *et al.*, 2005; Forattini, 2006).

A transfusão sangüínea é a segunda via de transmissão do *T. cruzi* de maior prevalência e permanece como um sério problema de saúde pública em diferentes países das Américas, onde ainda hoje não há controle dos bancos de sangue. Na Bolívia, 50% dos bancos de sangue ainda realizam transfusões sangüíneas sem controle sorológico dos doadores, e no México, ainda não há programas de controle em larga escala (Schofield *et al.*, 2006; Dias, 2007). Com as migrações humanas a transmissão do *T. cruzi* pela transfusão sangüínea e por transplante de órgãos tornou-se também preocupante onde essa doença não é endêmica, principalmente nos EUA e em países da Europa (Kirchhof, 1993; Reesink, 2005; Kirchhoff *et al.*, 2006; Garraud *et al.*, 2007; Kirchhoff & Pearson 2007; Schmunis, 2007).

A via congênita é outra forma importante de transmissão do parasito, mesmo em países onde existem programas de controle vetorial e de bancos de sangue. O risco de transmissão vertical pode variar de 0,5 a 10% entre as diferentes regiões geográficas (Bittencourt, 2000).

Em várias regiões do Brasil, principalmente na Bacia Amazônica, a via oral também tem se apresentado como uma forma relevante de transmissão do *T. cruzi* associada à microepidemias de casos agudos (Dias, 2006a).

No contexto atual da doença de Chagas, estima-se que pelo menos 13 milhões de indivíduos estão infectados pelo *T. cruzi* na América Latina e que 200.000 novos casos devam ocorrer por ano (WHO, 2005). Essa é associada à ocorrência de 14.000 mortes por ano e consiste, ainda hoje, na sexta doença negligenciável mais importante do mundo (Hotez *et al.*, 2006). Apesar do grande número de indivíduos acometidos pelo *T. cruzi*, dos quais uma parcela significativa pode desenvolver quadros clínicos graves, a assistência médica e social aos infectados é precária na maioria das regiões endêmicas, consistindo assim em um grande desafio na elaboração de políticas públicas de saúde (Dias, 2006b).

A infecção causada pelo *T. cruzi* é caracterizada por uma fase aguda de curta duração sucedida pela fase crônica que permanece assintomática na maioria dos pacientes. Entretanto,

aproximadamente 30% dos indivíduos infectados pelo parasito desenvolvem uma doença silenciosa e irreversível com quadros clínicos severos (Dias, 1992), o que geralmente ocorre entre 10-20 anos após infecção. Essa realidade justifica o interesse em ampliar o conhecimento sobre a quimioterapia da doença de Chagas, uma vez que as possibilidades disponíveis para o tratamento humano fornecem resultados insatisfatórios e controversos.

1.2 Tratamento Específico da Doença de Chagas

Os fatores envolvidos na patogênese da doença de Chagas ainda não são completamente conhecidos e durante muitos anos o parasito foi relegado a segundo plano e a auto-imunidade foi considerada como o principal mecanismo responsável pelo desencadeamento das lesões cardíacas que acometem os indivíduos infectados (Cunha-Neto *et al.*, 1995). Até meados da década de 90, o tratamento específico era indicado basicamente para os casos agudos (The National Health Foundation of Brazil, 1996). Posteriormente, com as crescentes evidências de que a persistência do parasito representa um fator importante no desenvolvimento da doença (Higuchi *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; Tarleton, 2003; Nitz *et al.*, 2004) e que o tratamento pode atuar beneficamente no prognóstico e evolução clínica mesmo nos casos não curados, (Andrade *et al.*, 1991a; Viotti *et al.*, 1994; Segura *et al.*, 1994; Fragata-filho *et al.*, 1995; Suasnábar *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2005; Viotti *et al.*, 2006), esse passou a ser indicado também na fase crônica da infecção. Deste modo, o grupo de especialistas em quimioterapia da doença de Chagas passou a recomendar o tratamento a todo paciente soropositivo, em ambas as fases da infecção, exceto para aqueles que apresentam formas clínicas avançadas, com o objetivo de erradicá-la e evitar o agravamento das lesões (Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, 2005).

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais seguros e eficazes para o tratamento da doença de Chagas, até hoje, quase um século após a sua descoberta, somente dois estão disponíveis para o tratamento humano. Esses são representados pelos nitroderivados Nifurtimox [*N*-(3-methyl-1,1-dioxo-1,4-thiazinan-4-yl)-1-(5-nitro-2-furyl)methanimine: NF - Lampit®, Bayer) e Benzonidazol [*N*-benzyl-2-(2-nitroimidazol-1-yl)acetamide: BZ - Rochagan®, Rodanil®, Roche] cuja produção tem sido garantida por uma parceria entre a Organização Mundial de Saúde (OMS) e indústrias farmacêuticas. O NF é produzido pela Bayer em El Salvador e a produção do BZ é garantida pela Roche até que possa ser sustentada pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), no Brasil (Schofield *et al.*, 2006). No entanto, ambos os fármacos são

utilizados em esquemas prolongados de tratamento e apresentam consideráveis reações adversas, que levam freqüentemente ao abandono do tratamento pelo paciente (Urbina, 2001; Coura & Castro, 2002; Guedes *et al.*, 2006).

O NF e o BZ foram descobertos empiricamente nas décadas de 60 e 70, sendo sua ação tripanomicida demonstrada por Bock *et al.* (1969) e Richle (1973), respectivamente. Ambos são efetivos contra todas as formas evolutivas do parasito e agem primariamente por meio da redução do grupo nitro, sendo a reação catalisada pela NADPH-citococromo P-450 redutase, que resulta na produção de radical aniônico do nitrogênio (Moreno *et al.*, 1982; Docampo & Moreno *et al.*, 1984). A ação do NF está associada à produção subseqüente de superóxido de oxigênio e peróxido de hidrogênio, que na presença de íon férrico formam o radical livre hidroxil, que pode ligar-se a lipídios, proteínas e DNA, causando danos a essas moléculas (Docampo & Stopanni, 1980; Díaz de Toranzo *et al.*, 1988). Já o efeito do BZ envolve a ligação covalente de intermediários eletrofílicos do nitrogênio às macromoléculas (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988; Maya *et al.*, 2004) além de inibir a enzima fumarato NAPH redutase (Turrens *et al.*, 1996). O *T. cruzi* é considerado sensível aos danos celulares induzidos por metabólitos do NF e BZ, porque as enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo estão ausentes ou têm baixa atividade no parasito, como a superóxido dismutase, a glutationa peroxidase e a catalase (Turrens, 2004; Maya, *et al.*, 2007).

Quanto antes se iniciar o tratamento da doença de Chagas, maiores são as chances de se obter bons resultados. Entretanto, esses resultados variam entre diferentes países e até mesmo entre regiões geográficas de um mesmo país (Revisado por Urbina, 2001; Coura & Castro, 2002). Essa contradição pode ser explicada em parte, devido à diversidade das cepas do parasito, ao uso de diferentes regimes terapêuticos e ao critério de cura empregado. De uma maneira geral, resultados satisfatórios têm sido alcançados no tratamento da infecção congênita (66 a 100%), da fase aguda (40 a 76%) e da fase crônica recente (8,35 a 87%) – Revisado por Coura & Castro, 2002; Guedes *et al.*, 2006. Entretanto, no caso de infecções crônicas, os índices de cura variam de 0 a 19,1%, com resultados menos efetivos no norte e centro do Brasil e melhores no sul do país e na Argentina.

1.3 Desenvolvimento de Novos Fármacos

Avanços no conhecimento das vias metabólicas do *T. cruzi* têm permitido identificar alvos racionais para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e seguros para o tratamento da doença de Chagas (Tabela I).

Tabela I. Alvos e fármacos promissores para o tratamento da doença de Chagas.

Alvos	Importância	Mecanismo de ação e fármaco disponíveis
Biossíntese de esteróis	O *T. cruzi* requer em todos os estágios de seu ciclo de vida esteróis específicos para a viabilidade celular e proliferação. Inibição de sua biossíntese leva à perda da viabilidade celular por depleção de esteróis essenciais e acúmulo de intermediários tóxicos.	Inibição da enzima citocromo P-45-dependente de C14α esterol demetilase: Cetoconazol e Itraconazol (McCabe *et al.*, 1984; Moreira *et al.*, 1992; Brener *et al.*, 1993; Toledo *et al.*, 2003), Albaconazol (Guedes *et al.*, 2004), Posoconazol (Urbina *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 2000) e Ravuconazol (Urbina *et al.*, 2003).
Cisteíno-proteases	Participam de importantes funções no crescimento e sobrevivência do parasito, sendo responsável pela maior atividade proteolítica do *T. cruzi* em todos os estágios de vida.	Inibição enzimática: Thiocarbazina (Du *et al.*, 2002).
Biossíntese de esteróides e polisoprenóides	Parasitos protozoários contêm uma variedade de esteróides e polisoprenóides essenciais a sua sobrevivência, cuja síntese está ligada à atividade da enzima farnesil-pirofosfato sintase.	Inibição da enzima farnesilpirofosfato sintase envolvida na síntese de esteróides e polisoprenóides: Pamidronato e Risedronato (Urbina *et al.*, 1999; Szajnman *et al.*, 2003; Montalvetti *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001).
Mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo	As enzimas tripanotiona redutase e glutationa sintase participam dos mecanismos de proteção celular contra o estresse oxidativo (Turrens, 2004).	Inibição enzimática: fenotiazinas como a clomipramina e Thiordidazina, nitro-furanos e nafitilquinonas (Rivarola *et al.*, 2002; D'Silva *et al.*, 2002; Lo Presti *et al.*, 2004).

Tabela 1 (continuação). Alvos promissores para o tratamento da doença de Chagas.

Alvos	Importância	Mecanismo de ação e fármaco disponíveis
Cadeia respiratória	Diferenças entre a cadeia respiratória dos parasitos e células de mamíferos também têm sido demonstradas.	Inibição de cadeia de transporte de elétrons: hidroxianisolona - BHA (Aldunate *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 1988; Maya *et al.*, 2001): t-Butil-4-hidroxianisolona
Biosssntese de purinas	O *T. cruzi* é deficiente na via de síntese de novo de purinas, portanto, a via de salvação é essencial para a sobrevivênica do parasito. A enzima chave dessa via é a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT).	(a) Inibição da síntese de proteínas devido à incorporação ao RNA de substratos alternativos para a HGPRT, resultando na formação de nucleotídeos não fisiológicos (Marr, 1991): Allopurinol, 3'-desoxionisina e 3'-desoxiadenosina. Atividade tripano-cida foi descrita por Ávila & Ávila, 1981; Ávila *et al.*, 1984; Nakajima-Shimada *et al.*, 1996, Freymann *et al.*, 2000; Garzoni *et al.*, 2004, Gobbi *et al.*, 2007.
Metabolismo do inositol	O inositol é um componente essencial para o crescimento do *T. cruzi*, participando da formação de lipídios complexos derivados do fosfatidil-inositol.	Inibidor da síntese de inositol: 6-deoxi-6-fluoro-inositol (Einicker-Lamas *et al.*, 1999; Oliveira & Einicker-Lamas *et al.*, 2000).

Esses estudos têm revelado diferenças entre o metabolismo do parasito e o das células de mamíferos podendo assim, serem utilizadas como alvos para desenvolvimento de novos fármacos (Revisado por Stoppani, 1999; Urbina, 2001; Coura & Castro, 2002; Guedes *et al.*, 2006; Maya *et al.*, 2007). Diversos deles, com mecanismos distintos de ação, foram testados nos últimos anos, e mostraram atividade anti-*T. cruzi* "*in vitro*" e/ou "*in vivo*". De um modo geral, esses fármacos promoveram diminuição da multiplicação do *T. cruzi* e aumento da taxa de sobrevida dos animais infectados com diferentes cepas (Tabela I).

Além das alternativas terapêuticas citadas, já foi também descrita atividade anti-*T. cruzi* "*in vitro*" e/ou "*in vivo*" de diversos fármacos que atuam como inibidores da biossíntese de nucleotídeos, inibidores de fosfatidilcolina e esfingomielina, inibidores de outras enzimas da via de ergosterol, inibidores de enzimas da via glicotítica e inibidores da DNA topoisomerase II (Revisado por Coura & Castro, 2000; Guedes *et al.*, 2006; Maya *et al.*, 2007). Uma série de produtos naturais também tem demonstrado atividade contra o parasito, mas muitos ainda

não têm seus mecanismos de ação conhecidos. Apesar de haver número expressivo de compostos com ação tripanocida demonstrada, até o momento, somente três fármacos foram submetidos aos ensaios clínicos, incluindo o Cetoconazol, o Itraconazol e Allopurinol, sendo os resultados das triagens clínicas contraditórios. No Brasil, esses fármacos não foram capazes de erradicar a infecção em animais e em humanos ou de impedir a progressão da doença (Lauria-Pires *et al.*, 1988; Brener *et al.*, 1993). Por outro lado, no Chile, foi observada considerável redução na positividade dos testes parasitológicos e regressão ou prevenção das alterações eletrocardiográficas em pacientes submetidos ao tratamento com esses fármacos (Apt *et al.*, 1998; Apt *et al.*, 2003).

Os azólicos de terceira geração são, atualmente, os candidatos mais promissores para triagens clínicas em humanos, principalmente o Posoconazol e Ravuconazol, devido às suas características farmacocinéticas e capacidade de induzir cura em camundongos infectados com cepas resistentes ao BZ e NF.

A combinação de fármacos é uma alternativa viável para aumentar a eficácia terapêutica e/ou reduzir a intensidade de reações adversas e, foi testada por alguns pesquisadores na infecção experimental pelo *T. cruzi*. (Urbina *et al.*, 1993; Maldonato *et al.*, 1993; Araújo *et al.*, 2000 ; Francisco *et al.*, artigo submetido). De um modo geral, esses autores demonstraram que a combinação de fármacos pode reduzir a dose necessária para a atividade anti- *T. cruzi*, aumentar a taxa de sobrevida dos animais e/ou promover maior eficácia do tratamento. Entretanto, ainda existem poucos estudos em relação ao sinergismo de diferentes fármacos com potencial para o tratamento humano.

1.4 Quimioterapia Experimental com os Nitroderivados

Investigações experimentais têm demonstrado uma grande variedade na resposta à quimioterapia com BZ e/ou NF entre as cepas do *T. cruzi*. Nessa conjuntura, em uma ampla revisão da literatura, Toledo *et al.* (2004) observaram que das 104 cepas, cujos perfis de susceptibilidade a esses fármacos foram determinados no modelo murino, 56% foram susceptíveis ao tratamento (com índices de cura maiores que 66%), 16,8% foram parcialmente susceptíveis (índices de cura variando de 34 a 66%) e 27,2% foram resistentes (índices de cura variando de 0 a 33%). Desse modo, é provável que a cepa do *T. cruzi* possa ter um papel chave influenciando a resposta à quimioterapia, contribuindo para explicar a divergência de resultados observada no tratamento de pacientes em diferentes regiões geográficas (Andrade *et al.*, 1985a; Andrade *et al.*, 1992; Filardi & Brener, 1987). De fato, a existência de populações do

T. cruzi naturalmente resistentes aos nitroderivados já foram descritas e suportam essa hipótese (Filardi & Brener, 1987; Toledo *et al.*, 2003). Nesse estudo, os autores avaliaram cepas obtidas de diferentes hospedeiros vertebrados e vetores procedentes de várias regiões geográficas da América do Sul e verificaram que a eficácia do tratamento variou entre 0 e 100%. Além disso, foi observado que cepas provenientes do Rio Grande do Sul e Argentina apresentaram elevada susceptibilidade à droga, o que também acontece com pacientes procedentes destas regiões.

Considerando que, em geral, os estudos experimentais de quimioterapia foram realizados na fase aguda da infecção e que a grande maioria dos indivíduos infectados encontra-se na fase crônica, Andrade *et al.*, (1989) trataram com BZ e NF camundongos infectados com cepas isoladas de pacientes com infecção crônica, durante a fase aguda da infecção murina. Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados no tratamento da fase crônica humana. Concordância entre os resultados obtidos no tratamento humano e em camundongos inoculados com a mesma cepa do *T. cruzi* foi também observada em 86,7% dos casos analisados por Filardi & Brener (1987) e Andrade *et al.* (1992). As cepas Y e Colombiana isoladas de humanos e com susceptibilidade ao BZ conhecida em camundongos (Filardi & Brener, 1987) mostraram os mesmos resultados quando estudadas em cães (Guedes *et al.*, 2002). Esses dados sugerem fortemente que o parasito é fator chave que influencia a respota a quimioterapia. Entretanto, Toledo *et al.* (2003) verificaram que alguns clones sensíveis ao tratamento na fase aguda não apresentaram os mesmos resultados quando os animais foram tratados na fase crônica da infecção. Similarmente, Veloso *et al.* (2001), observaram que isolados, obtidos após a manutenção da cepa Be-78 por longo período em cães, apresentaram menores índices de cura em camundongos do que os observados para animais infectados com a cepa parental. Guedes *et al.* (2002), estudando a susceptibilidade da mesma cepa ao BZ no modelo canino, observaram índices de cura de 87,5 e 37,5%, nas fases aguda e crônica, respectivamente. Esses resultados sugerem que outros fatores, além do parasito, também devem influenciar a resposta à quimioterapia.

Recentemente, foi sugerido que a ativação do sistema imune pelo *T. cruzi* e a produção de INF-γ apresenta um papel relevante na eficácia do BZ contra o parasito (Romanha *et al.*, 2002). De fato, alguns relatos na literatura apontam para o sinergismo entre a resposta imune e a ação do BZ. Neste contexto, Lages-Silva *et al.* (1990) demonstraram que a fagocitose "*in vitro*" e a destruição intracelular do *T. cruzi* por macrófagos peritoneais são consideravelmente aumentadas quando os animais infectados são submetidos ao tratamento, enquanto Toledo (1992) verificou que o tratamento com nitroderivados é menos efetivo em animais imunodeficientes do que em imunocompetentes. Além disso, foi observado aumento nos

índices de cura em animais infectados com a cepa Colombiana (resistente ao BZ) quando foi utilizada uma combinação de rIL-12 e BZ (Michailowsk *et al.*, 1998). Posteriormente, Murta *et al.* (1999) verificaram que essa cepa apresentava menor capacidade de induzir a síntese de IL-12 por macrófagos "*in vivo*" e "*in vitro*" do que cepas susceptíveis ao fármaco.

Admite-se que o tratamento com derivados nitroheterocíclicos é mais efetivo durante a fase aguda da infecção, provavelmente devido a forte ativação do compartimento celular do sistema imune que libera altos níveis de INF-γ, IL-12 e outras citocinas pró-inflamatórias (Dutra *et al.*, 2005; Savino *et al.*, 2007). Já está bem estabelecido que a resistência à infecção pelo *T. cruzi*, durante a fase aguda, está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias (Hoft *et al.*, 1993; Nabors & Tarleton, 1991; Brener & Gazzinelli, 1997; Abrahamsohn, 1998; Martin & Tarleton, 2004; Oliveira *et al.*, 2004) e que cepas distintas do *T. cruzi* podem induzir diferentes respostas imunológicas (Andrade *et al.*, 1985b; Gonzalez *et al.*, 1995; Tarleton *et al.*, 1992; Garzon *et al.*, 2005; Santos *et al.*, artigo submetido). A interação do parasito com receptores específicos na membrana de macrófagos aciona diversos caminhos de sinalização intracelular, via o receptor Toll-2 e Toll-9 (Campos & Gazzinelli, 2004; Tarleton, 2007). A interação parasito-receptor leva a ativação de macrófagos e conseqüentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1, 6, 8, 12 e TNF-α. Essas citocinas estimulam a produção de INF-γ por diferentes linhagens de linfócitos, que então, ativa os macrófagos para a atividade microbicida (Gazzinelli *et al.*, 1992; Camargo *et al.*, 1997; Melo *et al.*, 2003; Une *et al.*, 2003). Camundongos resistentes à infecção pelo *T. cruzi* apresentam elevada produção de óxido nítrico induzida pelo IFN-γ e TNF-α (Reed, 1988; Gazzinelli *et al.*, 1992; Vespa *et al.*, 1994), sendo que a neutralização dessas citocinas com anticorpos ou deleção gênica torna animais mais susceptíveis à infecção (Silva *et al.*, 1992; Abrahamsohn, & Coffmam, 1996; Galvão Da Silva *et al.*, 2003). Outros autores também demonstraram que o tratamento com IFN-γ promove aumento da resistência à infecção pelo *T. cruzi* (Reed, 1988; Torrico *et al.*, 1991), confirmando a importância dos mecanismos imunológicos no controle da infecção.

Um problema associado à quimioterapia experimental é a dificuldade de confirmação da cura após tratamento (Andrade *et al.*, 1991b). Com esse objetivo, uma combinação de metodologias é necessária, cuja interpretação de resultados diverge entre diferentes grupos (Maldonato *et al.*, 1993; Toledo *et al.*, 1997; Michailowsky *et al.*, 1998; Veloso *et al.*, 2001; Urbina *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2003; Caldas *et al.*, 2007). A definição de cura geralmente é discutível devido à limitação dos métodos empregados em tal processo. A sorologia

convencional pode permanecer positiva por um longo período (3-12 meses) após cura da infecção experimental em camundongos (Filardi & Brener, 1982; Andrade *et al.*, 1985a; Andrade *et al.*, 1987; Andrade *et al.*, 1991) e os métodos parasitológicos, embora constituam uma prova irrefutável da falha terapêutica, podem ser falso-negativos, principalmente, na fase crônica da infecção (Brener, 1962; Filardi &Brener, 1987). Além disso, há indicações de que a positividade da hemocultura depende da população do *T. cruzi* analisada (Toledo *et al.*, 2002; Veloso, 2007). A sorologia não convencional para detecção de anticorpos líticos ainda não é freqüentemente empregada para o controle de cura (Kretelli & Brener, 1982; Toledo *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2000). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma metodologia mais recentemente empregada, apresenta resultados contraditórios entre os diferentes grupos (Campos *et al.*, 2002; Camandaroba *et al.*, 2003; Myamoto *et al.*, 2006). Na verdade o real significado dos resultados da PCR no contexto de controle de cura é ainda discutível.

A capacidade do BZ de eliminar o parasito dos tecidos e diminuir o processo inflamatório e lesões tem sido também considerada como indicativa de sucesso terapêutico. Alguns autores têm empregado a histopatologia convencional como uma metodologia complementar para avaliar a eficácia ao tratamento em animais experimentalmente infectados e têm observado que animais tratados apresentam ausência do parasito e diminuição ou mesmo regressão do processo inflamatório (Brener *et al.*, 1962; Andrade *et al.*, 1987; Andrade *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 1997; Garzoni *et al.*, 2004; Corrales *et al.*, 2005). Entretanto, Michailowsk *et al.* (1998) empregaram a PCR na análise de lisados do coração de animais infectados pelo *T. cruzi* submetidos ao tratamento que apresentaram testes parasitológicos (hemocultura e PCR em sangue) e sorológicos negativos, verificando a positividade para o kDNA do parasito. Esses resultados demonstram, mais uma vez, a contradição entre os métodos empregados no critério de cura e reforçam a dificuldade de sua interpretação.

1.5 O Trypanosoma cruzi: ***Diversidade Genética e Propriedades Biológicas***

1.5.1 Organização do Genoma

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, digenético, pertencente à ordem Kinetoplastidae e à família Trypanosomatidae (Chagas, 1909), que apresenta dois genomas distintos localizados no núcleo e no cinetoplasto.

O conteúdo de DNA pode variar entre os clones do *T. cruzi*, na ordem de 125 a 330 fentogramas, incluindo o DNA do cinetoplasto que corresponde a aproximadamente 30% do total (Henriksson *et al.*, 1996). Elevado polimorfismo foi também observado em relação ao tamanho e número de cromossomos entre as diferentes populações dessa espécie (Wagner & So 1990; Henriksson *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 2004; Triana *et al.*, 2006). Devido à complexidade de seu genoma e à dificuldade de separação dos cromossomos, o cariótipo do *T. cruzi* ainda não está bem estabelecido. Estima-se que as diferentes cepas do *T. cruzi* apresentam de 64 a 80 cromossomos (Cano *et al*, 1995; Henriksson *et al*, 1996), mas o número de bandas cromossômicas detectadas é variável entre diferentes estudos já realizados (Santos *et al.*, 1997; Porcille *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2004; Branche *et al.*, 2006).

O tamanho do genoma diplóide do *T. cruzi* é estimado em 106,4 a 110,7 MB, dos quais aproximadamente 50% correspondem a seqüências repetitivas. Os genes podem se apresentar repetidos em tandem ou como cópias de pseudogenes (Castro *et al.*, 1981; Lanar *et al.*, 1981; El-Sayed *et al.*, 2005; Arner *et al.*, 2007) constituídas, principalmente, por grandes famílias de genes que codificam proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (El Sayed *et al.*, 2005). Entre as seqüências repetidas em tandem estão o DNA satélite, os minissatélites e os microssatélites que diferem no tamanho dos motivos de repetição (Hancock, 1999).

O DNA satélite contém, aproximadamente, 100.000 cópias por genoma (Sloof *et al.*, 1983; Cano *et al.*, 1995; Requena *et al.*, 1996) e corresponde a 10% do DNA total. Os minissatélites são regiões hipervariáveis no genoma do *T. cruzi* com até 15 nucleotídeos na unidade repetitiva, presentes em milhares de cópias no genoma humano (Jeffreys *et al.*, 1985). Os microssatélites correspondem a pequenas seqüências de DNA de até seis nucleotídeos, estão amplamente dispersos no genoma de todos os organismos e com elevado grau de polimorfismo (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Beckman & Weber, 1992). As taxas de mutação dos locos de microssatélites *in vivo* foram estimadas na ordem 10^{-2} em *Escherichia coli* (Levinson & Gutman, 1987) e 10^{-4} a 10^{-5} em leveduras (Henderson & Petes, 1992), sendo

consideravelmente maiores do que as taxas observadas em outros locos gênicos (10^{-9} a 10^{-10}). Provavelmente, as mutações são decorrentes de um deslizamento da DNA polimerase entre as fitas de DNA durante a replicação do mesmo, na região que contém as seqüências de microssatélites, o que promove acréscimo ou diminuição de unidades repetitivas (Levinson & Gutman, 1987; Ellegren, 2004). Diversos estudos têm demonstrado que a PCR de microssatélites é uma técnica eficiente para a análise de parentesco e estudos filogenéticos (Goldstein & Pollock, 1997; Oliveira *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2006). Recentemente, Valadares *et al.* (2008) descreveram novos locos de microssatélites em *T. cruzi* desenvolvendo uma metodologia capaz de detectar pequenas quantidades de DNA do *T. cruzi* como as presentes em células únicas ou em tecidos de indivíduos infectados.

O DNA contido no cinetoplasto (kDNA) está organizado em uma complexa rede de moléculas concatenadas, contendo 20-50 cópias de maxicírculos e 5.000-20.000 cópias de moléculas de minicírculos (Simpson, 1987). Os maxicírculos contém seqüências que codificam proteínas envolvidas na respiração celular e na síntese do rRNA (Myler, 1993; Silveira, 2000). As seqüências dos minicírculos estão envolvidas na transcrição de pequenos RNA(s) guias que participam do processo de editoração dos mRNA(s) das enzimas mitocondriais (Sturm *et al.*, 1990; Stuart *et al.*, 1995; Hajduk & Sabatin, 1996). Os minicírculos são constituídos de quatro regiões conservadas intercaladas por quatro regiões variáveis de 120 a 160pb e de 280 a 320pb, respectivamente (Degrave *et al.*, 1988). As regiões conservadas contêm a origem de replicação do DNA e não se diferem entre as distintas populações do parasito. As seqüências de nucleotídeos da região variável são consideravelmente heterogêneas entre as diferentes populações do *T. cruzi* e mesmo entre diferentes minicírcurlos de uma mesma população, constituindo alvos adequados para o estudo da variabilidade genética nessa espécie (Riou & Yot, 1977; Morel *et al.*, 1980). Além disso, devido ao seu elevado número de cópias, os minicírculos têm sido utilizados como alvos eficientes na detecção do *T. cruzi* em amostras biológicas (Sturm *et al.*, 1989).

O genoma completo do clone CL Brener foi publicado por El-Sayed *et al.* (2005) representando um marco importante no conhecimento do parasito, uma vez que abre perspectivas para o estudo de genes ligados a diferentes propriedades biológicas do *T. cruzi* e de sua variabilidade genética. O desenvolvimento nessa área poderá possibilitar o estabelecimento de correlações mais específicas entre a genética e as propriedades biológicas do parasito e/ou formas clínicas da doença. Distintos alvos no genoma do *T. cruzi* já foram empregados para desenvolver metodologias capazes de caracterizar cepas do parasito tais como as sequências de minissátelites (Macedo *et al.*, 1992), o DNA total (Tibayrenc *et al.*, 1993;

Steindel *et al.*, 1993), o kDNA (Morel *et al.*, 1980; Vago *et al.*, 1996; Freitas *et al.*, 2006), a região intergênica do gene do rRNA (Souto & Zingales, 1993), a região SL do gene do miniexon (Souto *et al.*, 1996) e os microssatélites (Oliveira *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1998).

A análise de isoenzimas foi a primeira abordagem molecular empregada no estudo da variabilidade molecular do *T. cruzi* e ainda consiste em uma metodologia de referência para o seu estudo. As variações nos perfis de bandas eletroforéticas são decorrentes de diferenças na estrutura primária de uma mesma enzima entre as populações do parasito e podem ser atribuídas às diferenças nos genes que codificam essas proteínas (Ogita, 1968; Korochkin, 1978; Romanha, 1982). Diferenças isoenzimáticas, entre amostras do *T. cruzi*, foram observadas pela primeira vez por Toyé (1974) e, posteriormente essa técnica tornou-se amplamente empregada no estudo de isolados desse parasito (Miles *et al.*, 1977; Miles *et al.*, 1978; Miles, 1979; Miles *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1981a,b,c; Romanha *et al.*, 1979; Romanha, 1982; Tibayrenc *et al.*, 1985; Tibayrenc & Ayala, 1988; Tibayrenc & Brenière *et al.*, 1988; Lewicka *et al.*, 1995; Jaramillo *et al.*, 1999; Barnabé *et al.*, 2000; Thomaz *et al.*, 2002; Miralles *et al.*, 2002; Bastrenta *et al.*, 2003; Brenière *et al.*, 2003; Higo *et al.*, 2004; Rodríguez-González *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2006).

No presente estudo, três dessas metodologias dirigidas a diferentes alvos no *T. cruzi* foram empregadas: (1) a PCR do kDNA que utiliza iniciadores dirigidos à região conservada do minicírculo e amplifica a região variável, (2) a PCR de microssatélites e (3) a análise de isoenzimas para a identificação das populações do parasito.

1.5.2 Estrutura Populacional do *T. cruzi*

Em um extenso trabalho realizado por Tibayrenc *et al.*, (1986), que analisaram o perfil enzimático de populações clonadas, originárias de amostras obtidas de diferentes hospedeiros do ciclo doméstico e silvestre da Tripanosomíase Americana, em diferentes países da América Latina, foi proposto que o *T. cruzi* apresenta estrutura e evolução predominantemente clonal. Isso pressupõe que os clones do parasito devem ser considerados como unidades genéticas estáveis no tempo e no espaço, com eventos ocasionais de troca genética (Carrasco *et al.*, 1996; Bogliolo *et al.*, 1996; Machado & Ayala, 2001; Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003; Gaunt *et al.*, 2003; Higo *et al.*, 2004; Westenberger *et al.*, 2006). Essa hipótese é suportada pela observação de que o número de genótipos verificados neste parasito é significativamente inferior se comparado ao número de combinações teóricas esperadas para cada loco, demonstrando um grande desvio da lei de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação entre os locos. Se os alelos,

em cada um dos 15 locos analisados, fossem combinados randomicamente, o número total de genótipos esperados seria de $7x10^{15}$ e, todos poderiam ocorrer em baixa freqüência. Entretanto, foram encontrados apenas 43 zimodemas, dos quais 16 diferem por um único alelo. Além disso, alguns zimodemas foram amostrados repetidamente em diferentes regiões geográficas e períodos de tempo.

A despeito da grande variabilidade intraespecífica verificada em *T. cruzi* (Morel *et al.*, 1980; Tibayrenc & Ayala, 1988; Tibayrenc *et al.*, 1993; Steindel *et al.*, 1993; Vago *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1998), estudos filogenéticos, utilizando diferentes marcadores e métodos de análise, mostraram uma clara subdivisão dos isolados do *T. cruzi* em pelo menos duas linhagens genéticas principais (Souto & Zingales, 1993; Tibayrenc *et al.*, 1995; Souto *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1998; Bastrenta *et al.*, 1999; Di Noia *et al.*, 2002) que foram denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Anonymus, 1999). Entretanto, alguns isolados como aqueles que apresentaram caráter genético híbrido, não puderam ser classsificadas em nenhuma destas linhagens, sendo denominados apenas de *T. cruzi* até que a sua relação filogenética fosse melhor estabelecida, incluindo o genótipo 39 (Tibayrenc & Ayala, 1988) e o zimodema 3 (Miles *et al.*, 1977). A distribuição dessas linhagens genéticas nos ciclos silvestre e doméstico da doença de Chagas parece ser distinta, considerando diferentes regiões geográficas. Na Colômbia, no México, na Guatemala e no Panamá, há crescentes evidências de predomínio do *T. cruzi* I circulando em ambos os ambientes, inclusive produzindo quadros clínicos graves no homem (Bosseno *et al.*, 2002; Montilla *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2002; Higo *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2006). Por outro lado, nos países do Cone Sul, ambas as linhagens genéticas circulam no ambiente doméstico e silvestre, mas somente o *T. cruzi* II é associado mais freqüentemente à infecção humana e o *T. cruzi* I é observado esporadicamente infectando o homem (Fernandes *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1999; Zingales *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2005; Di Noia *et al.*, 2002; Yeo *et al.*, 2005; Lages-Silva *et al.*, 2006).

Devido à heterogeneidade observada nas propriedades de cada linhagem genética, o estabelecimento de correlações entre a genética do parasito e suas características biológicas e epidemiológicas e/ou clínicas da doença de Chagas pode ser difícil, necessitando assim de considerar as subdivisões genéticas menores do *T. cruzi* (Tibayrenc, 2003).

Segundo Tibayrenc (1998), o *T. cruzi* pode ser subdividido em dois grandes grupos que reúnem estoques que são geneticamente similares e identificáveis por marcadores moleculares e imunológicos comuns. Essas subdivisões são denominadas DTU1 e DTU2 (Discrete Typing Unity 1 e 2). A DTU1 corresponde a todos os genótipos relacionados ao *T. cruzi* I, que formalmente foram identificados como zimodema Z1 (Miles *et al.*, 1977). Essa DTU

representa um amplo e heterogêneo grupo, cuja identificação tem valor preditivo maior em suas propriedades, enquanto a DTU2 parece apresentar maior especificidade geográfica e epidemiológica e, inclui as cepas das linhagens *T. cruzi* II e *T. cruzi*. Posteriormente, Brisse *et al.* (2000), utilizando análise de MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) e RAPD (randomly amplified polimorphic DNA), propuseram a subdivisão da DTU2 em cinco subdivisões menores denominadas DTUs 2a, 2b, 2c, 2d e 2e (Brisse *et al.*, 2000). A DTU2b corresponde ao Zimodema 2 (Miles *et al.*, 1977) ou linhagem *T. cruzi* II, as DTU 2a e 2c ao Zimodema 3 (Miles *et al.*, 1977) e, as DTUs 2d e 2e são grupos híbridos estabelecidas após subseqüente propagação clonal. Os autores consideram que as especificidades biológica e epidemiológica de cada uma das subdivisões menores, incluindo os genótipos, provavelmente são mais informativas do que as das DTU(s) maiores e poderiam contribuir significativamente para o esclarecimento da influência da genética do parasito na patogênese da doença de Chagas. As DTU(s) parecem estar diferentemente distribuídas na América Latina. Estudos epidemiológicos sugerem que a DTU1 está relacionada com ambos os ciclos de transmissão do parasito; as DTUs 2b, 2d e 2e, ao ciclo doméstico e à infecção humana; e as DTU2a e 2c, ao ambiente silvestre (de Luca D'Oro *et al.*, 1993; Barnabé *et al.*, 2000; Diosque *et al.*, 2003; Higo *et al.*, 2004; Burgos *et al.*, 2005; Rozas *et al.*, 2007a,b).

Embora essa subdivisão tenha sido reforçada por classificações baseadas em outras seqüências gênicas e no cariótipo do *T. cruzi* (Brisse *et al.*, 2001; Henriksson *et al.*, 2002; Rozas *et al.*, 2007b), outros trabalhos observaram apenas três subdivisões nessa espécie, considerando a análise do polimorfismo do gene tcpgp2 (Robello *et al.*, 2000) e do polimorfismo único de nucleotídeos (SNP) do gene de reparo do DNA que codifica a proteína ligadora de ATP (Augusto-Pinto *et al.*, 2003).

Recentemente, Freitas *et al.* (2006), analisando marcadores mitocondriais, sugeriram a existência de um terceiro grupo ancestral denominado *T. cruzi* III, o qual por eventos de hibridização com *T. cruzi* II, teriam originado os isolados de caráter híbrido que são observados atualmente. Desta maneira, as populações do *T. cruzi* seriam subdivididas em três linhagens principais (*T. cruzi* I; *T. cruzi* II e *T. cruzi* III que corresponde ao Zimodema 3), além de pelo menos dois grupos híbridos que correspondem às DTU(s) 2d e 2e.

1.5.3 Correlação entre a Genética do *T. cruzi* e as Propriedades Biológicas

Estudos em diferentes modelos experimentais mostraram que o *T. cruzi* apresenta uma grande variabilidade em suas propriedades biológicas e inclusive na susceptibilidade aos nitroderivados (Chagas, 1909; Vianna, 1911; Brener & Chiari, 1963; Melo & Brener, 1978; Bice & Zeledon, 1970; Andrade, 1974; Brener *et al.*, 1976; Filardi & Brener, 1987; Lenzi *et al.*, 1998). A teoria clonal pressupõe que a divergência evolucionária acumulada entre os clones, provavelmente envolve genes que governam importantes propriedades do parasito relacionadas à sua virulência, à patogenicidade e à epidemiologia da doença de Chagas (Tibayernc, 2003). Conseqüentemente, é esperada uma boa correlação entre a variabilidade genética do parasito, suas propriedades biológicas e as características clínicas da doença de Chagas.

Diversos trabalhos corroboram esta hipótese e demonstram uma forte associação entre a distância genética e as propriedades biológicas do parasito. Esse fato foi demonstrando no estudo das propriedades do *T. cruzi* em cultura acelular e celular (Dvorak *et al.*, 1980; Sànchez *et al.*, 1990; Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998), do seu comportamento e patogenicidade em camundongos (Andrade, 1974; Andrade *et al.*, 1983; Sànchez *et al.*, 1990; Carneiro *et al.*, 1991; Andrade & Magalhães, 1997; Laurent *et al.*, 1997; Lana *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2002), desenvolvimento nos vetores (Garcia & Dvorak, 1982; Garcia & Azambuja, 1991; Lana *et al.*, 1998), inclusive em relação à resposta à quimioterapia (Andrade *et al.*, 1985 a; Revollo *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2004).

De um modo geral, as populações pertencentes ao *T. cruzi* I apresentaram maior habilidade de infectar e completar seu ciclo de vida no inseto vetor (Garcia & Dvorak, *et al.*, 1982; Garcia & Azambuja, 1991; Lana *et al.*, 1998) maior capacidade de diferenciação em tripomastigotas sangüíneos e maior capacidade de multiplicação no hospedeiro vertebrado (Andrade, 1974; Andrade *et al.*, 1983; Sànchez *et al.*, 1990; Gonzalez *et al.*, 1995; Andrade & Magalhães, 1997) do que as populações do *T. cruzi* II. Com relação à susceptibilidade a fármacos, foi observado por alguns autores que cepas do grupo *T. cruzi* I apresentaram elevado grau de resistência, enquanto as cepas do grupo *T. cruzi* II foram mais susceptíveis, (Andrade *et al.*, 1985a; Andrade & Magalhães, 1997, Toledo *et al.*, 2003).

Entretanto, resultados divergentes foram descritos na literatura por Ruiz *et al.* (1998) e Neira *et al.* (2002) referentes à infectividade e virulência, demonstrando que cepas do *T. cruzi* II apresentam essas propriedades mais pronunciadas que aquelas do *T. cruzi* I. Lisboa *et al.* (2007) estudando 95 cepas do *T. cruzi* pertencentes a ambos os grupos verificaram uma elevada

heterogeneidade genética entre os isolados com elevada parasitemia detectada em 64% dos isolados do *T. cruzi* II e em 41% do *T. cruzi* I. Trabalhos recentes de caracterização biológica com isolados do *T. cruzi* I provenientes do México também não detectaram um comportamento peculiar para esse grupo (Sànchez-Guillén *et al.*, 2006). Grande heterogeneidade intragrupo foi também observada nos estudos de Toledo *et al.* (2002), Laurent *et al.* (1997) e Revollo *et al.* (1998).

Todos esses dados sugerem que outros fatores, além da divergência evolucionária dos clones do parasito, também devem influenciar suas propriedades biológicas. Além disso, os autores recomendaram que para estabelecimento de correlações mais específicas é adequado empregar subdivisões menores do *T. cruzi*. Murta *et al.* (1998) não encontraram correlação entre o perfil de susceptibilidade das cepas e sua genética, empregando a análise de isoenzimas e dos genes de rRNA e do mini-exon. Os autores observaram apenas uma associação do perfil de resistência ao zimodema B (Romanha *et al.*, 1979), mas não observaram uma predominância de cepas resistentes em Z1 (*T. cruzi* I) ou sensíveis em Z2 (*T. cruzi* II). Esses dados indicam que a resposta ao tratamento ainda não pode ser absoluta e exclusivamente prevista pela genética do parasito, através do emprego dos marcadores moleculares disponíveis até o momento.

Ainda não foi possível estabelecer satisfatoriamente uma correlação entre a genética do parasito e a forma clínica da doença de Chagas, sendo os resultados encontrados bastante controversos (Apt *et al.*, 1987; Brenière *et al.*, 1985; Montamat *et al.*, 1996; Vago *et al.*, 2000; Lages-Silva *et al.*, 2006).

1.5.4 Os Genótipos Principais do *T. cruzi* e suas Propriedades Biológicas

A caracterização de isolados do *T. cruzi*, provenientes de diferentes regiões geográficas da América Latina e diferentes ciclos de transmissão demonstrou a existência de quatros genótipos ubiqüistas presentes em 53,7% dos isolados (Tibayrenc & Breniére 1988). Esses foram denominados genótipos principais, correspondendo aos grupos genéticos 20, 19, 39 e 32 como proposto por Tibayrenc & Brèniere, 1988. Provavelmente, devido à elevada dispersão, esses genótipos têm um papel importante na patologia e na epidemiologia da doença de Chagas. Os grupos genéticos 19 e 20 são geneticamente mais relacionados entre si e, distantes dos genótipos 39 e 32, que por sua vez são relacionados geneticamente (Figura 1). Na Bolívia, a presença dos genótipos 20 e 39 tem sido amplamente demonstrada, inclusive em infecções mistas em vetores e em humanos (Noireau *et al.*, 1995; Brenière *et al.*, 1995; Bosseno

et al., 1996; Brenière *et al.*, 1998; Brenière *et al.*, 2002; Bastrenta *et al.*, 2003). No Chile, o genótipo 39 foi descrito como o detectado com maior freqüência, seguido pelos genótipos 32 e 33 (Solari *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 2001). Entretanto, Coronado *et al.* (2006a) descreveram maior prevalência do genótipo 19 em humanos e do genótipo 39 em *T. infestans*, nesse mesmo país. O genótipo 39 também já foi descrito na Argentina (Solari *et al.*, 1992). Em outros países, a dispersão desses genótipos ainda não é bem conhecida, uma vez que sus identificação ainda não é amplamente utilizada na caracterização dos isolados do parasito.

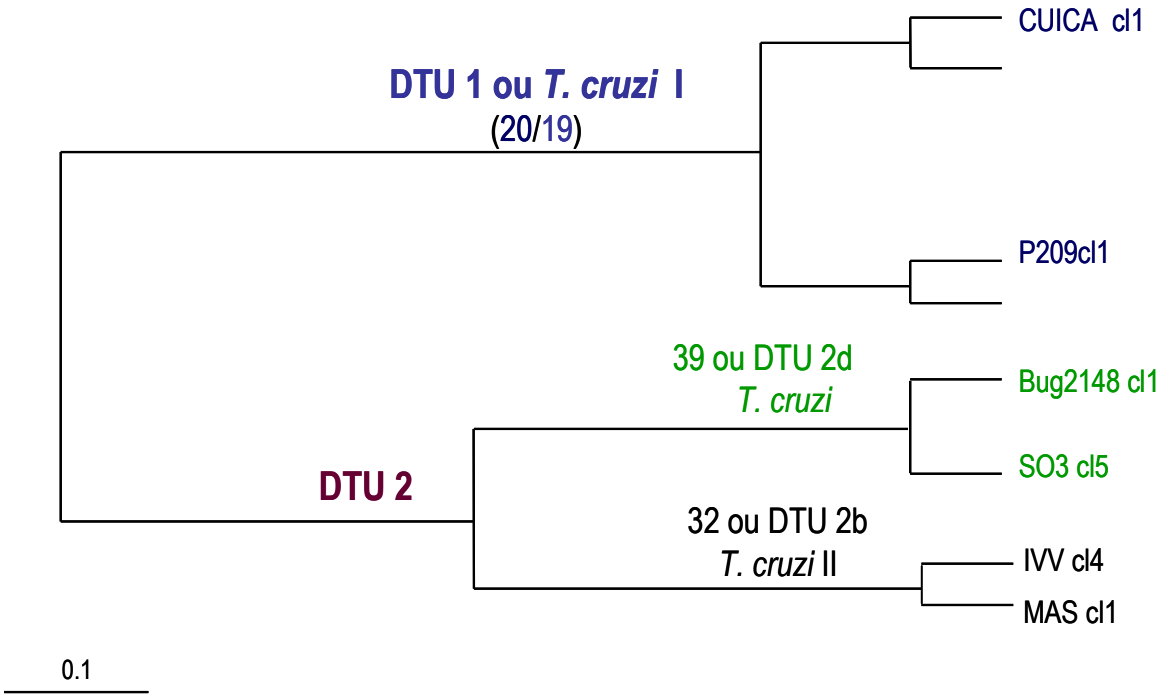


Figura 1. Dendograma mostrando a divergência filogenética entre os oito clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais (20, 19, 39 e 32) em estudo, construído pela UPGMA usando a matriz de distância genética de Jaccard (1908) obtida pela análise isoenzimática de 22 locos genéticos (Modificada de Tibayrenc *et al.*, 1993) Os clones pertencentes a cada um dos genótipos principais são indicados em cores distintas: em azul estão indicados clones pertencentes aos genótipos 20 e 19 (DTU I e *T. cruzi* I), em verde os clones pertecentes ao genótipo 39 (DTU2 e *T. cruzi*) e em preto estão indicados clones pertencentes ao genótipo 32 (DTU*T. cruzi* II).

Com o objetivo de investigar a existência de correlação entre a genética do *T. cruzi* e de suas propriedades biológicas, o grupo francês coordenado pelo Dr. Michel Tibayrenc e o de pesquisas em Doença de Chagas da Universidade Federal de Ouro Preto realizaram uma série de estudos empregando clones pertencentes aos genótipos principais do parasito. Esses pesquisadores observaram evidente correlação entre a genética e as propriedades biológicas do

T. cruzi em diferentes modelos experimentais, com clones pertencentes aos genótipos 19 e 20 apresentando propriedades mais semelhantes entre si e distintas daquelas observadas para os clones pertencentes aos genótipos 32 e 39. De um modo geral, clones dos genótipos 19/20 foram mais infectivos e virulentos para células e para o hospedeiro vertebrado e apresentaram maior capacidade de multiplicação e diferenciação no vetor; seguidos pelos clones do grupo 39 e, depois dos clones do grupo 32 que apresentaram menor intensidade dessas propriedades (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Lana *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2002). Tendência semelhante foi observada por Wallace *et al.* (2001), que verificaram que clones do genótipo 39 produzem baixa parasitemia em camundongos, enquanto os pertencentes aos genótipos 19 e 20 produzem elevada parasitemia, independentemente do inóculo.

Revollo *et al* (1998) verificaram correlação entre a diversidade genética e a sensibilidade desses clones ao NF e BZ em cultura celular e acelular. Clones do grupo genético 19/20 que crescem mais facilmente em células ***"Vero"*** e que são mais virulentos para camundongos, apresentaram menor sensibilidade a esses fármacos que clones pertencentes ao grupo 32, que se encontram na situação oposta. Clones pertencentes ao grupo genético 39, que se encontra em posição genética intermediária entre os grupos 19/20 e 32, apresentaram valores intermediários de sensibilidade a drogas. Efeito semelhante foi observado em relação à susceptibilidade ao Itraconazol determinada por Toledo *et al.* (2003) em camundongos BALB/c, sendo os genótipos 19 e 20 (ambos *T. cruzi* I) 100% resistentes a esse fármaco; o genótipo 39 (*T. cruzi*) parcialmente susceptível (taxa de cura de 55%); e o genótipo 32 (*T. cruzi* II), susceptível (84%). Recentemente, outros autores corroboraram esses achados após o tratamento de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* no Chile, demonstrando que *T. cruzi* I foi mais resistente tanto ao alopurinol quanto ao itraconazol, enquanto *T. cruzi* II (genótipo 32) foi mais susceptível ao itraconazol (Coronado *et al.*, 2006).

1.6 Infecções Mistas

Estudos de caracterização molecular do *T. cruzi* permitiram verificar que cepas desse parasito são constituídas de misturas de populações circulando entre vários hospedeiros silvestres e domésticos (Morel *et al.*, 1980; Deane *et al.*, 1984; Tibayrenc *et al.*, 1986; Marques de Araújo & Chiari, 1988; Oliveira *et al.*, 1998). A existência de infecções mistas, em diferentes hospedeiros invertebrados e vertebrados, (Tibayrenc *et al.*, 1985; Bosseno *et al.*, 1996; Solari *et al.*, 1998; Lisboa *et al.*, 2006; Rozas *et al.*, 2007a), inclusive no homem (Brenière *et al.*, 1995; Lauria-Pires *et al.*, 1996a; Brenière *et al.*, 1998; Solari *et al.*, 2001; Di Noia *et al.*, 2002; Torres *et*

al., 2003; Mejia *et al.*, 2005) tem sido cada vez mais demonstrada na natureza, pelo uso de técnicas moleculares mais sensíveis, aplicáveis diretamente nas amostras biológicas. Essa elevada distribuição sugere que infecções mistas podem ter um papel relevante na epidemiologia da doença de Chagas e apresentar conseqüências importantes para o hospedeiro, uma vez que podem desencadear respostas imunológicas, lesões histopatológicas e evolução clínica distintas das observadas nas monoinfecções.

Alguns estudos vêm sendo realizados no sentido de elucidar esses aspectos em infecções mistas experimentais, tanto no hospedeiro invertebrado (Pinto *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2007), quanto no vertebrado (Lana *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2006). No vetor, foi observado que populações com menor capacidade de desenvolvimento em monoinfecções foram favorecidas em infecções mistas com evidente aumento da multiplicação e povoamento do tubo digestivo (Araújo *et al.*, 2007). Similarmente, Pinto *et al.* (1998) observaram que clones pertencentes ao genótipo 32, que apresentaram baixa infectividade e produção de flagelados em monoinfecções no vetor, foram capazes de permanecer no hospedeiro invertebrado em infecções mistas com clones pertencentes aos outros genótipos principais do *T. cruzi*, às vezes de forma mais presente do que clones mais infectivos e virulentos nas infecções monoclonais, como os clones do genótipo 19/20. Resultados análogos foram obtidos por Lana *et al.* (2000) no hospedeiro vertebrado com alguns desses mesmos clones, sendo a maior percentagem de infecções mistas observadas em combinações dos genótipos 19/20+32. Mudanças no tropismo tecidual foram também observadas em ratos infectados com combinações da cepa monoclonal JG e do clone CL-Brener comparativamente às monoinfecções por essas populações do parasito (Lana *et al.* 2003). Mais recentemente, Martins *et al.* (2006) estudando, em camundongos BALB/c, o efeito de infecções mistas sobre diferentes propriedades biológicas do *T. cruzi*, verificaram que o comportamento dos clones na mistura não pode ser previsto baseado em suas propriedades verificadas em monoinfecções. Foram observadas alterações principalmente em relação à curva de parasitemia, sugerindo efeitos de inibição e estimulação recíprocos entre os clones da mistura.

Em conjunto, esses resultados sugerem que em infecções mistas não ocorre apenas uma justaposição de efeitos entre os clones da mistura, mas uma interação entre eles, resultando em alterações de suas propriedades fundamentais que interfeririam no curso da infecção. Esses achados sugerem que infecções mistas podem exercer um importante impacto na morbidade da doença, na dinâmica de transmissão do parasito e inclusive na resposta à quimioterapia, uma vez que indivíduos em áreas endêmicas podem ter sido submetidos a

infecções por mais de um clone do parasito e também a várias reinfecções (Breniére *et al.*, 1998; Macedo & Pena, 1998; Martins *et al.*, 2006). Essa dinâmica de tranmissão resultaria na formação de populações multiclonais com características genéticas distintas, cujo comportamento biológico e evolução da infecção podem diferir no hospedeiro.

Em decorrência dos resultados encontrados na literatura, demonstrando que as infecções mistas podem resultar em mudanças no curso da infecção experimental e a sua importância na epidemiologia da doença de Chagas, o presente projeto investigou a eficácia da quimioterapia com BZ em infecções mistas por clones do *T. cruzi* pertencentes aos genótipos principais, cuja susceptibilidade ao BZ já foi anteriormente verificada em monoinfecções. Esse estudo poderá constituir em uma importante abordagem para melhor entendimento da resposta à quimioterapia, cujos resultados se mostram pouco conclusivos e insatisfatórios em triagens terapêuticas realizadas em diferentes regiões geográficas, na maioria das vezes, sem conhecimento da genética do parasito.

2. *O*BJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto de infecções mistas na eficácia da quimioterapia com BZ em camundongos BALB/c infectados por clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais 20, 19, 39 e 32 (Tibayrenc & Brenière, 1988) comparando com suas respectivas monoinfecções.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar o efeito do tratamento com BZ nos parâmetros biológicos em animais infectados por misturas de *T. cruzi* de diferentes genótipos;

2.2.2 Verificar a eficácia das técnicas parasitológicas e sorológicas utilizadas como controle de cura em animais infectados por misturas de *T. cruzi* de diferentes genótipos tratados na fase aguda da infecção na detecção da infecção;

2.2.3 Comparar a eficiência das análises de isoenzimas e de microssatélites na diferenciação dos clones dos genótipos principais de *T. cruzi* e analisar a relação filogenética entre os mesmos estabelecida por meio dos resultados obtidos na PCR de microssatélites;

2.2.4 Identificar o(s) clone(s) do *T. cruzi* remanescentes nos camundongos tratados não curados e infectados não tratados com distintas combinações genotípicas do *T. cruzi*, empregando a eletroforese de isoenzimas e a PCR de microssatélites;

2.2.4.1 Em relação à técnica de microssatélites, verificar se o método de isolamento do parasito seleciona populações do *T. cruzi* por meio da comparação entre os resultados obtidos em amostras do parasito isoladas do sangue por hemocultura e aquelas obtidas diretamente do sangue e dos tecidos.

Adicionalmente, em virtude dos resultados encontrados na padronização das análises de isoenzimas e micossatélites:

2.5 Caracterizar o clone Cuica cl1 pelo perfil de isoenzimas e microssatélites em amostras obtidas após sua clonagem e manutenção por longo período em cultura acelular e em camundongos.

3. *A*NIMAIS, *M*ATERIAL E *M*ÉTODOS

3.1 Clones do Trypanosoma cruzi

Neste estudo, foram utilizados oito clones do *T. cruzi* representativos, dos genótipos principais descritos por Tibayrenc & Brenière (1988), selecionados com base em suas propriedades de virulência e susceptibilidade ao BZ, previamente avaliadas em camundongos BALB/c por Toledo *et al.* (2002, 2003). Em cada genótipo foram selecionados dois clones polares combinando essas duas características. No caso do genótipo 20, em que todos os clones foram 100% resistentes ao BZ, o critério de seleção usado foi apenas a virulência. (Tabela II).

Os clones do *T. cruzi* foram clonados por meio de micromanipulação em laboratório e gentilmente cedidos pelo Dr. Michel Tibayrenc em 2002. Ao chegar ao Laboratório de Doença de Chagas (UFOP), esses foram mantidos em crescimento exponencial em meio LIT (*Liver Infusion Triptose* - Camargo *et al.*, 1964), a 28ºC, para obtenção da massa úmida do *T. cruzi* e criopreservação dos parasitos em nitrogênio líquido (-196ºC). As massas úmidas foram conservadas a -70ºC para posterior obtenção do extrato enzimático e do DNA utilizados como padrões nas caracterizações moleculares. Uma alíquota da cultura também foi mantida em fase estacionária de crescimento para obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas. Essas formas foram inoculadas em camundongos albinos *Swiss* para a obtenção de formas tripomastigotas sangüíneas que foram utilizadas na inoculação dos grupos experimentais aqui estudados.

3.2 Animais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos BALB/c, isogênicos, fêmeas, com 28-30 dias de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. Esses animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto segundo as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), receberam água filtrada e foram alimentados com ração comercial balanceada. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brasil, protocolo nº 2007/77.

Tabela II. Características dos clones do *Trypanosoma cruzi* empregados nesse estudo.

[1]Classificação	[2]Genótipos	[2']Clones	Hospedeiros	Região, País	[3]Virulência	[4]Susceptibilidade Ao BZ
T. cruzi I	**19**	Gamba c1	*Didelphis azare*	São Paulo, Brasil	Maior	40%
		OPS21 cl11	Homem, fase aguda	Cojedes, Venezuela	Menor	100%
T. cruzi I	**20**	P209 cl1	Homem, fase crônica	Sucre, Bolívia	Maior	0%
		Cuica cl1	*Opossum cuica philander*	São Paulo, Brasil	Menor	0%
T. cruzi	**39**	Bug2148 cl1	*Triatoma infestans*	Rio Grande do Sul, Brasil	Maior	0%
		SO3 cl5	*Triatoma infestans*	Potosi, Bolívia	Menor	100%
T. cruzi II	**32**	IVV cl4	Homem, fase crônica	Brasília, Brasil	Maior	40%
		MAS cl1	Homem, fase crônica	Santiago, Chile	Menor	100%

1 Classificação filogenética do *T. cruzi* segundo Anonymous, (1999).
2 Genótipos principais e 2' clones naturais do *T. cruzi* descritos por Tibayrenc & Breniére (1988).
3 Virulência e 4 Susceptibilidade ao BZ em camundongos BALB/c determinada por Toledo *et al.*, (2002 e 2003), respectivamente.

3.3 Infecção dos Animais

Grupos de 16 camundongos foram utilizados na realização dos experimentos. Para as infecções monoclonais, os animais foram inoculados com 10.000 tripomastigotas sangüíneos do *T. cruzi* por animal, pela via intraperitoneal, sendo o inóculo quantificado segundo a técnica de Brener (1962) – Delineamento Experimental (Parte 1), pág. 50. Nas infecções mistas, foram utilizados 5.000 tripomastigotas sangüíneos de cada clone por animal. Os clones foram combinados aos pares resultando em 24 misturas de populações do *T. cruzi* (Tabela III) com níveis variados de susceptibilidade ao BZ e virulência em camundongos BALB/c (Toledo *et al.*, 2002, 2003) - Tabela II. Desse modo, quatro misturas de populações do *T. cruzi*, considerando diferentes associações dos padrões de virulência e de susceptibilidade ao BZ, foram avaliadas em cada uma das seis diferentes combinações genotípicas estudadas, comparativamente às suas respectivas monoinfecções.

Os animais inoculados foram alocados em dois grupos de oito animais, o primeiro foi destinado ao tratamento durante a fase aguda e o outro constituiu o grupo controle infectado e não tratado. Esses grupos foram avaliados concomitantemente durante a experimentação. A reprodutibilidade dos resultados foi avaliada pela repetição de um experimento das monoinfecções ou infecções mistas pertencentes aos diferentes genótipos e suas combinações.

Tabela III. Misturas de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais utilizados na infecção de camundongos BALB/c combinados segundo o padrão de virulência e susceptibilidade ao Benzonidazol.

Mistura de Genótipos	**Mistura de clones**			
	+ virulento/resistente e + virulento/ resistente	**- virulento/-resistente e - virulento/-resistente**	**- virulento/-resistente e +virulento/+resistente**	**+ virulento/+resistente e - virulento/-resistente**
20[1]+ 19	P209 cl1+Gamba cl1	Cuica cl1+OPS21 cl11	Cuica cl1+Gamba cl1	P209 cl1+OPS21 cl11
20+ 39	P209 cl1+Bug2148 cl4	Cuica cl1+SO3 cl5	Cuica cl1+Bug2148 cl1	P209 cl1+SO3 cl5 cl1
20 + 32	P209 cl1+IVV cl4	Cuica cl1+MAS cl1	Cuica cl1+IVV cl4	P209 cl1+MAS cl1
19+ 39	Gamba cl1+ Bug2148cl1	OPS21 cl11+SO3cl5	OPS21 cl1+Bug2148 cl1	Gamba cl1+SO3 cl5 cl1
19 + 32	Gamba cl1+IVV cl4	OPS21 cl11+MAS cl1	OPS21 cl11+IVV cl4	Gamba cl1+MAS cl1
39 + 32	Bug2148 cl1+IVV cl4	SO3 cl5+ MAS cl1	SO3 cl5+IVV cl4	Bug2148 cl1+MAS cl1

[1] Todos os clones do genótipo 20 foram 100% resistentes ao BZ e sua escolha foi baseada somente na virulência.

3.4 Tratamento

3.4.1 Fármaco e Esquema de Tratamento

O derivado nitroimidazólico Benzonidazol (BZ - Rochagan®, Basel, Suíca, Roche) foi utilizado para o tratamento dos animais infectados com clones do *T. cruzi*. Esse fármaco é classicamente empregado no tratamento da doença de Chagas. O tratamento com BZ foi iniciado no 10º dia de infecção, utilizando uma dose diária de 100mg por kg de peso corporal. O fármaco foi administrado por gavagem na forma de suspensão em goma arábica, durante 20 dias consecutivos. Todos os animais incluídos no estudo tiveram a infecção confirmada pela

detecção do parasito através do exame de sangue a fresco e quando necessário, por meio da hemocultura (Filardi & Brener, 1987).

3.5 Confirmação da infecção

Na confirmação da infecção dos animais inoculados com os diferentes clones ou suas combinações, foram utilizados o exame de sangue a fresco e, quando necessário, a hemocultura.

3.5.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF)

O exame de sangue a fresco foi empregado para a confirmação da infecção entre o 4º e 10º dia após a inoculação. Para esse exame, amostras de sangue foram coletadas diariamente da veia caudal do animal e examinadas ao microscópio óptico (aumento de 400 vezes) para pesquisa de formas tripomastigotas sangüíneas.

3.5.2 Hemocultura (Hc)

As hemoculturas foram realizadas no 10º dia após a inoculação nos animais cuja infecção não pôde ser comprovada por meio do ESF. A técnica foi realizada segundo a metodologia de Filardi & Brener (1987), sendo coletados aproximadamente 0,5 mililitros (mL) de sangue do seio venoso retro-orbital. Essas amostras foram distribuídas em dois tubos de sedimentação contendo 3mL de meio de cultura LIT, incubadas a 28°C e homogeneizadas a cada 48h. Para detecção do parasito, uma gota da hemocultura foi examinada ao microscópio óptico no 30º, 60º, 90º e 120º dias após cultivo.

3.6 Análise da Eficácia do Tratamento com Benzonidazol em Infecções Mistas e Monoinfecções por Clones do Trypanosoma. cruzi *Considerando Diferentes Parâmetros Biológicos*

Os parâmetros avaliados e os testes estatísticos utilizados para análises comparativas dos dados obtidos para as monoinfecções e infecções mistas e, dos grupos tratados e não tratados, estão descritos abaixo. Todos os testes foram realizados utilizando o programa SPSS

12.0. As diferenças foram consideradas como significativas quando o *P* (nível de significância) foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$), adotando o intervalo de confiança de 95%.

3.6.1 Parasitemia

O número de tripomastigotas sangüíneos em amostras de sangue coletadas da veia caudal dos animais foi determinado utilizando a metodologia de Brener (1962). A contagem foi realizada diariamente, a partir do quarto dia de infecção até a negativação por cinco dias consecutivos. Entretanto, os clones com baixa virulência foram acompanhados pelo menos por 30 dias após a infecção. A curva de parasitemia foi plotada utilizando a média diária da parasitemia dos animais. Os seguintes parâmetros foram determinados: (1) nível parasitêmico (PAR); (2) período patente (PP); (3) pico máximo de parasitemia (PMP) e (4) dia do pico máximo de parasitemia (DPMP).

Os PAR(s) foram analisados pelo teste não-paramétrico de KOLMOGOROV-SMINNORV que compara a área sob a curva entre duas amostras e os dados expressos em número de tripomastigotas sangüíneos totais, detectados durante o período de avaliação. O PP, PMP e DPMP foram analisados pelo teste ANOVA Oneway, seguido do teste de NEWMAN-KEULS. Em alguns casos, quando a variância foi heterogênea, foi utilizado o teste de MANN-WHITNEY.

3.6.2 Mortalidade

Os animais foram acompanhados diariamente e a mortalidade registrada do 10º ao 90º dia após a infecção. A taxa de mortalidade (MOR) foi calculada considerando a mortalidade cumulativa no período avaliado e expressa em porcentagem. Os dados foram comparados entre as monoinfecções e as infecções mistas e, entre os grupos infectados tratados (IT) e infectados não tratados (INT) por meio do teste EXATO de FISHER.

3.6.3 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol

3.6.3.1 Testes Empregados no Controle de Cura

3.6.3.1.1 Avaliações Parasitológicas

3.6.3.1.1.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF)

O ESF foi empregado no controle de cura após tratamento entre o 31º e 60º dia e realizado como descrito no item 3.5.1.

3.6.3.1.1.2 Hemocultura (Hc)

As Hc(s) foram realizadas aos 30 dias após o término do tratamento para o controle de cura dos animais como descrito no item 3.5.2. As hemoculturas positivas foram mantidas em crescimento exponencial em meio LIT para a obtenção da massa úmida do *T. cruzi* como descrito no 3.7.1.1.1.

3.6.3.1.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi também realizada para o controle de cura dos animais após o tratamento em amostras de DNA extraídas de sangue coletado trinta dias após o tratamento.

3.6.3.1.1.3.1 Extração de DNA de Sangue

Para a obtenção de DNA, alíquotas de 200 microlitros (μL) de sangue foram coletadas do plexo venoso retro-orbital no 30º dia após o término do tratamento. O sangue foi conservado em 400μL de solução de cloridrato de guanidina (Guanidina-HCl) 6M/ácido etilenodietildinitritoteracético (EDTA) 0,2M/pH 8,0 como descrito por Ávila *et al.* (1991). Essa mistura de sangue/Guanidina-HCl/EDTA foi fervida sete dias após a coleta, a 100º C, durante 7 minutos (min). O lisado foi estocado à temperatura ambiente (Ávila *et al.*, 1991). A extração de DNA foi realizada pela metodologia proposta por Gomes *et al.*, (1998) com algumas modificações. Resumidamente, o DNA foi extraído de 100μL do lisado de sangue com volumes iguais de fenol-clorofórmio (1:1 v/v), clorofórmio (1:1 v/v) e precipitado com solução de acetato de sódio 3M/pH 5,2 e etanol absoluto (1:2 v/v), e uma de lavagem com

120μL de etanol a 70%. O DNA precipitado foi ressuspendido em 10μL de água milli-Q e conservado a 4°C.

3.6.3.1.1.3.2 Amplificação específica do KDNA do *T. cruzi*

A amplificação foi processada de acordo com o protocolo de Gomes *et al.* (1998) modificado. A mistura reacional continha 10mM de cloridrato de hidroximetilaminometano (Tris-HCl)/pH 9,0; 0,1% de Triton X-100 (Tampão 10x, Invitrogen São Paulo, SP, Brasil); 75mM de cloreto de potássio (KCl - Tampão 10x , Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 3,5mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$ – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma, St. Louis, MO, EUA); 0,5U de *Taq* Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 10pmoles de cada iniciador S35 (5'AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA3') e S36 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA3'), descritos por Ávila *et al.*, 1991 e sintetizados pela Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 2,0μL da amostra extraída do sangue; e, água Milli-Q suficiente para 11μL. A mistura foi coberta com 20μL de óleo mineral para evitar evaporação e a amplificação foi processada em um termociclador PTC-150 (MJ Research, Ramsey, MA, EUA) nas seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 5min, seguida de 35 ciclos de amplificação constituídos de um passo de desnaturação a 95ºC por 1min, um de anelamento a 65°C por 1min e um de extensão a 72°C por 1min, finalizando com uma etapa de extensão a 72ºC por 10min. O DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelado com NaOH e formaldeído após a coloração pela prata (Santos *et al.*, 1993).

Controles positivos, negativos e de reagentes foram incluídos em cada um dos ensaios realizados. A presença de inibidores nas amostras negativas foi avaliada por adição de 100fg de DNA do *T. cruzi* em 30 amostras que apresentaram resultados negativos, selecionadas aleatoriamente e submetidas a uma nova PCR.

3.6.3.1.2 Avaliações Sorológicas

3.6.3.1.2.1 Sorologia Convencional pela ELISA (ELISA)

A técnica de ELISA foi utilizada como controle de cura após tratamento para detecção de Imunoglobulina G total (IgG) de acordo com a metodologia estabelecida por Voller *et al.* modificada, (1976). Para tal, as amostras de soro foram coletadas aos dois (90º d.a.i.) e três meses (120º d.a.i.) após o término do tratamento e armazenadas a −20ºC. Amostras do grupo dissociado foram também coletadas aos seis meses após término do tratamento (240º d.a.i.) .

Os soros foram testados na diluição 1:80 utilizando solução tampão fosfato contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Em todas as etapas foi utilizado um volume de 100µl da amostra ou do reagente correspondente a cada etapa e as incubações foram realizadas a 37^{0}C. O antígeno foi obtido por extração alcalina de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* mantidas em crescimento exponencial em meio LIT. As placas de fundo chato com 96 poços foram previamente sensibilizadas 18 a 24h antes da realização do ensaio utilizando solução antigênica do *T. cruzi* contendo 4,5µg proteína/mL preparada com solução tampão carbonato/pH 9,6. Após a sensibilização, as placas foram submetidas a quatro lavagens sucessivas com PBS-T seguida de uma etapa de incubação por 30min com solução tampão fosfato contendo 10% de soro fetal bovino (PBS-10% SFB). Os soros testes foram adicionados e, decorridos 45min de incubação, as placas foram novamente submetidas a quatro lavagens sucessivas com PBS-T. A ligação do anticorpo foi determinada utilizando anti-imunoglobulina G de camundongo marcado com a enzima peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na diluição de 1:5.000 e do emprego de PBS-T. As placas foram novamente incubadas por 45min e posteriormente lavadas quatro vezes com PBS-T. Como substrato para a enzima foi utilizado solução de ortofenilenodiamino (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na presença de peróxido de hidrogênio (0,03% de ortofenilenodiamino e 0,012% de peróxido de hidrogênio em solução tampão fosfato-citrato 0,1M/pH 5,0). As placas foram incubadas por 20min em ambiente escuro e a reação foi interrompida com 32µL de solução de ácido sulfúrico 2M. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas da BIO-RAD, modelo 3550 (Hercules, San Diego, CA, EUA), utilizando filtro de 490nm. A absorbância discriminante de soros reativos e não reativos foi calculada pela absorbância média de dez soros não reativos somada ao dobro do desvio padrão. Em cada placa, foram adicionadas amostras de soro controles obitdas de animais infectados e não infectados pelo *T. cruzi*.

3.6.3.1.2.2 Sorologia Não Convencional para Pesquisa de Anticorpos Antitripomastigotas Vivo pela Citometria de Fluxo (AATV)

A pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos por meio da citometria de fluxo foi realizada em amostras de soro coletadas três meses após o término do tratamento, segundo a metodologia de Martins-Filho *et al.*, (1995) adaptada para microplacas por Cordeiro *et al.*, (2001). Formas tripomastigotas vivas da cepa CL do *T. cruzi* (500 células), coletadas do sobrenadante das culturas de células "*Vero*", foram incubadas a 37^0C, durante 45min, na presença de amostras de soro diluídas a 1:1.500 em solução tampão fosfato contendo 10% de soro fetal bovino (PBS-10% SFB). Após a incubação, os parasitos foram lavados uma vez com PBS-10% SFB. A suspensão de parasitos foi novamente incubada a 37^0C, por 30min, juntamente com o conjugado anti-IgG, de camundongo, marcado com isoticianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis MO, EUA) diluído a 1:5.000. Os parasitos marcados com fluoresceína foram lavados com solução de PBS-10% SFB e fixados com uma solução contendo 10g paraformaldeído e 6,65g de cloreto de sódio por litro, 1% de cacodilato de sódio e 0,01% de azida sódica em pH 7,2, em gelo, por 30 minutos. As medidas no citômetro de fluxo (Becton Dickinson FACScalibur, San José, CA, EUA) e o programa CellQuest foram usados para a análise dos dados. As formas tripomastigotas foram identificadas considerando seu tamanho e granulosidade. A intensidade relativa de fluorescência para cada preparação de parasitos, depois da incubação com cada soro, foi analisada usando um histograma. Uma marcação foi feita internamente como controle para eliminar ligações inespecíficas de anticorpo e usada para determinar a porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP).

As amostras de soro foram consideradas positivas ou negativas quando a PPFP foi maior ou menor que 20%, respectivamente. Amostras de soro obtidas de animais infectados e não infectados foram incluídas em todas as análises como controles internos das reações.

3.6.3.2 Critério de Cura

A resistência ou susceptibilidade ao BZ foi definida de acordo com os resultados obtidos pelos métodos parasitológicos e sorológicos.

Desse modo, a resistência ao BZ foi determinada baseada na positividade de pelo menos um método parasitológico e positividade de ambos os testes sorológicos. Animais com esses resultados foram considerados tratados não curados (TNC). A susceptibilidade ao BZ foi determinada pela negativação dos testes parasitológicos e sorológicos. Animais nessa

situação foram considerados tratados e curados (TC). Aqueles que apresentaram testes parasitológicos e AAAT negativos, mas ELISA positiva foram classificados como dissociados (DIS) e considerados curados segundo o critério proposto por Krettli & Brener (1982). Um número representativo de animais do grupo infectado e não tratado (INT), bem como de animais não infectados (NI), foram também avaliados concomitantemente para validação do critério de cura adotado.

Os resultados da densidade óptica (DO), obtidos na ELISA e a PFPF obtidas na AATV entre os grupos INT, TNC, DIS, TC e NI, foram comparados utilizando o teste de análise de variância ANOVA ONEWAY, seguido pelo teste de NEWMAN-KEULS. As porcentagens de positividade obtidas pelos diferentes métodos empregados no controle de cura foram comparadas pelo teste de CHI-QUADRADO. A concordância entre os métodos parasitológicos e sorológicos foi verificada através de índice de KAPPA utilizando o COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO KAPPA.

3.6.3.3 Comparação dos Perfis de Susceptibilidade ao BZ

A avaliação do perfil de susceptibilidade ao BZ foi realizada considerando três níveis de subdivisão genética do *T. cruzi*: (1) as Linhagens do *T. cruzi* (*T. cruzi* I, *T. cruzi* e *T. cruzi* II), (2) os genótipos principais do *T. cruzi* (genótipos 20, 19, 39 e 32) e (3) clones do *T. cruzi* utilizados nas monoinfecções e infecções mistas. Essa abordagem foi escolhida para possibilitar a análise comparativa com os dados demonstrados por Toledo *et al.* (2003), quando estudaram estes clones.

Duas análises foram consideradas: (1) a comparação entre os índices de cura observados nos diferentes grupos experimentais e (2) entre os índices de cura observados e esperados para cada infecção mista.

O índice de cura observado (ICO) foi calculado para o grupo experimental considerando a razão entre o número de animais tratados curados (TC) e o número total de animais infectados tratados (IT) multiplicado por 100.

Tomando como premissa que a susceptibilidade ao BZ é uma característica das populações do *T. cruzi* se mantidas as mesmas condições de experimentação, o índice de cura esperado (ICE) foi estimado baseado na hipótese nula de que durante a infecção mista um clone do parasito não interfere no perfil de susceptibilidade ao BZ do outro clone. Desse modo, a taxa de cura esperada para uma infecção mista, sempre refletirá a taxa de cura do clone mais resistente dessa mistura. Quando os perfis de susceptibilidade ao BZ das

monoinfecções ou infecções mistas foram comparados considerando o nível de linhagens ou genótipos do *T. cruzi*, o índice de cura global esperado foi estimado pela média dos índices de cura esperados para cada uma das combinações do *T. cruzi* dentro das respectivas subdivisões.

Após a determinação dos índices de cura, o perfil de susceptibilidade de cada monoinfecção ou infecção mista foi determinado baseado na classificação de Filardi & Brener (1987) em: (1) resistentes ao BZ (IC ≤ 33%), (2) parcialmente susceptíveis (33% < IC ≤ 66%) e (3) susceptíveis (IC > 66%).

Os dados obtidos foram expressos em porcentagem e comparados por meio do teste de CHI-QUADRADO ou teste EXATO DE FISHER.

3.6.4 Análise da Freqüência de Positividade do kDNA nos Tecidos

A freqüência de positividade do kDNA foi avaliada em seis tecidos: (1) coração, (2) músculo esquelético, (3) baço, (4) cólon, (5) bexiga e (6) cérebro. Os dados foram expressos em porcentagem de positividade e analisados considerando cada tecido e as combinações genotípicas estudadas. Para a comparação dos dados entre os diferentes grupos e fases da infecção foi empregado o teste de CHI-QUADRADO ou o teste EXATO DE FISHER

A PCR em tecidos foi inicialmente realizada com o objetivo de selecionar os tecidos positivos para o kDNA do *T. cruzi* para serem posteriormente utilizados na análise de microssatélites, objetivando identificar o(s) clones remanescentes nos animais após a infecção mista e/ou tratamento. No entanto, isso foi feito apenas nos tecidos de animais infectados com as diferentes misturas estudadas, uma vez que os tecidos dos animais com monoinfecção não foram coletados para esse tipo de análise.

3.6.4.1 Necropsia dos Animais

Dois animais de cada grupo experimental foram eutanaziados entre o 30º - 35º (fase aguda: FA) e entre o 120º -125º dias após infecção (fase crônica: FC). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os tecidos coletados foram lavados exaustivamente com PBS estéril, secos em papel absorvente, recortados em fragmentos de aproximadamente 5mm e armazenados a -70ºC. Para a preservação dos tecidos todas as etapas foram realizadas em banho de gelo. Após o processamento de cada um dos fragmentos, o material cirúrgico foi higienizado em solução de hipoclorito de sódio a 2%, lavado com PBS e seco.

3.6.4.2 Extração de DNA em Tecidos e PCR

A extração de DNA em tecidos foi realizada pela técnica de lise alcalina, empregando o protocolo de Vago *et al.* (1996) com algumas modificações. Cada fragmento de tecido foi macerado em tubo de microcentrifugação de 1,5mL nos qual foram acrescentados 119μL de água milli-Q estéril e 6μL de hidróxido de sódio 50mM. A mistura foi agitada vigorosamente, acrescida de 237μL de óleo mineral para evitar evaporação e submetida à ebulição por 10min. A seguir, o lisado foi neutralizado com 20μL de Tris-HCl 1M/pH 8,0, agitado e centrifugado rapidamente. A camada intermediária foi coletada, diluída na proporção de 1:10 em água milli-Q estéril e armazenada a -20ºC.

A reação de amplificação do DNA foi realizada como descrita no item 3.6.3.1.1.3 utilizando 4,0 μL do lisado celular e água milli-q suficiente para obter um volume final 11 μL.

3.7 Identificação das Populações do Trypanosoma cruzi Presentes nas Amostras Biológicas de Camundongos BALB/c Infectados por Combinações de Clones Pertencentes aos Genótipos Principais

Os isolados do *T. cruzi* recuperados de animais TNC e INT por meio da hemocultura realizada no 60º d.a.i. foram identificados pelo perfil eletroforético de isoenzimas e microssatélites. A análise de microssatélites foi realizada também em amostras de DNA obtidas de sangue e tecidos positivos para o fragmento de 330pb do kDNA do *T. cruzi*. Como citado no item 3.1, os clones do *T. cruzi* foram descongelados e imediatamente mantidos em crescimento exponencial em meio LIT para a obtenção da massa úmida. Essa foi conservada a -70ºC e posteriormente submetida à extração enzimática e à obtenção do DNA que foram utilizados como padrões nas caracterizações moleculares (Delineamento Experimental Parte 2, pág. 51).

3.7.1 Identificação dos Isolados do *T. cruzi* Recuperados pela Hemocultura

3.7.1.1 Análise Isoenzimática

Nesse estudo, quatro sistemas enzimáticos foram testados incluindo a glicose fosfato isomerase (GPI, E.C. 5.3.1.9); fosfoglicomutase (PGM, E.C. 5.4.2.2); glicose-6-fosfato

desidrogenase (G6PD, E.C. 1.1.1.44) e isocitrato desidrogenase (IDH, E.C. 1.1.1.42). As amostras isoladas dos animais infectados (INT) e tratados não curados (TNC) foram comparadas com seus respectivos padrões e analisadas na mesma corrida eletroforética.

3.7.1.1.1 Obtenção da Massa Úmida do *T. cruzi* e do Extrato Enzimático

As hemoculturas positivas foram mantidas em crescimento exponencial em meio LIT até a obtenção de aproximadamente 35,0mL de cultura. A cultura foi transferida para tubos de sedimentação e centrifugada a 3.500rpm, a 4ºC, por 30 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente por inversão, e o sedimento lavado duas vezes com 10mL de PBS estéril por centrifugação nas mesmas condições anteriores por 15min. O sedimento foi transferido para um tubo de microcentifugação previamente pesado. Nova lavagem desse sedimento, com PBS estéril, foi feita, seguida de centrifugação a 10.000rpm por 10min. O sobrenadante foi eliminado cuidadosamente, o tubo foi novamente pesado e a massa úmida obtida foi armazenada a -70ºC para posteriores exames moleculares.

A massa úmida de parasitos foi submetida à extração enzimática segundo Kilgour e Godfrey (1976). Para obtenção do extrato enzimático, a massa úmida do *T. cruzi* foi descongelada em banho de gelo e submetida à lise osmótica em presença de estabilizador enzimático (2,0mM Ditiotreitol, 2,0mM ácido ε-amino capróico, 2,0mM EDTA/pH 7,0) na proporção de 1:1 (p/v=mg/μL) da solução. O lisado foi centrifugado a 10.000rpm, a 4ºC, durante 20min. O sobrenadante foi aliquotado e armazenado a -70ºC. O sedimento também foi armazenado a -70º para posterior obtenção de DNA o qual foi utilizado na análise de microssatélites.

3.7.1.1.2 Eletroforese de Isoenzimas e Revelação

A eletroforese de isoenzimas foi realizada segundo metodologia de Ben Abderrazak *et al.* (1993), em sistema horizontal, sob refrigeração (Helena, Beaumont, Texas, EUA), utilizando membrana de acetato-celulose (Helena, Beaumont, TE, EUA). As membranas foram submersas, durante 20min, em tampão de eletroforese específico para cada sistema enzimático estudado. As enzimas foram depositadas sobre a superfície da membrana de celulose com auxílio de um aplicador (Helena, Texas, EUA), concentradas ou diluídas, dependendo do sistema enzimático. As membranas foram colocadas entre os eletrodos, e fitas de papel de filtro foram utilizadas para fazer a ponte entre a membrana e o tampão de

migração contido nos compartimentos da cuba eletroforética. As condições da eletroforese e os reagentes usados na reação encontram-se descritos na Tabela IV. Todas as enzimas apresentam migração anódica. Após a eletroforese, as bandas protéicas foram visualizadas através de reações bioquímicas específicas, utilizando a mistura reacional contendo todos os reagentes necessários à atividade da enzima acrescida de agente revelador. Após a revelação, a reação foi interrompida com solução de ácido acético 5% e as membranas foram lavadas em água destilada, fotografadas e, posteriormente, analisadas no programa Photocapt.

Tabela IV. Condições eletroforéticas e de revelação usadas para os sistemas enzimáticos estudados.

Glicose-6-fosfato isomerase **EC.5.3.1.9** **GPI**		**Fosfoglicomutase** **EC.5.4.2.2** **PGM**	
Extrato: concentrado		Extrato: concentrado	
Tampão de embebeção: ShawIII* (1:4)[1]		Tampão de embebeção: Kreutzer§ (1:4)[1]	
Tampão de migração: Shaw III		Tampão de migração: III Kreutzer(1:1)	
Voltagem: 200V		Voltagem: 200V	
Tempo: 25 minutos		Tempo: 20 minutos	
*Mistura reacional:	5,0mg de frutose 6-fosfato 4,6U de G-6-P DH $Mgcl_2$ 15mM 5,0mg de NADP 3,0mg de MTT 2,5mg de PMS Temperatura ambiente Tris-HCl 0,2M, pH 7 10% de agar	*Mistura reacional:	10mg α D-glicose-1-fosfato 15U G-6-P DH $Mgcl_2$ 15mM 5,0mg de NADP 3,0mg de MTT 2,5mg de PMS Temperatura ambiente Tris-HCl 0,2M, pH 7 10% de ágar
Glicose-6-fosfato-1-desidrogenase **EC.1.1.1.49** **G6PD**		**Isocitrato desidrogenase** **EC.1.1.1.42** **ICD**	
Extrato: concentrado		Extrato: concentrado	
Tampão de embebeção: HR		Tampão de embebeção: Shaw III (1:4)[1]	
Tampão de migração: HR		Tampão de migração: Shaw III	
Voltagem:	200V	Voltagem:	200V
Tempo	20 minutos	Tempo	20 minutos
*Mistura reacional	10mg de D-glicose-6-P $Mgcl_2$ 15mM 5,0mg de NADP 3,0mg de MTT 2,5mg de PMS Temperatura ambiente Tampão Tris-HCl pH 7 0,2M	*Mistura reacional:	10mg ácido Isocítrico DL $Mgcl_2$ 15mM 5,0mg de NADP 3,0mg de MTT 2,5mg de PMS Temperatura ambiente Tampão Tris-HCl pH 7 0,2M

Descrição dos Tampões

* Shaw III: 0,15M Tris, 0,043M ácido cítrico/pH 7,0

§ Kreutzer II: 0,2M fosfato/pH 7,0

¨ HR (Eletra HR Tampão; Helena, Beaumont, TE, EUA): Tris-Barbital, barbital sódico/pH 9,0

G6PD: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase. NADP: Nicotinamida Adenina Difosfato. MTT: Brometo de 3-{4,5-Dimetiltiazol-2-1}-2,5Difeniltetrazolium. PMS: sulfato de fenazina. [1]: tampão diluído em água (v/v). *Para preparação da solução reveladora o ágar foi aquecido no microondas com o tampão de cloridrato de hidroximetilaminometano (Tris-HCl), resfriado em água corrente e adicionado ao restante do revelador. A mistura reacional foi vertida sobre a membrana.

3.7.1.2 Análise de Microssatélites

3.7.1.2.1 Extração de DNA Total do Sedimento Proveniente da Massa Úmida do *T. cruzi*

O DNA do *T. cruzi* foi extraído do sedimento restante após obtenção do extrato enzimático, segundo o protocolo de Tibayrenc *et al.* (1993) que inclui três etapas. Na primeira etapa, foi promovida a lise celular do sedimento, empregando 200μL de tampão de lise (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA/pH 8,0), 1% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 100μg/mL de proteinase K. A mistura foi agitada, vedada com parafilme e colocada em banho-maria, a 55ºC, por 12h. Na segunda etapa, foi realizada a desproteinização da amostra utilizando duas extrações fenólicas, seguidas de duas extrações com clorofórmio. Os solventes foram adicionados na proporção de 1:1 (v/v) e a mistura homogeneizada por 5min e centrifugada a 10.000rpm durante 7 min, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi coletada e o DNA submetido à precipitação pela adição de um volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 correspondente a 10% do volume total e duas vezes o volume de etanol absoluto gelado. A mistura foi submetida à refrigeração, a -70ºC, por duas horas, centrifugada a 10.000rpm, por 15 min, a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em 100μL de água milli-Q estéril e estocado a -20ºC.

A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria com as leituras realizadas a 260nm. A concentração foi calculada a partir da densidade óptica (DO) considerando a relação de que uma unidade de DO é correspondente a 50μg DNA/μl. A leitura da absorbância a 280nm foi realizada para a detecção de proteínas e a pureza da amostra foi avaliada pela razão entre as densidades ópticas observadas a 260 e 280nm. Para sua utilização nas análises de microssatélites, as amostras de DNA foram diluídas na concentração de 1,0ng/μL.

3.7.1.2.2 PCR de Microssatélites

A reação de PCR foi realizada segundo a metodologia descrita por Valadares *et al.* (2008) em um volume total de 15μL, contendo 10mM Tris-HCl/pH 9,0; 50mM de KCl, 0,1% de Triton X-100 (Tampão B, Promega, Madison, WI, EUA); 2,5mM de $MgCl_2$ (Promega, Madison, Wiscosin, EUA); 0,5U *Taq* DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EUA);

250μM de cada dNTP (Sigma, Sto. Louis, MO, EUA); 0,3μM de cada iniciador (ALPHA DNA, Montreal, Quebec, Canadá) e 3,0μL da solução de DNA a 1,0ng/μL. As misturas foram cobertas com óleo mineral para evitar evaporação. As seqüências dos iniciadores estão descritas na Tabela V. Em todos os casos, um dos iniciadores internos do par foi marcado com fluoresceína na sua extremidade 5´.

As amplificações foram realizadas em termociclador, MJ Research, modelo PT100 (MJ Research, Inc., Ramsey, MA, EUA), utilizando o programa "*stepdown*" (Hercker & Roux, 1996) modificado para a amplificação de DNA do *T. cruzi*. O programa de amplificação contém uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos com um passo de desnaturação a 94°C por 30seg; um passo de anelamento a 55°C por 30seg; e, um passo de extensão de 30seg a 72°C. A cada cinco ciclos, a temperatura de anelamento foi diminuída 2°C até atingir 48°C, quando o o número de ciclos foi estendido para 15. A extensão foi realizada a 72°C por 5min. As seqüências dos iniciadores utilizados para a amplificação estão descritas na Tabela V, sendo o iniciador direto marcado com fluoresceína na sua extremidade 5'.

Tabela V. Seqüência de nucleotídeos usados como iniciadores para amplificar os locos de microssatélites do *Trypanosoma cruzi* empregados nesse estudo

Iniciador	Seqüência
TcAAT8-d	5'-FluoresceínaACCTCATCGGTGTGCATGTC-3'
TcAAT8-r	5'-TATTGTCGCCGTGCAATTTC-3'
TcAAT8ex-d	5'-AGAGGCGCACAGTTGTATGC-3'
TcAAT8ex-r	5'-GACGCTTTATGTTGAATTCA-3'
TcATT14-d	5'-FluoresceínaTTATGGATGGGGTGGGTTTG-3'
TcATT14-r	5'-AGCAATAATCGTATTACGGC-3'
TcATT14ex-d	5'-TTTGCAAATGGGACAGTTAC-3'
TcATT14ex-r	5'-ACCTATTTTGCTCCTTGGTG-3'
TcCAA10-d	5´-FluoresceinGCACAGGGAGTCAAACTTCA-3´
TcCAA10-r	5´-TCAAATTTATCACCCGTCGA- 3´
TcCAA10ex-d	5'-GGTAAGGGCGAGTATGACTG-3'
TcCAA10ex-r	5'-TAGCCAATAAAAGTGATGCC-3'
TcGAG10-d	5'-FluoresceínaTTCTCGGCTTCTATGTGTGC-3'
TcGAG10-r	5'-GTGCCCTCCGTTTATTCCTC-3'
TcGAG10ex-d	5'-TTTCTTACTGCGAGGTGAGT-3'
TcGAG10ex-r	5'-AAGTGAAGTGAAGTGGTGCC-3'
TcTAC15-d	5´-FluoresceínaGAATTTCCCCATTTCCAAGC-3'
TcTAC15-r	5´-CGATGAGCAACAATCGCTTC-3'
TcTAC15ex-d	5'-GGATATTTGTTACTGCTGGC-3'
TcTAC15ex-r	5'-CGGACATATCCCTCTAGTCG-3'
TcTAT20-d	5'-FluoresceínaGATCCTTGAGCAGCCACCAA-3'
TcTAT20-r	5'-CAAATTCCCAACGCAGCAGC-3'
TcTAT20ex-d	5'-AGGCTGATCCTTGAGCAGCC-3'
TcTAT20ex-r	5'-CGGCGGTCTTCTTTTGTCTC-3'
TcAAAT6-d	5'-FluoresceínaGCCGTGTCCTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6-r	5'-GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG-3'
TcAAAT6ex-d	5'-ACGCACTCTCTTTGTTAACAG-3'
TcAAAT6ex-r	5'-CACATACACATTCCAATGGTT-3'
SCLE10-d	5'-FluoresceínaGATCCGCAATAGGAAAC-3'
SCLE10-r	5'-GTGCATGTTCCATGGCTT-3'

d – iniciador direto; r – iniciador reverso; ex: inicador externo.

3.7.1.2.3 Determinação do Tamanho dos Alelos de Microssatélites

Cinco microlitros dos produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, a 100 volts, por aproximadamente duas horas. Após a eletroforese, os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após coloração com nitrato de prata segundo o protocolo descrito por Santos *et al.*, (1993). Os produtos amplificados foram submetidos a uma nova eletroforese realizada em condições desnaturantes no seqüenciador automático de DNA (Healthcare, Milwaukee, WI, EUA) para determinação do tamanho dos

alelos de microssatélites em pares de bases (pb). Uma alíquota de um a 3,0µl do produto da PCR foi desnaturada a 90°C por três minutos e, submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (Uréia 8M) a 50°C, durante 10h. Nas corridas eletroforéticas, foram utilizadas como padrões externos, escalas alélicas contendo uma mistura de fragmentos fluorescentes de pesos moleculares variando de 50 em 50pb, (GE Healthcare, Milwaukee Milwaukee, WI, EUA), na concentração de 5,0fmol por fragmento. Na preparação das amostras foram incluídos os padrões externos e acrescentados fragmentos fluorescentes de tamanhos conhecidos (75, 155, 210 e 322pb) utilizados como padrões internos nas corridas. Os resultados foram obtidos em forma de cromatogramas e analisados com o auxílio do programa de computador "Allelocater" (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA).

3.7.1.2.4 Padronização da Análise de Microssatélites para os Clones do *T. cruzi* Pertencentes aos Genótipos Principais

A análise de microssatélites foi realizada primeiramente nas amostras de DNA obtidas de clones do *T. cruzi*, usando oito locos (TcAAT8, TcATT14, TcCAA10, TcGAG10, TcTAC15, TcTAT20 TcAAAT6 e SCLE10) entre os quais foram selecionados aqueles capazes de distingui-los nas infecções mistas. Esses locos foram posteriormente utilizados na identificação dos isolados do *T. cruzi* obtidos de animais tratados e dos controles não tratados.

O tamanho, em pares de base, dos alelos detectados para cada loco de microssatélites obtido na caracterização dos diferentes clones, foi utilizado para estudar a relação filogenética entre os mesmos. A construção das árvores filogenéticas foi realizada utilizando o pacote de programas PHYLIP ("*Phylogeny Inference Package*") versão 3.67 (Felsenstein, 2007). Cada alelo de microssatélite foi considerado como um estado particular de um carácter discreto com múltiplos estados possíveis. Considerando que a evolução de microssatélites segue o modelo de mutação de um passo, um alelo com n repetições muda para o alelo n + 1 ou n - 1 (Valdes *et al.*, 1993; Shriver *et al.*, 1993). Além disso, o alelo mais freqüente foi considerado como o estado ancestral e, os alelos difererindo apenas por uma unidade de repetição foram ordenados de forma adjacente, através de letras. Desse modo, o alelo mais freqüente (d) poderia dar origem aos alelos adjacentes (c), com uma unidade repetitiva a menos ou (e) com uma unidade repetitiva a mais e, assim, sucessivamente.

Os dados obtidos foram submetidos ao programa FACTOR que transformou os dados de caracteres discretos com múltiplos estados, em caracteres com apenas dois estados

representados por 0 ou 1. O arquivo obtido através desse programa foi inserido em seguida no programa MIX para determinação dos agrupamentos entre as amostras pelo método de Wagner. A estratégia do programa MIX para adquirir a árvore ou árvores mais parcimoniosas baseia-se em adição e rearranjos de cada OTU (Unidade Taxonômica Operacional). À medida que cada OTU vai sendo adicionada, todas as topologias possíveis são avaliadas, uma após a outra, e as mais prováveis são selecionadas. A distância genética entre os clones foi calculada como sendo o número de mutações necessárias para a transformação de um clone em outro e, o programa TREEVIEW, versão 1.6.1 (PAGE, 1996) foi utilizado para a construção da rede de Wagner, sem raiz. Os níveis de significância de cada ramificação na rede de Wagner foram realizados por bootstrapping (100 reinterações) usando o programa SEQBOOT do pacote de programas PHYLIP.

3.7.1.2.4.1 Avaliação da Sensibilidade dos Locos de Microssatélites para Detecção dos Clones do *T. cruzi* nas Infecções Mistas

Para verificar a sensibilidade dos locos de microssatélites em detectar os clones nas diferentes combinações genotípicas foram realizadas misturas teóricas de DNA contendo diferentes concentrações de DNA de genótipos distintos a partir de uma solução original de 1ng/μL de cada clone. A Tabela VI mostra as misturas teóricas realizadas.

Tabela VI. Misturas teóricas de clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos distintos utilizadas na padronização da análise de microssatélites.

Clones	Misturas Teóricas (Porcentagem de X:Y)						
	A	B	C	D	E	F	G
Clone X	100%	90%	75%	50%	25%	10%	0%
Clone Y	0%	10%	25%	50%	75%	90%	100%

3.7.1.2.4.2 Análises Adicionais do Clone Cuica cl1

Considerando que os resultados obtidos na caracterização individual dos oito clones do *T. cruzi* aqui estudados revelaram que o clone Cuica cl1 apresentou características de população policlonal, o estudo prosseguiu realizando análises adicionais nessa população.

3.7.1.2.4.2.1 Clonagem de Células do Clone Cuica cl1 do *T. cruzi*

3.7.1.2.4.2.1.1 Obtenção de Células do Clone Cuica cl1 para Separação em "*FASC Cell Sorter*"

Aproximadamente, 1,5mL de cultura do *T. cruzi* crescida em meio LIT, contendo 10^6 células móveis e sem formação de massas, foram transferidos para um tubo siliconado de 16x100mm (Vacutainer, Itupeva, SP, Brasil), sem aditivos. A cultura foi centrifugada a 400rpm, por 10min, a 4°C, em centrífuga Himac CR 21 (Hitachi) para separação das células intactas dos debris celulares presentes na cultura, sendo essa deixada em repouso por 10min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e submetido a uma série de três lavagens utilizando 1,0mL PBS esterilizado por filtração, empregando filtro de 0,22μM Millex GV (Millipore, MA, EUA). A cada lavagem o sedimento foi ressuspendido, homogeneizado cuidadosamente por inversão e centrifugado a 2.200rpm, a 4°C, por 10min.

Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspendido e transferido para um outro tubo contendo 500μL de etanol absoluto mantido a -20°C. As células foram deixadas por 30min no gelo, para fixação e, após este período, o tubo foi submetido à centrifugação a 2.200rpm, por 10min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1,0mL de PBS. A solução de células fixadas foi armazenada a 4°C até a manhã seguinte quando foi submetida à separação no aparelho "*FACS Vantage Cell Sorter*" (Becton Dickinson, San José, CA, EUA).

3.7.1.2.4.2.1.2 Separação das Células Únicas do Clone Cuica cl1 do *T. cruzi* em "*FACS Vantage Cell Sorter*"

Uma pequena alíquota da solução de células fixadas foi transferida para um tubo de microcentrifugação de poliestireno (Becton Dickinson, San José, CA, EUA) para contagem no "*FACS Cell Sorter*". A solução foi diluída em PBS até que a contagem do aparelho indicasse, aproximadamente, 100 eventos por segundo.

O protocolo para a separação em microplacas de 96 poços foi feito segundo as instruções do manual do "*FACS Vantage*" (Becton-Dinckson, 1997). As placas defletoras foram ligadas 20 minutos antes do experimento para que o campo elétrico fosse criado. Para a separação das células, foi utilizado o parâmetro "*Counter*", o modo mais utilizado em separação de células devido a sua alta acurácia e pureza em contagem celular.

As células foram selecionadas de acordo com seu tamanho relativo e granulosidade, seguido do grau de fluorescência emitida. O programa Clone Cyt (Becton-Dinckson, 1997) foi

utilizado para a separação das células diretamente em microplacas de plástico com 96 poços em fundo V (Sorenson BioScience, Salt Lake, Reino Unido) contendo 5µL de uma solução 10% Triton X-100 em cada poço.

Após a separação das células, uma gota de óleo mineral foi adicionada a cada um dos poços da placa. As placas foram seladas com cobertura plástica Microseal 'A' Film (MJ Research, Ramsey, MA, EUA), identificadas e armazenadas a -20°C para serem posteriormente submetidas à PCR de microssatélites.

3.7.1.2.4.2.2 PCR de Microssatélites em Células Únicas do Clone Cuica cl1 do *T. cruzi*

As placas contendo uma única célula do *T. cruzi* por orifício foram retiradas do congelador e, imediatamente, submetidas a aquecimento a 80°C, por 1 hora, em termociclador a fim de realizar a lise celular. Após a lise, foi realizada a PCR utilizando o protocolo "*full nested*" PCR descrito no item 3.9.2.1. Na primeira amplificação, foi utilizado um volume total de 25µL contendo as células do *T. cruzi* lisadas; 5µL de Triton X-100 10%; 10mM Tris-HCl pH 9,0,; 50mM de KCl; 0,1% Triton X-100 (Tampão B, Promega, Madison, WI, EUA); 2,5mM $MgCl_2$ (Promega, Madison, WI, EUA); 1U *Taq* DNA Polimerase (Promega, Madison, WI, EUA); 300µM de cada dNTP (Sigma, Sto. Louis, MO, EUA); 0,3µM de cada iniciador externo (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil – Tabela V) que foram recobertos com óleo mineral. A segunda amplificação foi realizada como descrito no item 3.9.2.1.

3.7.1.2.4.2.3 Manuseio Laboratorial do Clone Cuica

A fim de verificar a dinâmica das subpopulações do *T. cruzi* encontradas no clone Cuica cl1, esse foi mantido, por aproximadamente oito meses na fase estacionária de crescimento em meio LIT e submetido a passagens sucessivas em camundongos albinos Swiss, com quatro semanas de idade. As passagens foram realizadas de 20 em 20 dias e os parasitos reisolados por hemocultura na quinta e 15ª passagens. Após a positivação da hemocultura, os parasitos foram mantidos em meio LIT em fase exponencial de crescimento para obtenção da massa úmida e posterior extração para obtenção do extrato enzimático e DNA como descrito no item 3.7.1.1.1. Análises comparativas entre o perfil de isoenzimas e microssatélites desses reisolados, do estoque Cuica cl1 e de um estoque Cuica cl1 criopreservado no Laboratório de Doença de Chagas desde 1997, foram então realizadas.

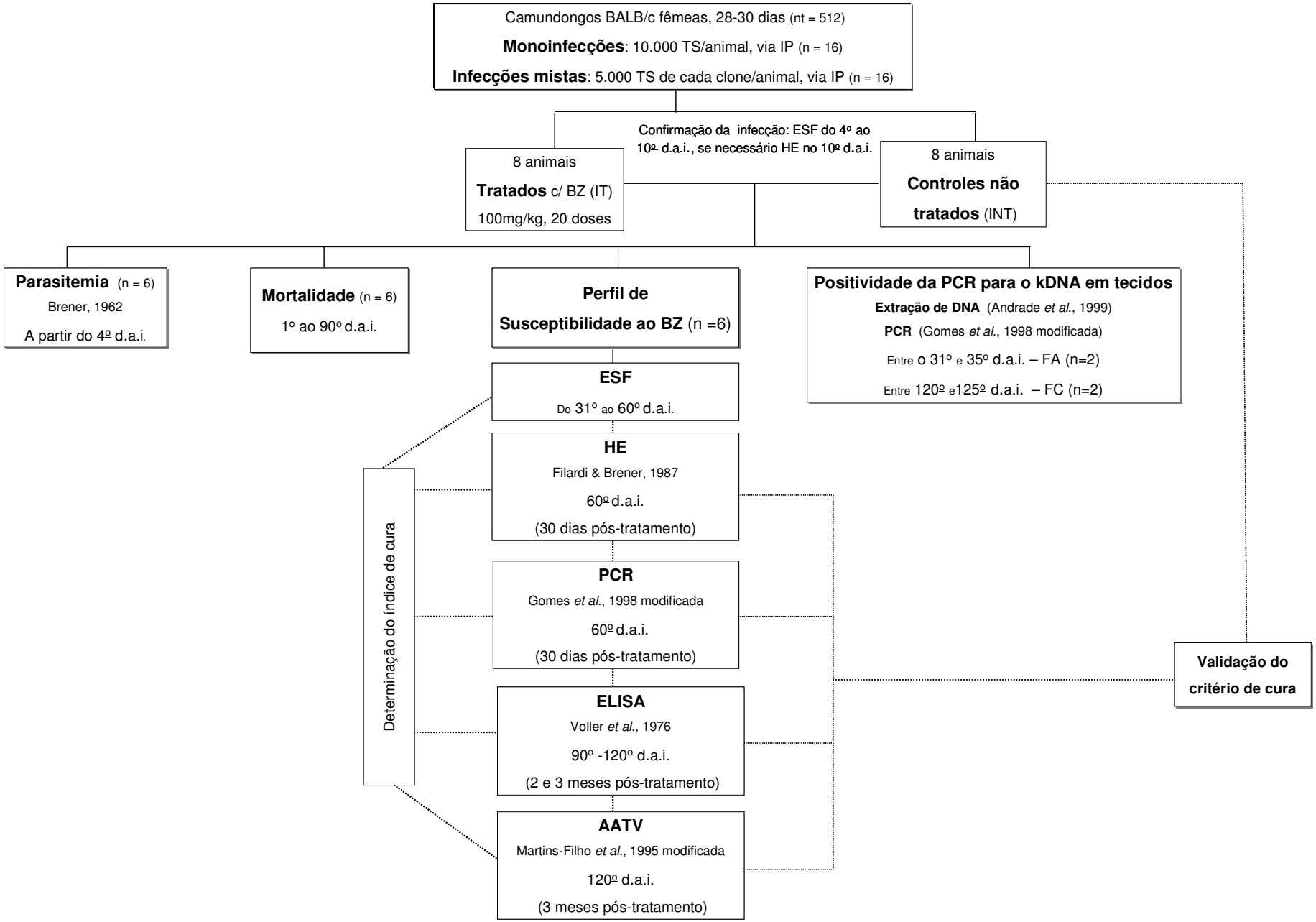
3.7.2 Identificação pelo Perfil de Microssatélites dos Isolados do *T. cruzi* em DNA Obtido Diretamente do Sangue ou Tecidos

A obtenção de DNA das amostras de sangue dos animais infectados tratados não curados (TNC) e dos controles infectados não tratados (INT) foi processada de acordo com a metodologia descrita no item 3.6.3. As amostras foram triadas para detecção do fragmento de 330pb do kDNA do *T. cruzi* (metodologia descrita nos itens 3.6.3.1 e 3.6.3.3) e as amostras positivas foram submetidas à caracterização pelo perfil de microssatélites.

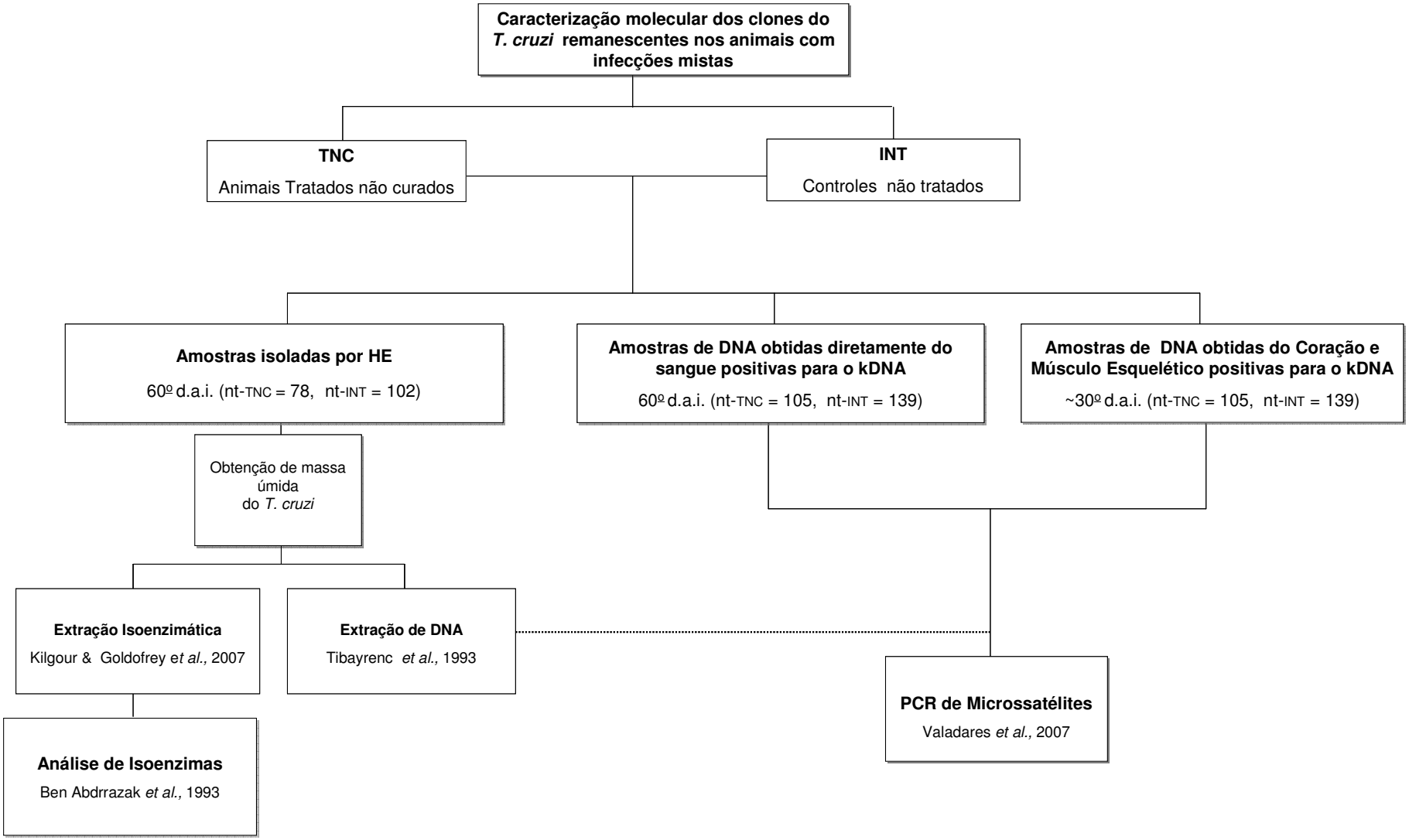
Os lisados provenientes de amostras do coração e músculo esquelético coletados entre os 30-35º dias após infecção, positivos para o fragmento de 330pb do kDNA do *T. cruzi* (metodologia descrita no item 3.6.4.2 e 3.6.3.1.1.3.2), também foram analisados em relação ao perfil de microssatélites.

3.7.3 PCR "full nested" para Detecção dos Alelos de Microssatélites

A amplificação de microssatélites do DNA do *T. cruzi* presentes no sangue e nos tecidos dos animais infectados foi realizada diretamente desses materiais biológicos, utilizando um protocolo de PCR denominado "*full nested*". Esse método consiste em uma etapa inicial de amplificação empregando os iniciadores externos para cada loco estudado, seguida de uma PCR que utiliza o produto da primeira amplificação como DNA molde para ser amplificado pelos iniciadores internos (Tabela V). Na primeira amplificação foram utilizados 12μL da mistura de reação composta de 10mM Tris-HCl/pH 9,0; 50mM KCl; 0,1% de Triton X-100 (Tampão B, Promega, Madison, WI, EUA); 2,5mM de $MgCl_2$ (Promega, Madison, WI, EUA); 250μM de cada dNTP (Sigma, Sto. Louis, MO, EUA); 0,3μM de cada iniciador externo (ALPHA DNA, Montreal, Quebec, Canadá – Tabela V) e 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA); acrescidos 1,5μL da amostra e 20μL de óleo mineral. Na segunda amplificação foram utilizados 10% do volume de reação obtido na etapa anterior e a mistura da reação foi semelhante à descrita acima, com exceção dos iniciadores. Nessa etapa, foram empregados iniciadores internos para cada loco de microssatélite na concentração de 0,3μM (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Os ciclos de amplificação da PCR em ambas as etapas e a determinação dos alelos de microssatélites foram realizados segundo o protocolo "*stepdown*" descrito no item 3.7.1.2.2 e a metodologia descrita no item 3.7.1.2.3, respectivamente.



Delineamento experimental (Parte 1). Parâmetros analisados e distribuição dos camundongos BALB/c inoculados com clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais, tratados com Benzonidazol (IT) e os controles não tratados (INT). TS: Tripomastigotas sangüíneos; BZ: Benzonidazol; IP: intraperitoneal; nt = número de animais totais avaliados; n = número de animais por grupo experimental; d.a.i.: dias após a infecção; ESF: exame de sangue a fresco, HE: hemocultura; PCR: reação em cadeia da polimerase; AATV: pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos pela citometria de fluxo. As datas indicam o dia em que as coletas foram realizadas.



Delineamento experimental (Parte 2). Caracterização molecular dos isolados provenientes dos camundongos BALB/c inoculados com as misturas dos clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais, tratados com Benzonidazol (IT) e os respectivos controles não tratados (INT) nt = número de amostras totais avaliadas. As datas indicam o dia em que as coletas foram realizadas.

4. Resultados

ANÁLISE DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL EM INFECÇÕES MISTAS E MONOINFECÇÕES

Distintos parâmetros biológicos foram avaliados nesse estudo incluindo: (1) parasitemia, (2) mortalidade cumulativa, (3) perfil de susceptibilidade ao BZ estabelecido segundo o critério de Filardi & Brener (1982) acrescido da PCR em eluato de sangue e (4) positividade da PCR para detecção do kDNA do *T. cruzi* nos tecidos.

O efeito do tratamento sobre esses parâmetros nos diferentes grupos experimentais foi analisado comparando-se os resultados obtidos em animais tratados e não tratados. Além disso, os clones remanescentes nos animais infectados, submetidos ao tratamento ou não, foram identificados pela análise de isoenzimas e microssatélites em amostras obtidas por hemocultura, diretamente no sangue e nos tecidos dos animais.

A reprodutibilidade dos resultados foi avaliada pela repetição de um experimento escolhido aleatoriamente entre os genótipos e combinações genotípicas analisadas. Desse modo, pela seleção aleatória foram repetidos 10 experimentos distribuídos entre os genótipos (20, 19, 39 e 32) e suas combinações (20+19, 20+39, 20+32, 19+39, 19+32, 39+32). Além disso, algumas monoinfecções foram repetidas em momentos distintos durante a realização dos experimentos, a fim de verificar a reprodutibilidade dos experimentos. Outras infecções mistas, além das selecionadas aleatoriamente, também foram realizadas em duplicata. Os resultados obtidos foram semelhantes entre todos os pares de experimentos avaliados. Desse modo os dados aqui apresentados se referem ao primeiro grupo de experimentos realizados.

4.1 Parasitemia

O perfil da curva de parasitemia foi e heterogêneo entre os animais infectados com clones de um mesmo genótipo ou mesmo com as misturas das diferentes combinações genotípicas. Em decorrência da heterogeneidade existente em cada grupo e, uma vez que foram selecionados clones polares, combinando as propriedades virulência e susceptibilidade ao BZ, tais diferenças eram esperadas entre os representantes de um mesmo genótipo. Desse modo, os clones que apresentaram maiores níveis de parasitemia (PAR) foram o P209 cl1 (genótipo 20) e Gamba cl1 (genótipo 19) com 1.066.124 e 394.290 tripomastigotas sangüíneos, respectivamente. Ambos apresentaram PP superior a 40 dias e DPMP de aproximadamente 26,4±7,96 para o P209 cl1 e 52,8±15,3 para o Gamba cl1. Por outro lado, os clones menos

virulentos foram os do genótipo 39 (Bug2148 cl1 e SO3 cl5) com 1.700 e 3.300 tripomastigotas sangüíneos, respectivamente e, PP curto (< 5 dias). Para maiores detalhes veja o Anexo I.

Para avaliar os níveis de parasitemia das diferentes combinações e considerando que esses variaram de 2.3.43.400 a 833 tripomastigotas sangüíneos, foi adotado o critério arbitrário dividindo as combinações em: (1) PAR elevado (>1.000.000 tripomastigotas sangüíneos), (2) PAR médio (300.000-1.000.000) e (3) PAR baixo (0-300.000).

Animais infectados com a mistura P209 cl1+Gamba cl1 (combinação 20+19) foram os únicos que apresentaram PAR(s) elevado(s), os infectados com as misturas Cuica cl1+Gamba cl1 e Cuica cl1+OPS21 cl11 apresentaram PAR(s) médios e aqueles infectados com a mistura P209 cl1+OPS21 cl11 apresentram PAR(s) baixos. O PP foi longo para todas as misturas (> 40 dias) e o DPMP foi superior a 30 dias. Animais infectados com todas as misturas da combinação 20+39 apresentaram PAR(s) médios com PP(s) longos (> 40 dias) e DPMP também superior a 30 dias.

Por outro lado, animais infectados com as diferentes misturas da combinação 20+32 apresentaram comportamento distinto: animais infectados com a mistura P209 cl1+IVV cl4 apresentaram PAR(s) médios e com os demais, níveis PAR(s) baixos. O PP foi superior a 40 dias e o DPMP foi variável entre as diferentes misturas: de 14,3±6,33 dias na mistura Cuica cl1+MAS cl1; 33,3±16,54 dias na Cuica cl1+IVV cl4; 36,5±9,71 dias na P209 cl1 cl1+IVV cl4 e de 51,7±14,96 dias na mistura P209 cl1+MAS cl1.

A combinação 19+39 apresentou uma clara subdivisão, uma vez que animais infectados com o clone mais virulento do genótipo 19 (Gamba cl1) apresentaram PAR(s) médios; enquanto aqueles infectados com o clone menos virulento desse genótipo (OPS 21 cl11) apresentaram PAR(s) baixos, sendo a parasitemia detectada uma única vez pelo método de Brener (1962) no caso da mistura OPS21 cl11+S03 cl5. Os PP(s) foram longos para as demais combinações (>54 dias).

Comportamento semelhante foi observado para animais infectados com a combinação 19+32, embora todas as misturas tenham apresentado PAR(s) baixos, esse foi mais expressivo naquelas contendo o clone mais virulento do genótipo 19 (Gamba cl1), com PP(s) superiores a 45 dias e DPMP maior que 32 dias. Por outro lado, os PAR(s) foram bem mais baixos nos animais infectados com as misturas contendo o clone OPS21 cl11 (19), combinado com ambos os estoques do genótipo 32 e os PP curtos, inferiores a cinco dias.

Animais infectados com a combinação 39+32 foram os que apresentaram comportamento mais homogêneo, com PAR(s) baixos em todas as misturas (< 9,4 tripomastigotas sangüíneos), PP(s) curtos (< 3 dias) e DPMP em torno de oito a 10 d.a.i.

O tratamento promoveu redução significativa da parasitemia na maioria das monoinfecções e infecções mistas, tornando-se subpatente poucos dias após o início do tratamento com BZ. Perfis de curva de parasitemia média representativos desses resultados são mostrados na Figura 2A edas demais monoinfecções e infecções mistas estão no Anexo I.

Animais infectados com os estoques P209 cl1 (genótipo 20) e Gamba cl1 (19), com as misturas Gamba cl1+P209 cl1 e Gamba cl1+Cuica cl1 (combinação 20+19), Cuica cl1+Bug2148 cl1 (20+39), Gamba cl1+Bug2148 cl1 (19+39) e, Gamba cl1+IVV cl4 (20+32) apresentaram reativação da parasitemia após o tratamento entre o 40-60º d.a.i. – Figura 2B. Os PAR(s) foram significativamente inferiores aos observados nos animais INT em todos os casos e a parasitemia persistiu por período variável de 2 a 54 dias após a reativação.

O tratamento também promoveu diminuição significativa nos demais parâmetros relacionados à curva de parasitemia (PP e PMP) e antecipação do DPMP na maioria das monoinfecções ou infecções mistas. Entretanto, em animais infectados com o estoque P209 cl1 e a mistura Gamba cl1+Bug2148 cl1 o tratamento não reduziu o período patente da infecção, mas retardou o dia do pico de parasitemia (Figura 2B, Anexo I).

Animais infectados com os estoques do genótipo 39 (Bug2148 cl1 e SO3 cl5), todas as misturas da combinação 39+32 (Bug2148 cl1+IVV l4, SO3 cl5+MAS cl1, SO3 cl5+IVV cl4 e Bug2148 cl1+MAS cl1), duas misturas da combinação 19+32 (OPS21 cl11+MAS cl1 e OPS21 cl11+IVV cl4 cl5) e uma mistura da combinação 19+39 (OPS21 cl11+SO3 cl5) apresentaram PAR(s) e PP(s) curtos (5 a 20 d.a.i.) – Figura 2C. Nesses casos, o tratamento não resultou em alteração da maioria dos parâmetros relacionados à parasitemia no grupo IT, quando comparados aos controles INT.

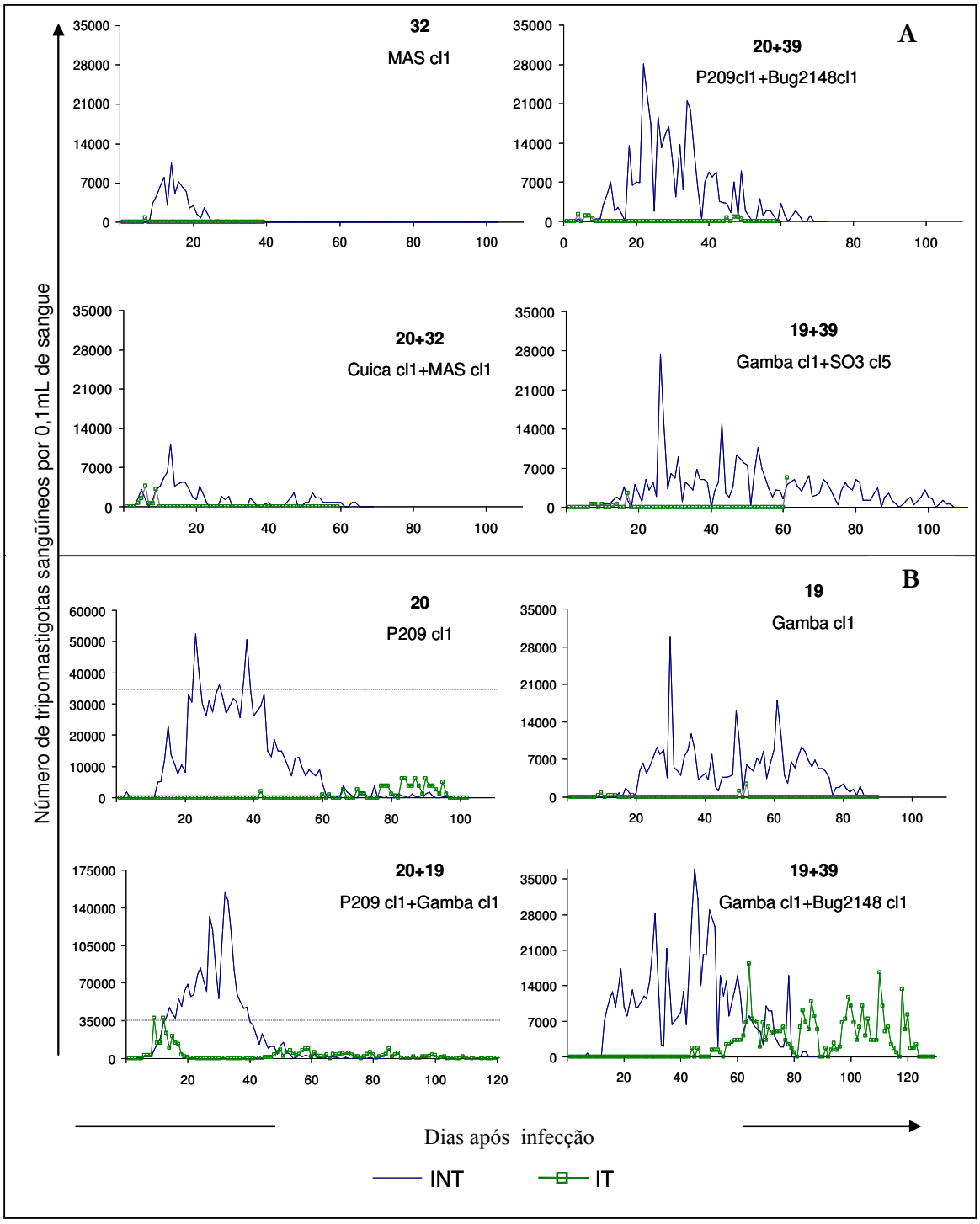


Figura 2. Perfis representativos de curvas de parasitemia média obtidos em monoinfecções e infecções mistas por clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais em que o tratamento com benzonidazol reduziu significativamente os níveis de parasitemia (**A**) e em que ocorreu reativação da parasitemia após tratamento (**B**).

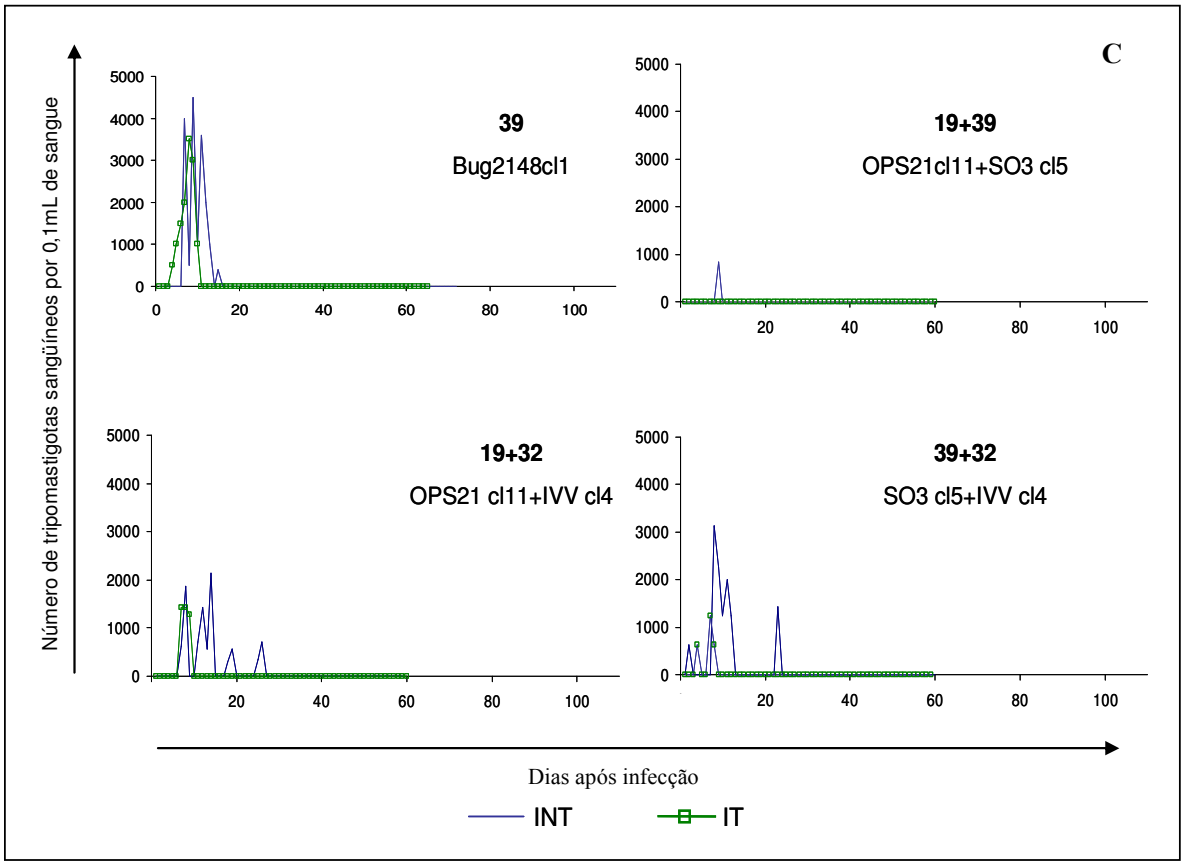


Figura 2C (continuação). Perfis representivos de curvas de parasitemia média obtidos em monoinfecções e infecções mistas por clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais em que o tratamento com Benzonidazol não reduziu significativamente os níveis parasitêmicos.

4.2 Mortalidade

Os animais infectados com os clones do *T. cruzi* pertencentes aos genótipos principais e suas misturas apresentaram na maioria dos casos baixa taxa de mortalidade (MOR) variando de 0 a 15,4%. Não foi observada diferença significativa entre as taxas de mortalidade dos animais INT e IT (Anexo 1). Animais infectados com a mistura P209cl1+OPS21 cl11 apresentaram taxa de mortalidade mais expressiva (40%) e o tratamento foi capaz de previni-lá totalmente.

4.3 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol em Infecções Mistas por Clones do T. cruzi *Pertencentes aos Genótipos Principais*

4.3.1 Estabelecimento do Critério de Cura para Avaliação da Eficácia Terapêutica ao Benzonidazol

A determinação da eficácia ou falha terapêutica do BZ no tratamento de animais infectados pelo *T. cruzi* foi realizada empregando métodos parasitológicos como o exame a fresco (ESF), a hemocultura (HE) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de sangue e, métodos sorológicos como a reação imunoenzimática (ELISA) e a pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos (AATV).

Na primeira etapa da investigação, foi verificado o tempo mínimo em que as amostras de soro deveriam ser coletadas para assegurar uma correta classificação dos animais, segundo o critério de cura estabelecido por Kretlli & Brener (1982). Nesse contexto, foram selecionados soros de animais coletados aos dois e três meses após tratamento para serem analisados pela ELISA considerando os resultados prévios dos testes parasitológicos e da pesquisa de AATV. Os soros dos animais foram alocados em dois grupos (1) TNC*: (animais que apresentaram pelo menos um teste parasitológico positivo e AATV positivo) e (2) TC* (animais com os testes parasitológicos e AATV negativos).

Os resultados da ELISA demonstraram que algumas amostras coletadas de animais TNC apenas aos dois meses após o tratamento não foram compatíveis com a positividade dos testes parasitológicos. A falha em detectar a infecção aos dois meses após o término do tratamento não pode ser correlacionada a nenhum genótipo ou combinação genotípica específica. Por outro lado, uma das 194 amostras de soro coletadas três meses após o tratamento com BZ permaneceu negativa quando foram analisadas pela ELISA. Dessa maneira, os resultados da ELISA em amostras coletadas três meses após tratamento foram mais coerentes com a falha terapêutica definida pelas outras metodologias (Figura 3 – A).

Além disso, a análise de amostras de soro de animais pertencentes ao grupo TC, coletadas três meses após o tratamento, confirmou que a ELISA foi novamente mais eficiente na definição de cura dos animais do que sua realização em amostras coletadas somente dois meses após o tratamento (Figura 3 – A).

Uma vez determinado que o período de três meses após o tratamento representava o tempo mínimo requerido para o emprego da ELISA como critério de cura, amostras biológicas de 194 animais infectados com diferentes combinações genotípicas do *T. cruzi* ou

suas respectivas monoinfecções, tratados com BZ na fase aguda, foram analisadas pelos testes sorológicos e parasitológicos concomitantemente com amostras de animais infectados não tratados (INT) e não infectados (NI) utilizadas como controle.

A falha terapêutica foi detectada em 72,2% dos 194 animais tratados (TNC, 140) e a cura observada em 27,8% (n=54), incluindo 19,1% de tratados curados (TC, n=37) e 8,7% de dissociados (DIS, n=17).

Após o tratamento, os animais apresentaram três perfis sorológicos distintos, consistentes com o perfil dos grupos TNC, DIS e TC (Figura 3 – B). A análise dos perfis sorológicos demonstrou que a AATV foi capaz de identificar eficazmente o grupo DIS já aos três meses após o tratamento (Figura 3 – B) e foi mais precisa em categorizar os diferentes grupos de animais em relação à resposta terapêutica do que a ELISA. Além disso, a subdivisão dos animais TNC, de acordo com a positividade da hemocultura, mostrou que ambas as técnicas sorológicas detectaram perfis distintos entre os animais que apresentaram hemocultura negativa (Hc-) e positiva (Hc+), com maior reatividade verificada no segundo grupo (Figura 3 – C).

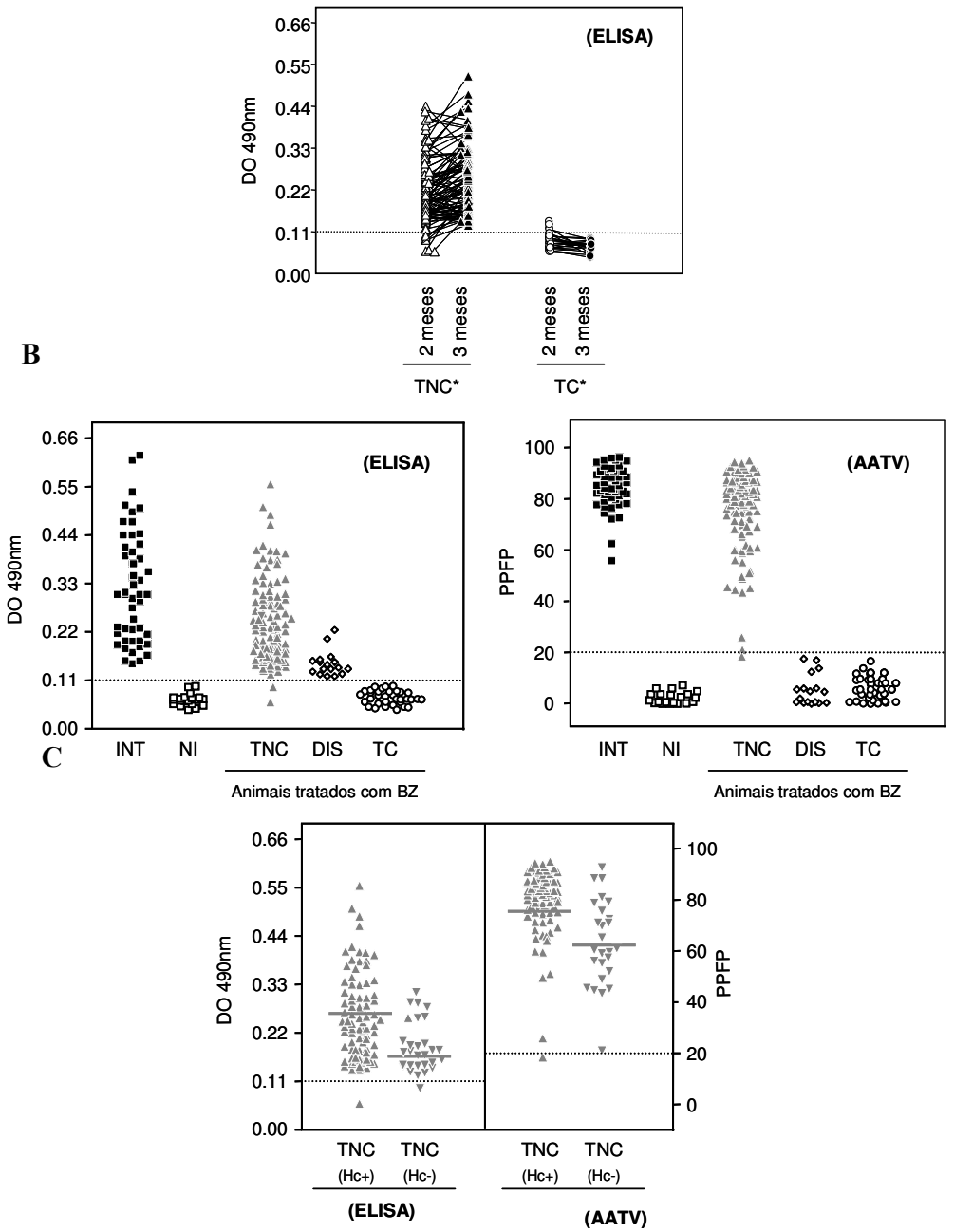


Figura 3. Perfil sorológico de camundongos BALB/c infectados com diferentes clones e combinações dos genótipos principais do *Trypanosoma cruzi*, classificados como Infectado Não Tratado (INT = ■), Não Infectado (NI=□), Tratado Não curado (TNC=▲), Dissociado (DIS=◇) e Tratado Curado (TC=●), com base nos perfis sorológicos e parasitológicos definidos pelo critério de cura clássico. A: aplicação da ELISA em amostras de soro coletadas dois (símbolos abertos) e três meses (símbolos fechados) após tratamento com BZ provenientes de animais com testes parasitológicos e AATV positivos (TNC*=△,▲) ou negativos (TC*=○,●), para determinar o tempo mínimo, após tratamento necessário, para a ELISA atuar como um bom critério de cura. B: A sorologia convencional (ELISA) e a não convencional para detecção de anticorpos antitripomastigotas vivos pela citometria de fluxo (AATV) foram posteriormente realizadas em amostras de soro coletadas três meses após tratamento com Benzonidazol e os perfis sorológicos foram analisados após a definição de cura pelo critério de Kretlli & Brener, 1982. C: Comparação do perfil sorológico entre animais tratados não curados com hemocultura positiva (TNC Hc+=▲) e negativa (TNC Hc-=▼). Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO) a 490nm na ELISA e percentagem de parasitos fluorescentes poistivos (PPFP) na AATV. As linhas horizontais pontilhadas indicam o valor do ponto de corte utilizado para discriminar resultados positivos e negativos.

*: animais foram classificados considerando apenas os resultados dos testes parasitológicos e da AATV.

Para verificar a capacidade dos métodos laboratoriais empregados no critério de cura para detectar a infecção pelo *T. cruzi,* foram analisados resultados obtidos em amostras coletadas de animais TNC e INT (Tabela VII). Nos animais INT, os testes sorológicos foram reativos em 100% dos animais avaliados, enquanto a Hc e PCR foram positivas em 89,4 e 95,3% dos camundongos, respectivamente. A PCR foi positiva em 14 das 15 amostras (93,3%) de animais em que a Hc foi negativa e, foi negativa, em cinco amostras de animais em que a Hc foi positiva.

Nos animais TNC, o ESF apresentou 19,8% de positividade, a Hc 79,3% e a PCR 96,0% (Tabela VII). A PCR foi positiva em 93,1% (27/29) dos animais nos quais a Hc foi negativa e, foi negativa, em duas amostras de animais nos quais a Hc foi positiva. Dois animais que apresentaram testes parasitológicos negativos e sorológicos positivos em ambas as técnicas foram classificados como TNC. A análise das amostras de soro desses dois animais, coletadas seis meses após tratamento, demonstrou que tanto a ELISA quanto AATV permaneceram positivas. Duas amostras de animais nos quais os testes parasitológicos foram positivos (Hc e PCR) apresentaram ELISA e AATV negativas ou próximas ao ponto de corte (Figura 3).

Os resultados obtidos nos animais NI confirmaram a especificidade dos métodos parasitológicos e sorológicos mostrando resultados negativos em todos os grupos avaliados. Além disso, não foram detectados inibidores em nenhuma das amostras negativas avaliadas.

Tabela VII. Comparação entre o percentual de positividade dos testes sorológicos e parasitológicos em amostras biológicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com diferentes combinações genotípicas do *Trypanosoma cruzi*

Grupos Experimentais (n = 402)	**Percentual de Positividade**				
	ELISA	**AATV**	**ESF**	**Hc**	**PCR**
INT (188)	100,0 (84)[a]	100,0 (64)[a]	NR	89,4 (188)[b]	95,3 (167)[a]
TNC (140)	96,4 (140)[a]	99,0 (112)[a]	19,8 (140)[b]	79,3 (140)[c]	96,9 (127)[a]

INT: Infectado não tratado; TNC: Tratado não curado; n = número de animais; ELISA: reação imunoenzimática para detecção de IgG total pela ELISA; AATV: pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos pela citometria de fluxo; ESF: exame de sangue a fresco; Hc: Hemocultura e PCR: reação em cadeia da polimerase. Letras diferentes representam diferenças significativas em $P < 0,05$. NR: Não realizado.

A análise da positividade das técnicas parasitológicas, considerando a variabilidade genética dos estoques, demonstrou que o ESF apresentou baixa sensibilidade para a maioria das monoinfecções e infecções mistas (variando de 0 a 33,4%). Por outro lado, a Hc apresentou positividade satisfatória para a maioria das combinações genotípicas (85,7-100,0%),

exceto para o genótipo 39 (20,0%) e para as combinações 19+32 (64,7%) e 39+32 (22,2%). A PCR foi o método parasitológico mais sensível e não foram observadas diferenças significativas entre as taxas de positividade dos diferentes grupos analisados (81,8-100%). Nos animais INT, o desempenho dos testes parasitológicos foi semelhante ao observado nos animais TNC e, novamente, o genótipo 39 (60,0%) e a combinação 39+32 (72,7%) apresentaram menor freqüência de positividade na Hc.

Foram observadas diferenças significativas entre a positividade dos testes sorológicos e da Hc ($P < 0,001$), bem como entre a positividade da PCR e da hemocultura ($P = 0,02$) em ambos os grupos. A análise de correlação entre os métodos sorológicos e parasitológicos empregados demonstrou uma melhor concordância entre os resultados da AATV e da PCR (r= 0,855).

4.3.2 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo as Linhagens do T. cruzi

A Figura 4 mostra os índices de cura obtidos no tratamento de camundongos BALB/c segundo as grandes linhagens filogenéticas do *T. cruzi* e os respectivos índices de cura globais esperados. Para a estimativa do índice de cura esperado foi considerada a hipótese nula de trabalho segundo a qual "em infecções mistas não há interação entre os clones da mistura" e ainda o fato de que a resposta ao tratamento é estável para cada população do *T. cruzi* se mantidas as mesmas condições experimentais. Desse modo, a resposta esperada da mistura de dois clones com diferentes perfis de susceptibilidade ao BZ deveria corresponder ao índice de cura do clone mais resistente da mistura. Conseqüentemente, o índice de cura global esperado (ICE) para as combinações de clones pertencentes a diferentes linhagens do *T. cruzi* foi calculado a partir da média dos índices de cura esperados para cada uma das misturas pertencentes a essa combinação.

Desse modo, uma vez que na combinação *T. cruzi* I+*T. cruzi* I sempre estavam incluídos clones resistentes ao BZ, o índice de cura global esperado foi de 0%. As infecções mistas envolvendo *T. cruzi* I+*T. cruzi* mostraram uma predominância de combinações que continham clones resistentes ao BZ e apresentaram índice de cura global esperado de 17,7%. A combinação *T. cruzi* I+*T. cruzi* II que continha misturas de clones resistentes, parcialmente susceptíveis e susceptíveis ao BZ apresentou índice de cura global de 26,7%. Já a combinação *T. cruzi*+*T. cruzi* II apresentou uma predominância de clones parcialmente susceptíveis ao BZ, resultando em índice de cura global esperado de 35,0%.

Animais monoinfectados por clones pertencentes à *T. cruzi* I foram mais resistentes ao BZ (índice de cura global observado – ICO de 35,4%) seguidos pelos infectados com clones da linhagem *T. cruzi* (54,4%), sendo ambos parcialmente susceptíveis ao BZ (Figura 4). Por outro lado, animais infectados com clones da linhagem do *T. cruzi* II foram susceptíveis ao tratamento com BZ apresentando índice de cura global observado de 70%. Da mesma forma, as combinações contendo apenas *T. cruzi* I sempre foram resistentes ao BZ, embora tenha sido observada diferença significativa na resistência ao BZ entre a combinação do *T. cruzi* I+ *T. cruzi* I (0% de cura) e *T. cruzi* I+*T. cruzi* (17,4%) ou *T. cruzi* I+*T. cruzi* II (24,0%). A combinação *T. cruzi*+*T. cruzi* II foi a que apresentou maior índice de cura, correspondendo a 59,1%.

Feitas estas considerações foi realizada, a análise comparativa entre os índices de cura observado (ICO) e esperado (ICE). Quando foram consideradas as misturas entre diferentes linhagens do *T. cruzi* não foram observadas mudanças no perfil de susceptibilidade ao BZ em nenhuma das combinações. Comparando os índices de cura esperado e observado foi detectado um aumento no índice de cura na combinação *T. cruzi*+*T. cruzi* II (59,1% *versus* 35,0%), mas esse aumento não foi suficiente para promover mudança no perfil de susceptibilidade ao BZ (Figura 4).

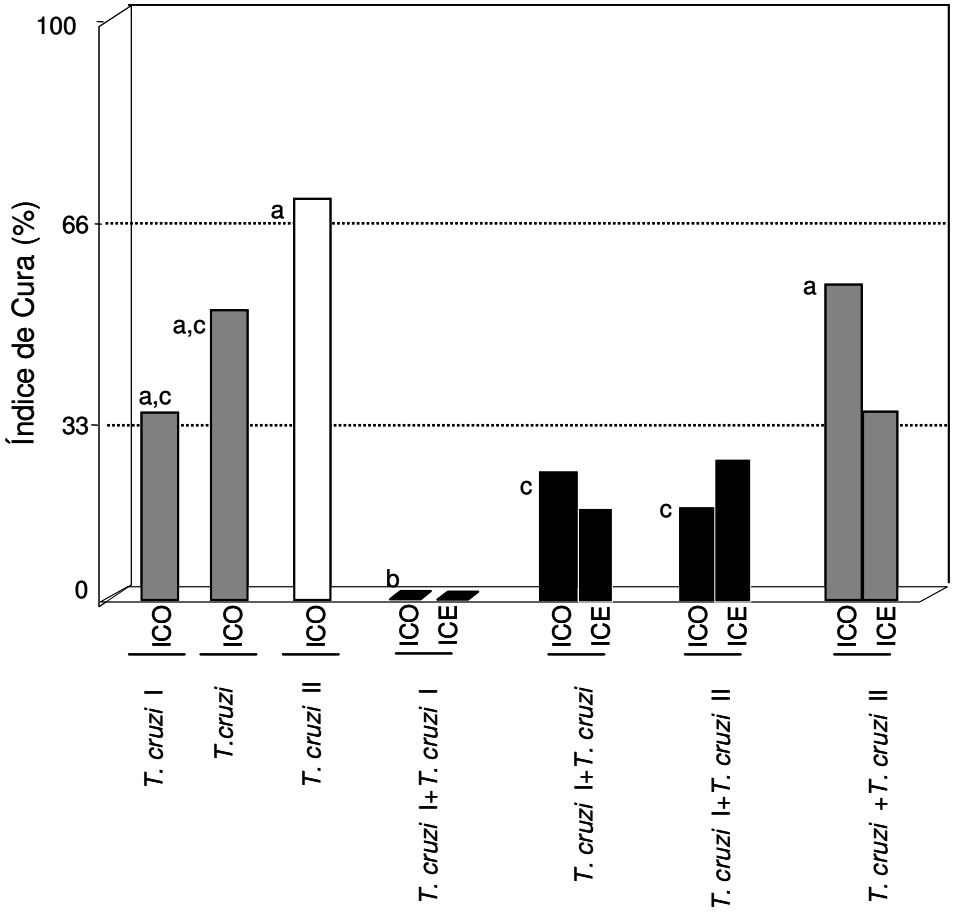


Figura 4. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol dos clones do *T. cruzi* e suas diferentes combinações segundo as linhagens do *T. cruzi* (*T. cruzi* I, *T. cruzi* e *T. cruzi* II). As monoinfecções e infecções mistas foram classificadas segundo o critério proposto por Filard & Brener (1987) em Resistente (■: índice de cura ≤ 33%), Parcialmente susceptível (□: 33% < índice de cura < 66%) e Susceptível (□: índice de cura ≥ 66).
ICO: índice de cura observado. ICE: índice de cura esperado.
Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os índices de cura observados nos animais infectados com diferentes linhagens do *T. cruzi* e suas combinações.

4.3.3 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo os Genótipos Principais do *T. cruzi*

A Figura 5 mostra os índices de cura obtidos após o tratamento de camundongos BALB/c infectados com clones do *T. cruzi* agrupados de acordo com os genótipos principais e os respectivos índices de crua esperados. Os índices de cura globais esperados para as diferentes combinações genotípicas foram estimados com base nas mesmas premissas descritas para as linhagens do *T. cruzi*. As combinações contendo o genótipo 20, cujos clones são resistentes ao BZ, apresentaram índices de cura globais esperados (ICE) de 0%. Para combinações contendo o genótipo 19 (clones parcialmente susceptíveis ou susceptíveis ao

BZ) com os genótipos 39 (clones resistentes ou parcialmente susceptíveis ao BZ) ou 32 (clones parcialmente susceptíveis ou susceptíveis ao BZ), os índices de cura globais esperados variaram de 35,0% a 55,0%, respectivamente. Uma vez que a combinação 39+32 inclui misturas de clones resistentes, parcialmente susceptíveis e susceptíveis, o índice de cura global esperado foi de 35,0%.

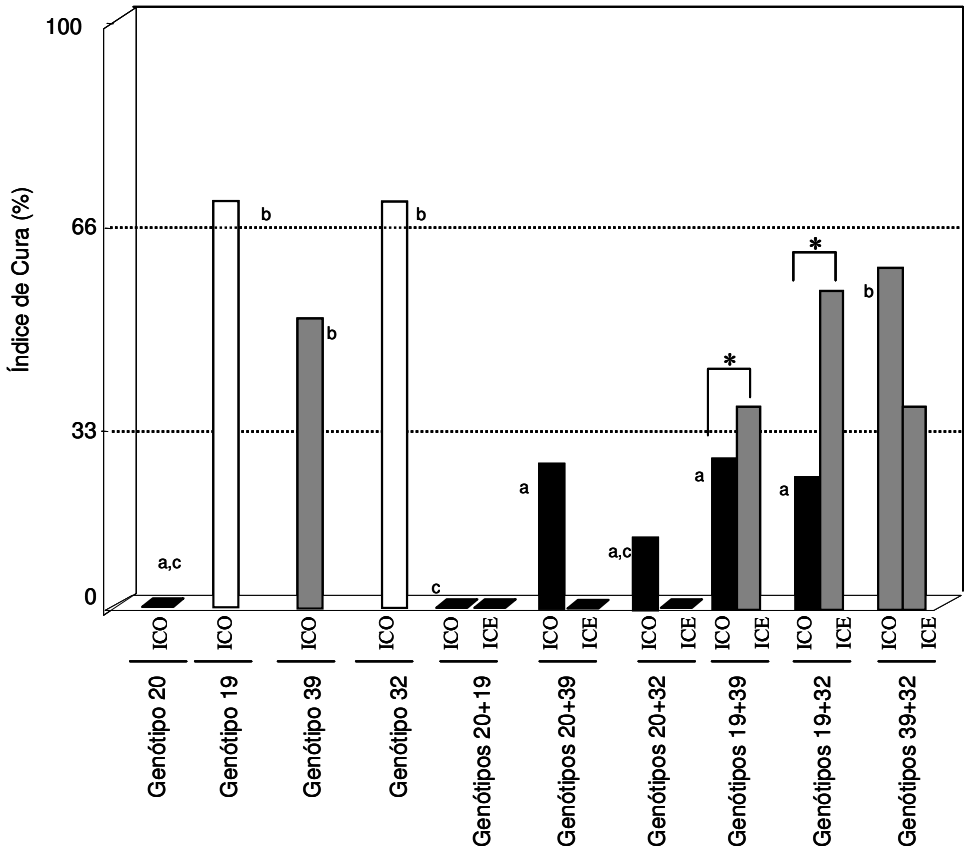


Figura 5. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol dos clones do *T. cruzi* e suas diferentes combinações segundo os genótipos principais (20, 19, 39 e 32). As monoinfecções e as infecções mistas foram classificadas segundo o critério proposto por Filardi & Brener (1987) em Resistente (■: índice de cura ≤ 33%), Parcialmente susceptível (▩: 33% < índice de cura < 66%) e Susceptível (□: índice de cura ≥ 66).

ICO: índice de cura observado. ICE: índice de cura esperado.

Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os índices de cura observados nos animais infectados com diferentes genótipos do *T. cruzi* e suas combinações.

* Representa mudança no perfil de susceptibilidade ao BZ considerando os índices de cura observado e esperado para as diferentes combinações.

Animais monoinfectados com o genótipo 20 foram resistentes ao BZ com índice de cura (ICO=0%) significativamente menor do que aqueles observados em animais infectados com os clones do genótipo 39 (50,0% - parcialmente susceptível ao BZ) e do que os dos genótipos 19 e 32, ambos susceptíveis ao BZ (índices de cura de 70,0%). Todas as combinações contendo o genótipo 20 foram também resistentes ao BZ, embora diferenças significativas tenham sido observadas entre as combinações dos genótipos 20+19 e 20+39. As combinações 19+39 (25,9%) e 19+32 (22,7%) foram ambas resistentes ao BZ e a combinação 39+32 foi parcialmente susceptível (59,1%).

Ao contrário da análise do perfil de susceptibilidade ao BZ das infecções mistas, considerando como referência as grandes linhagens do *T. cruzi*, a comparação dos índices de cura observado e esperado para as diferentes misturas, segundo os genótipos do *T. cruzi*, demonsntou mudanças no perfil esperado para as misturas. Em várias combinações genotípicas, diferenças foram verificadas entre os índices de cura observado e esperado. Entretanto, as diferenças não resultaram em alterações no perfil de susceptibilidade ao BZ na maioria das misturas, exceto para as combinações 19+39 e 19+32. Nessas combinações foi observada mudança do perfil de susceptibilidade esperado para um de maior resistência ao BZ. Os índices de cura observados para as combinações 19+39 (25,9% de cura) e 19+32 (22,7%) foram significativamente menores que os índices de cura esperados estimados em 35,0% e 55,0%, respectivamente. Esses índices de cura foram também menores que os índices médios observados para as monoinfecções com os clones pertencentes aos genótipos 19 (70,0%), 32 (70,0%) ou 39 (50,0%).

4.3.4 Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo as Monoinfecções e Infecções Mistas com Diferentes clones do *T. cruzi*

A Figura 6 apresenta o perfil de susceptibilidade ao BZ de infecções mistas envolvendo clones do *T. cruzi* pertencentes aos genótipos distintos comparado com o perfil esperado, que corresponde ao do clone mais resistente presente na mistura como previamente determinado nas respectivas monoinfecções.

Os dados mostram claramente que a análise baseada na resposta individual de cada clone ou combinação foi mais informativa do que aquela baseada no agrupamento dos clones em genótipos ou linhagens do *T. cruzi*, uma vez que a resposta ao tratamento com BZ entre misturas pertencentes à mesma combinação às vezes foi heterogênea. Com exceção da combinação 20+19 em que todas as misturas foram resistentes ao BZ, as demais combinações

apresentaram variações na eficácia do tratamento. Na combinação 20+32 houve predomínio do perfil de resistência ao BZ (3/4), sendo que apenas uma mistura (P209 cl1+IVV cl4) foi parcialmente susceptível. As combinações 20+39 e 19+32 apresentaram duas misturas resistentes e duas parcialmente susceptíveis ao BZ, enquanto na combinação 19+39 uma foi resistente e três foram parcialmente susceptíveis ao BZ. A combinação 39+32 foi a que apresentou resultados mais heterogêneos com uma mistura apresentando perfil de resistência ao BZ; uma, de parcialmente susceptível e; duas, com perfil de susceptibilidade ao BZ.

A análise dos dados mostrou ainda que nove entre as 24 infecções mistas estudadas (combinações marcadas com asterisco na Figura 6 e com linhas coloridas interligando o resultado observado ao esperado, sendo o último correspondente ao resultado obtido para o clone mais resistente da mistura previamente determinado nas monoinfecções) mudaram o perfil de susceptibilidade ao BZ em relação ao esperado. Em três casos, essas mudanças foram especialmente evidentes incluindo as misturas OPS21 cl11+MAS cl1 (P=0,015), Bug2148cl1+OPS21 cl11 (P=0,030) e Bug2148 cl1+MAS cl1 (P=0,015).

As mistura Cuica cl1+Bug2148 cl1 (20+39, constiuída de clones 100% resistentes ao BZ em monoinfecções) e IVV cl4+SO3cl5 (39+32 - constituída por um clone parcialmente susceptível e outro resistente ao BZ) apresentaram um aumento no índice de cura (de 0% para 20% e 40 para 60%, respectivamente), embora esse não tenha sido suficiente para promover alteração no perfil de susceptibilidade ao BZ (Figura 6).

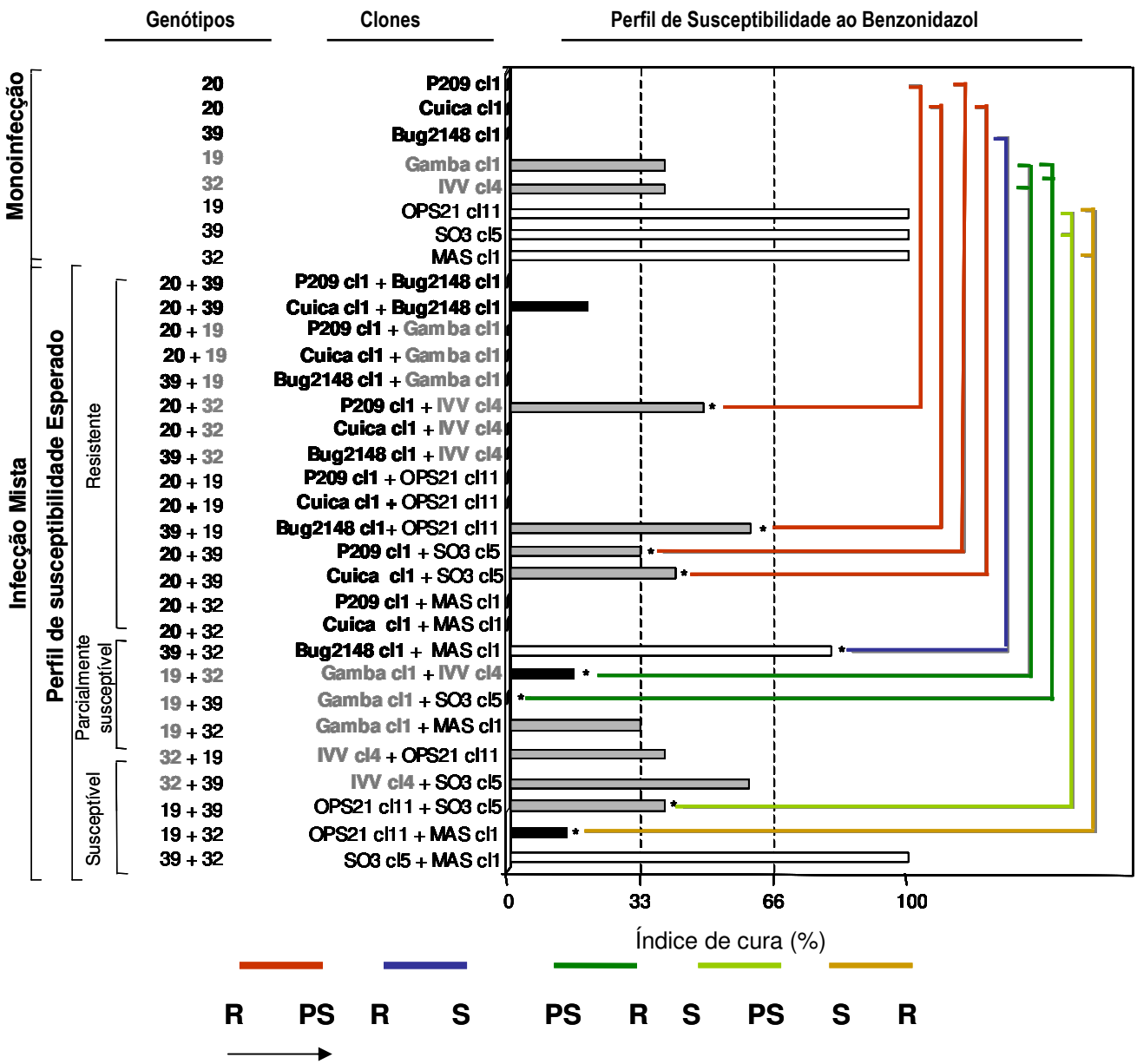


Figura 6. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol de monoinfecções e infecções mistas com clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos diferentes genótipos.
Os clones em negrito foram resistentes ao Benzonidazol (Genótipos 20 e 39), em cinza parcialmente susceptíveis (Genótipos 19, 39 e 32) e em letra normal susceptíveis ao Benzonidazol (Genótipos 19, 39 e 32).
As monoinfecções e as infecções mistas foram classificadas segundo o critério proposto por Filardi & Brener (1987) em Resistente (■: índice de cura ≤ 33%), Parcialmente susceptível (▣: 33% < índice de cura < 66%) e Susceptível (□: índice de cura ≥ 66).
Os resultados foram expressos como índices de cura observados nas monoinfecções e infecções mistas. Nove misturas apresentaram mudanças nos perfis de susceptibilidade em relação ao esperado e estão destacadas por asteriscos e por linhas coloridas que interligam os índices de cura observado e esperado (baseado na infecção mista teórica, com índice de cura correspondente ao do perfil de susceptibilidade do estoque mais resistente nas respectivas monoinfecções). A seta indica o sentido de mudança do perfil de susceptibilidade ao BZ, onde R: resistente, PS: parcialmente susceptível e S: susceptível.

A mistura OPS21 cl11+MAS cl1, composta por dois clones do *T. cruzi* 100% susceptíveis ao BZ em monoinfecções, mostrou ser resistente ao tratamento com esse fármaco na infecção mista e apresentou índice de somente 14,3% de cura. Por outro lado, as misturas Bug2148 cl1+MAS cl1 e Bug2148 cl1+OPS21 cl11, constituídas de um clone 100% resistente e o outro 100% susceptível ao BZ, foram susceptíveis (índice de cura observado de 83,3%) e parcialmente susceptíveis ao BZ (62,5%) nas infecções mistas, respectivamente (Figura 6 e Tabela VIII).

Mudanças no perfil de susceptibilidade ao BZ foram observadas na maioira das combinações genotípicas 20+39 (n=2), 20+32 (n=1), 19+39 (n=3), 19+32 (n=2) e 39+32 (n=1), exceto na combinação 20+19 (Tabela VIII). Quatro misturas tiveram diminuição na susceptibilidade ao BZ representadas por OPS21 cl11+MAS cl1, OPS21 cl11+SO3 cl5, Gamba cl1 + IVV cl4 e Gamba cl1 + SO3 cl5, todas consistindo em combinações dos clones do genótipo 19 com 39 ou 32 (Tabela VIII). Por outro lado, cinco infecções mistas apresentaram aumento na susceptibilidade ao BZ sendo estas misturas Bug2148 cl1 + MAS cl1, Cuica cl1 + SO3 cl5, P209 cl1 + SO3 cl5, Bug2148 cl1 + OPS21 cl11, P209 cl1 + IVV cl4 (Tabela VIII). Essas mudanças também não puderam ser correlacionadas à virulência prévia dos clones nas monoinfecções (Tabela VIII).

Tabela VIII. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol de infecções mistas com clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais que apresentaram mudança em relação ao resultado esperado considerando as monoinfecções com cada clone presente na mistura.

Combinação Genotípica	Misturas de clones (A+B)	Virulência[1]	ICO clone A	ICO clone B	ICO Mistura	Perfil de susceptibilidade ao BZ da mistura
20+39	P209 cl1+SO3 cl5	+/-	0	100	35	PS
20+39	Cuica cl1 +SO3 cl5	-/-	0	100	42,9	PS
20+32	P209 cl1+IVV cl4	+/+	0	40	50%	PS
19+39	Gamba cl1+SO3 cl5	+/-	40	100	0	R
19+39	OPS21 cl11 +Bug2148 cl1	-/+	0	40	62,5	PS
19+39	OPS 21 cl11+SO3 cl5	-/-	100	100	40	PS
19+32	Gamba cl1+IVV cl4	-/+	40	40	16,7	R
19+32	OPS21 cl11 +MAS cl1	-/-	100	100	14,3	R
39+32	Bug2148 cl11 +MAS cl1	+/-	0	100	83,3	S

[1] Virulência dos clones considerando seu comportamento biológico previamente determinado por Toledo *et al*. (2002).
ICO: índice cura observado, no qual ICO clone A ou B corresponde ao índice de cura observado para os clones nas monoinfecções e ICO Mistura ao índice de cura observado para a infecção mista correspondente. Em negrito encontra-se o fenótipo de susceptibilidade ao BZ esperado para a mistura. As infecções mistas foram classificadas segundo o critério proposto por Filardi & Brener (1987): R = Resistente: índice de cura ≤ 33%; PS = Parcialmente susceptível: 33% < índice de cura < 66% e S = Susceptível: índice de cura ≥ 66%.

Desse modo, não foi possível estabelecer uma correlação estreita entre a genética dos clones presentes nas combinações e o perfil de susceptibilidade ao BZ, bem como, com a tendência de mudança do perfil de susceptibilidade a este fármaco. Entretanto, a combinação de clones do genótipo 19 em infecções mistas pareceu favorecer a mudança para um perfil de maior resistência ao BZ, uma vez que foram observadas alterações em 50% das misturas contendo clones desse genótipo. Em duas dessas misturas as mudanças só foram reveladas pela caracterização molecular que mostrou a predominância do clone mais susceptível na combinação após tratamento (dados descritos no item 4.3.5).

4.4 Análise da Freqüência de Positividade do kDNA do T. cruzi nos Tecidos

4.4.1 Positividade Global da PCR em Diferentes Tecidos de Animais Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT)

A PCR em tecido foi capaz de detectar o kDNA do *T. cruzi* nos diferentes tecidos examinados provenientes de animais infectados com as diferentes combinações genotípicas submetidos ou não ao tratamento (Figura 7 e 8). As taxas de positividade da PCR foram superiores a 60% nos tecidos coletados de animais INT coletados na FA da infecção (Figura 7A). O coração, músculo esquelético e baço foram os tecidos com maior positividade para o kDNA do parasito nessa fase da infecção. Nos tecidos de animais INT, coletados durante a FC, foi observada uma redução significativa da positividade da PCR em relação à observada nos tecidos coletados durante a FA, exceto para o coração e o cólon. As taxas de positividade variaram de 80,4% a 17,3% e, o coração e o músculo esquelético também foram os tecidos com maiores taxas de detecção do kDNA do *T. cruzi* durante a FC (Figura 7A).

No grupo de animais infectados e tratados com BZ (IT) as taxas de positividade da PCR na FA, variaram de 54,6% a 6,8%, sendo a maior freqüência de positividade detectada também no coração e no músculo esquelético. A positividade da PCR variou de 79,1% a 25,6% nos tecidos de animais que foram submetidos ao tratamento e tiveram seus tecidos coletados durante a FC (Figura 7B) e a bexiga passou a representar um importante sítio para a detecção do kDNA do *T. cruzi*.

Quando foram comparados os resultados obtidos para tecidos coletados na FA e crônica da infecção, foram observadas diferenças significativas para os diferentes tecidos com maior positividade verificada nos tecidos coletados na FC, ou seja, analisados longo período após o término do tratamento.

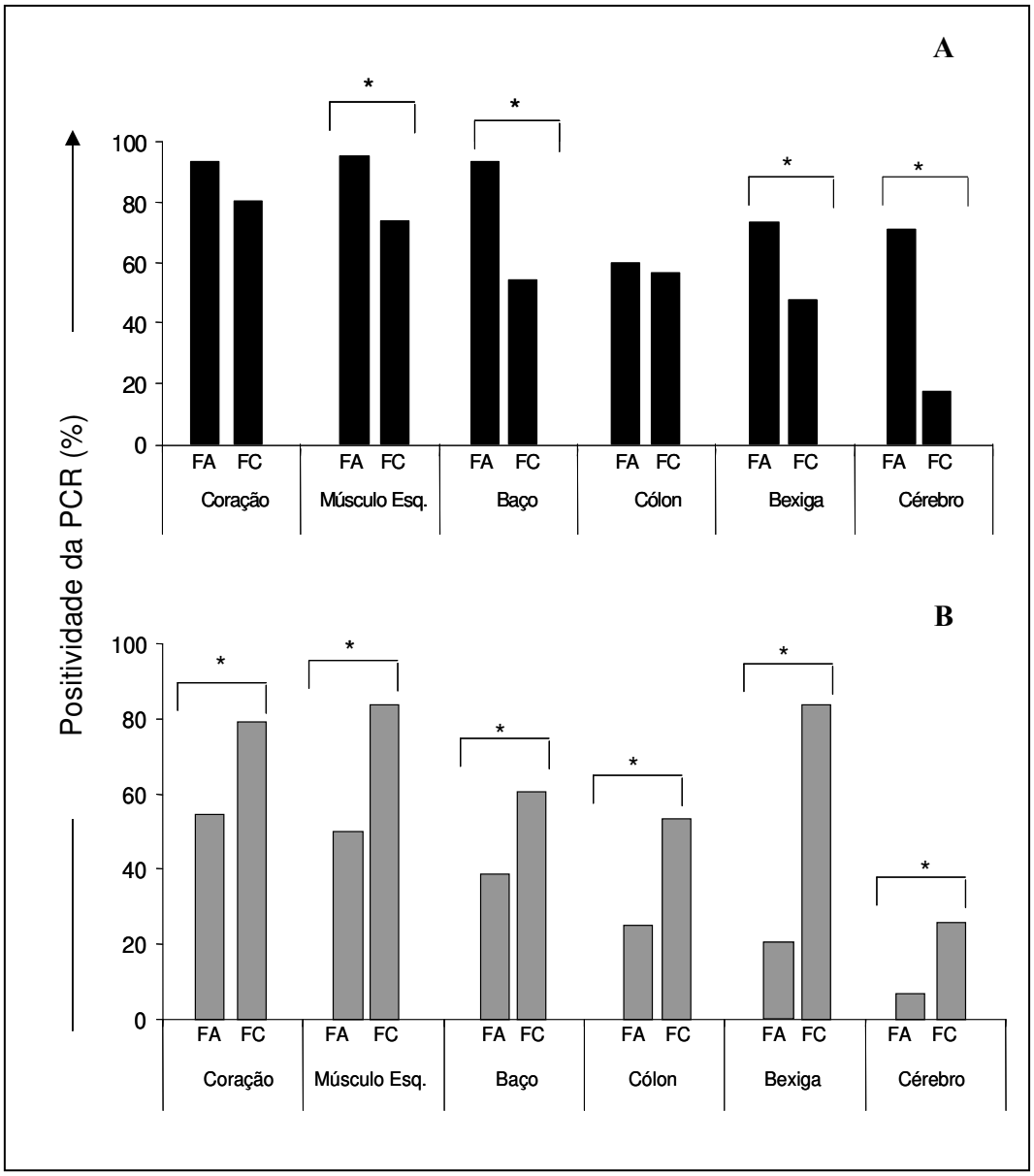


Figura 7. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (▭IT, n = 48) a partir do 10º dia após infecção (d.a.i.) e de seus respectivos controles infectados não tratados (■ INT, n = 48). Os tecidos foram coletados na fase aguda (FA: entre o 31º e 35º d.a.i.) e crônica da infecção (FC: entre o 121º e 125º d.a.i.).
*: mostra diferença significativa entre a freqüência de positividade de kDNA do *T. cruzi* em tecidos de animais coletados nas fases aguda e crônica da infecção.

A presença de kDNA do *T. cruzi* foi significativamente menor durante a FA nos tecidos de animais IT do que nos tecidos de seus respectivos controles (INT). Entretanto, esse comportamento não foi observado na FC. O tratamento não promoveu redução significativa da positividade da PCR em nenhum dos tecidos avaliados nessa fase. Curisoamente, a bexiga de animais submetidos ao tratamento demonstrou maior taxa de positividade para o kDNA do que a coletada de animais INT (Figura 8).

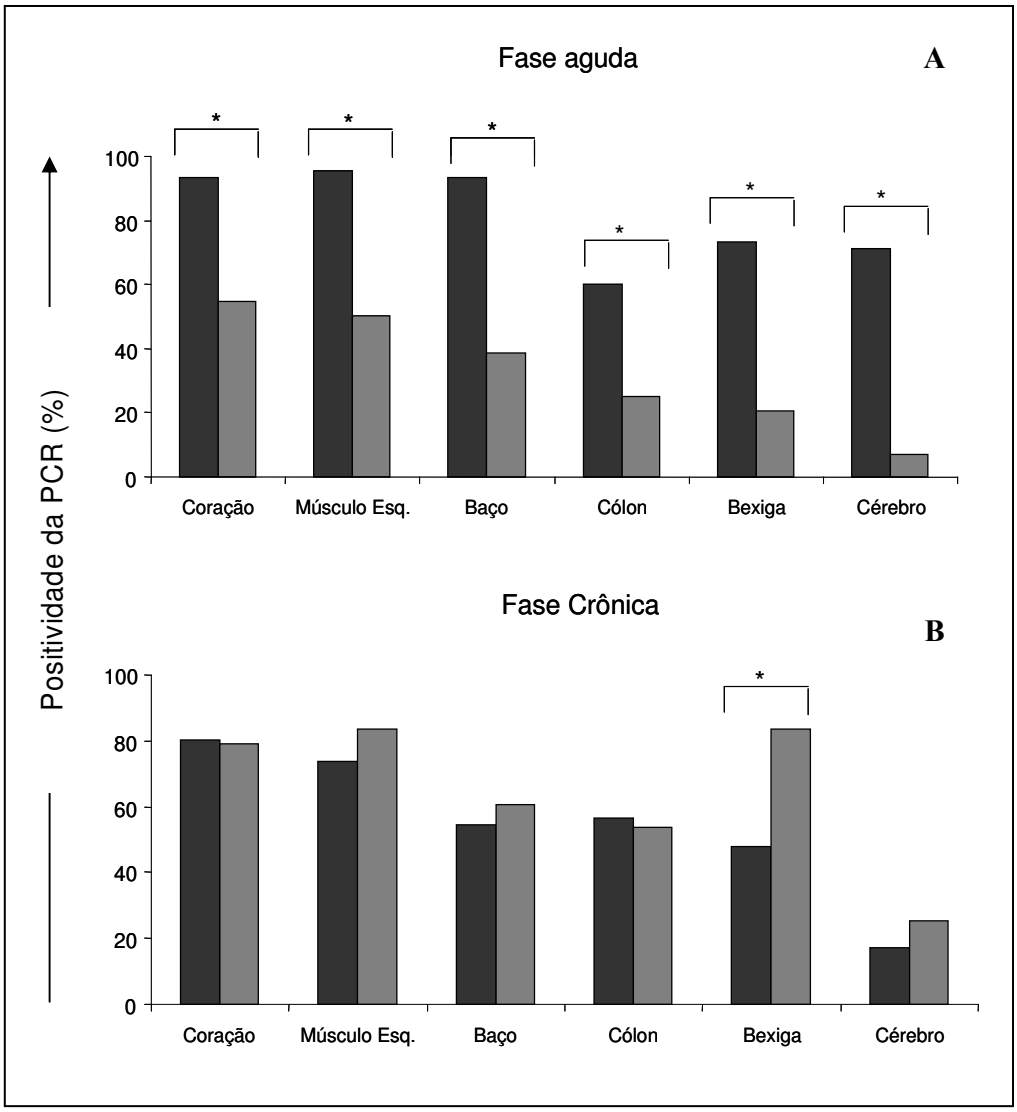


Figura 8. Comparação entre a positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de animais infectados e tratados com Benzonidazol (▭IT, n = 48) a partir do 10º dia após infecção (d.a.i) e de seus respectivos controles infectados não tratados (■ INT, n = 48). Os tecidos foram coletados na fase aguda (FA: entre o 31º e 35º d.a.i.) e crônica da infecção (FC: entre o 121º e 125º d.a.i.).
* : mostra diferença significativa entre a positividade detectada nos tecidos de animais INT e IT.

4.4.2 Positividade Global da PCR no Conjunto de Tecidos de Animais Infectados e Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT) Agrupados Segundo a Combinação Genotípica.

A influência das combinações genotípicas na freqüência da positividade da PCR no conjunto de tecidos também foi avaliada nos animais INT e IT (Figura 9), sendo o comportamento semelhante ao observado na análise da positividade global da PCR por tecido. Animais INT infectados com as diferentes combinações genotípicas apresentaram elevada taxa de positividade para o kDNA do *T. cruzi* com maior positividade, detectada em tecidos de animais infectados com a combinação 20+19 (83,4%) e menor positividade em tecidos de animais infectados com as combinações 39+32 e 20+32 (68,5%) coletados durante a FA da infecção. As taxas de positividade variaram de 62,5% a 37,5% nos tecidos coletados durante a FC, sendo significativamente menores que as detectadas na fase aguda em todas as combinações, exceto na combinação 20+39 (Figura 9A).

Animais infectados com as diferentes combinações genotípicas e submetidos ao tratamento apresentaram taxa de positividade da PCR entre 39,1 e 22,9% em tecidos coletados na fase aguda da infecção, que foram semelhantes as obtidas em tecidos coletados na FC para a maioria das combinações. Nas combinações 20+19 e 19+39 foram observadas taxas de positividade da PCR significativamente maiores durante a fase crônica da infecção (Figura 9 B).

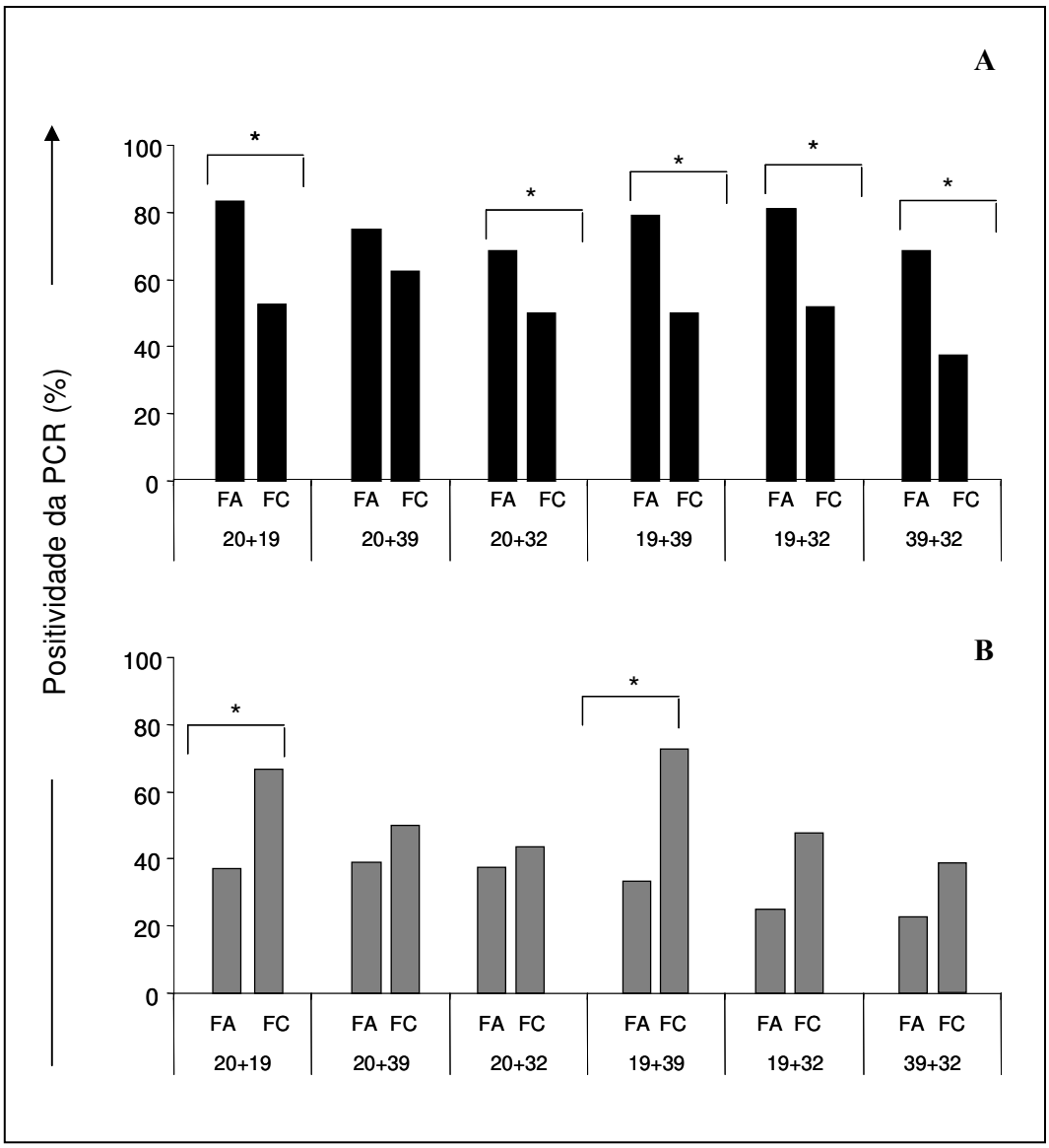


Figura 9. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados com esse parasito e tratados com BZ (▭ IT, n = 48) a partir do 10º dia após infecção (d.a.i.) de seus respectivos controles infectados não tratados (■ INT, n = 48) agrupados por combinação genotípica. Os tecidos foram coletados na fase aguda (FA: entre o 31º e 35º d.a.i.) e crônica da infecção (FC: entre o 121º e 125º d.a.i.).
* mostra diferença significativa entre a freqüência de positividade de kDNA do *T. cruzi* em tecidos de animais coletados na fase aguda e crônica da infecção.

O tratamento reduziu significativamente a detecção do kDNA nos tecidos de animais IT comparativamente aos dos animais INT quando esses foram coletados logo após o término do tratamento (FA) – Figura 10A. O mesmo efeito não foi observado quando foram analisados tecidos coletados três meses após o término do tratamento (FC). Um exemplo pode ser visto em animais infectados com a mistura dos genótipos 19+39, na qual foi verificado aumento significativo da positividade da PCR em tecido após o tratamento (Figura 10B).

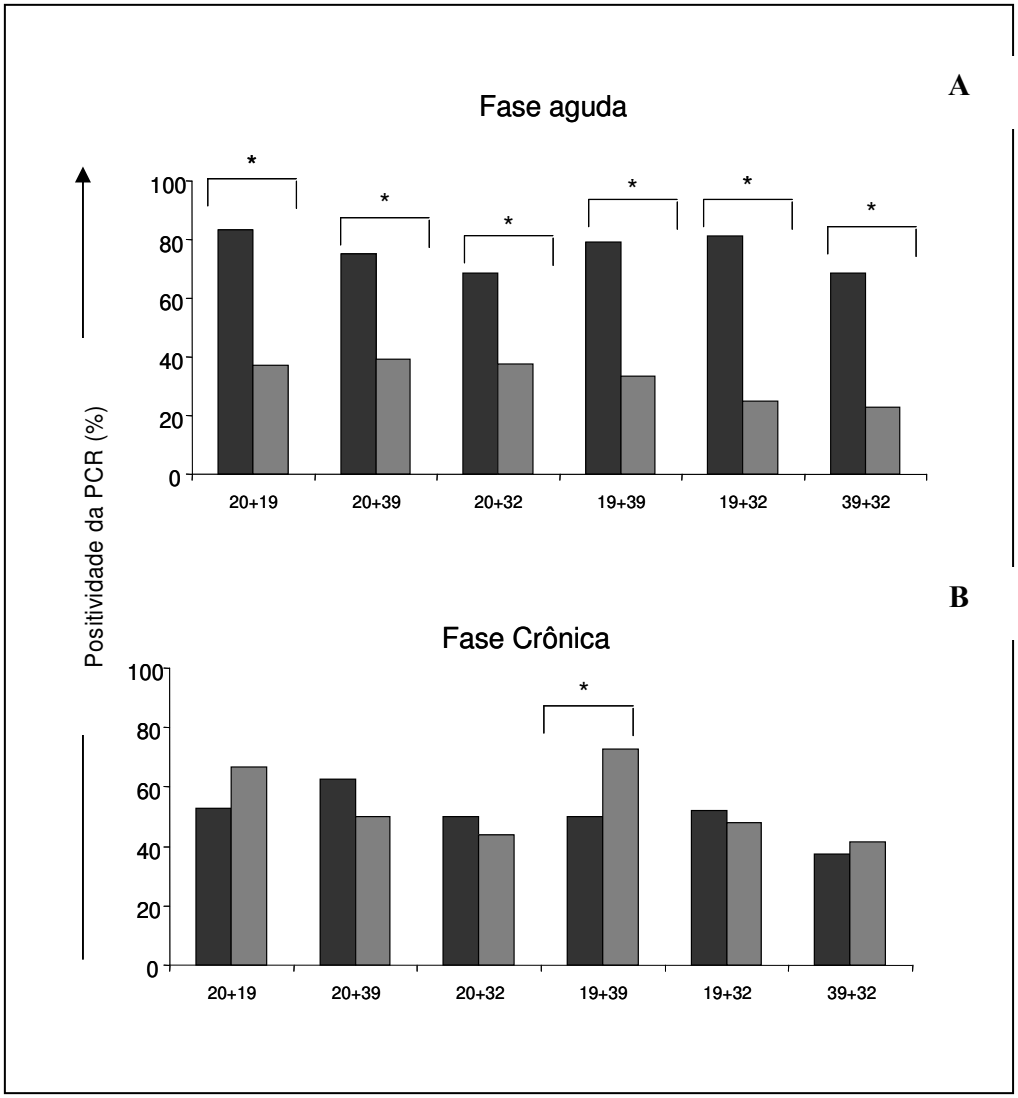


Figura 10. Comparação entre a positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (▭ IT, n = 48) a partir do 10º e de seus respectivos controles infectados não tratados (■ INT, n = 48) agrupados segundo a combinação genotípica. Os tecidos foram coletados na fase aguda (FA: entre o 31º e 35º d.a.i.) e crônica da infecção (FC: entre o 121º e 125º d.a.i. – FC: fase crônica).
* : mostra diferença significativa entre a positividade detectada nos tecidos de animais INT e IT.

4.4.3 Positividade da PCR em Tecidos de Animais Infectados Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT) Considerando Cada Tecido e Combinação Genotípica Individualmente

Os resultados da positividade da PCR em tecidos foram heterogêneos quando cada tecido foi analisado separadamente e de acordo com a combinação genotípica (Figura 11). O tratamento promoveu redução em mais de 40% na positividade da PCR em 16 dos 36 tecidos coletados imediatamente após tratamento (FA), sendo que essa redução foi ainda significativa na bexiga e no cérebro de animais infectados com estoques da combinação 20+19; na bexiga de animais infectados com clones da combinação 20+3; no músculo esquelético de animais infectados com clones da combinação 20+32; no baço de animais infectados com clones da combinação 19+39 e no músculo esquelético e no baço de animais infectados com a combinação 19+32 e 39+32, quando esses foram analisados na fase aguda da infecção (Figura 11).

No entanto, aumento da positividade da PCR em mais de 40% também observado após o tratamento, mas sempre em tecidos coletados entre 120 e 125 dias de infecção, durante a FC, principalmente no cólon e na bexiga de animais infectados com clones da combinação 20+19; no cólon e bexiga de animais infectados com clones da combinação 20+39; na bexiga de animais infectados com clones da combinação 20+39 e no baço e na bexiga de animais infectados com clones da combinação 19+39 (Figura 11).

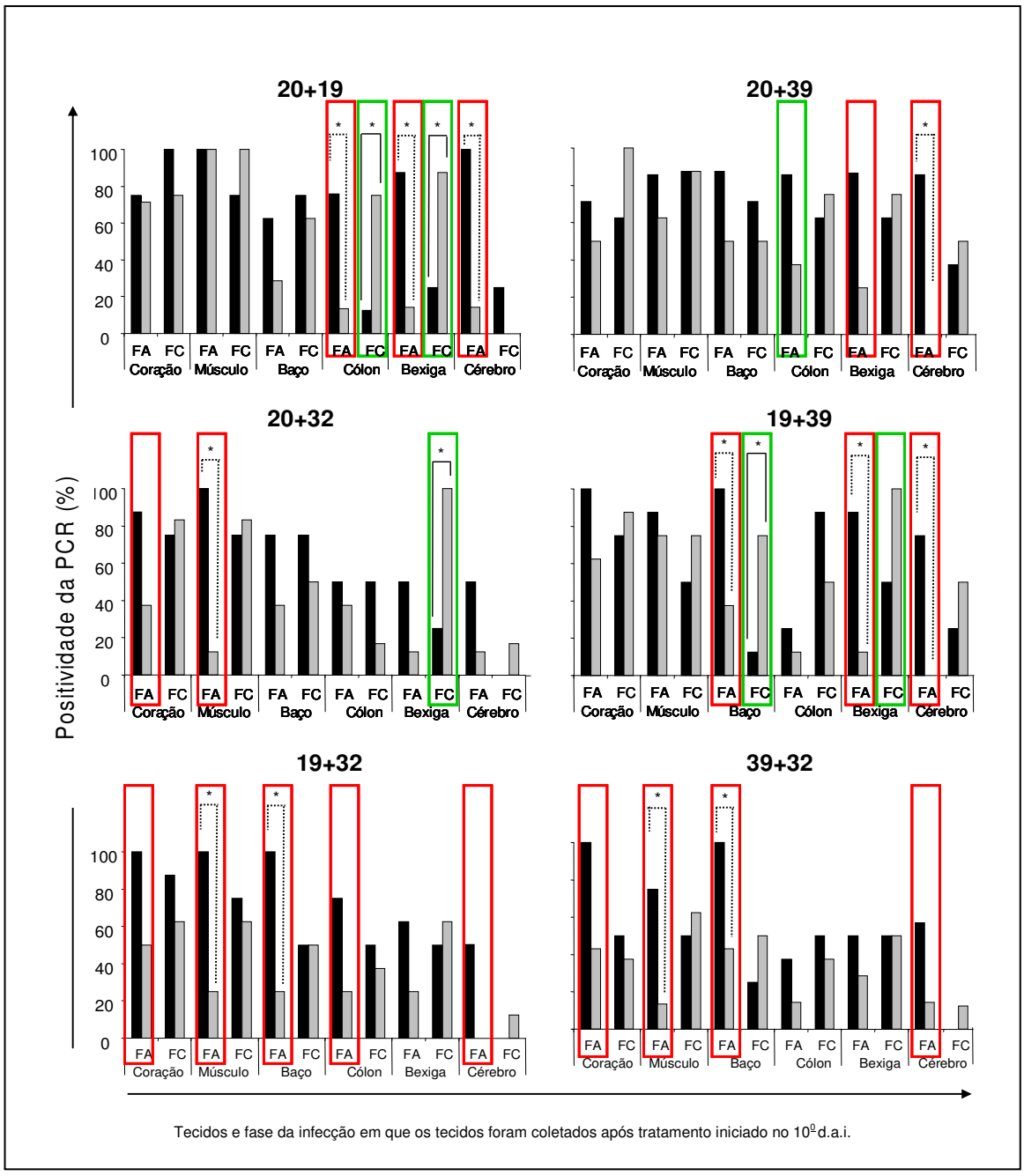


Figura 11. Comparação entre a positividade da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados e tratados com Benzonidazol (▭ IT, n = 48) a partir do 10º dia após infecção (d.a.i.) e de seus respectivos controles infectados não tratados (■ INT, n = 48). Os tecidos foram coletados na fase aguda (FA: entre o 31º e 35º d.a.i.) e crônica da infecção (FC: entre o 121º e 125º d.a.i.) e os resultados são mostrados por combinação genotípica. Tecidos destacados em vermelho apresentaram redução na positividade da PCR em mais de 40% após tratamento. Tecidos destacados em verde apesentaram aumento na positivdade da PCR em mais de 40% após tratamento. * : mostra diferença significativa entre a taxa de positividade da PCR em tecidos de animais INT e IT.

4.4.4 PCR em Tecidos em Animais Tratados Curados (TC)

A PCR para detecção do kDNA do *T. cruzi* foi também realizada em animais considerados curados por outros métodos sorológicos e parasitológicos classicamente empregados no controle de cura após tratamento da infecção. Com esse intuito, foram selecionados aleatoriamente dois animais infectados com cada uma das misturas de clones do *T. cruzi* pertencentes aos genótipos princiais, sendo no total 48 animais avaliados. Desse total, 12 animais foram considerados TC pelos testes parasitológicos e sorológicos utilizados no critério de cura clássico e 36 foram classificados como TNC. Somente animais TC previamente infectados com as combinações genotípicas 20+19 (em que não houve cura) e com a combinação 20+32 (que não foram selecionados pelo processo aleatório) não foram analisados.

Os resultados demonstraram que pelo menos 2/6 tecidos analisados apresentaram PCR positiva para o kDNA do *T. cruzi* em todos os animais tratados curados avaliados. Similarmente ao observado no grupo de animais INT, o coração e o músculo esquelético foram novamente os tecidos que apresentaram maior freqüência de resultados positivos na PCR (Figura 12). Entretanto, tanto nos animais TNC quanto ns TC, a bexiga revelou ser um importante órgão a ser avaliado. Na Figura 12, estão ilustrados resultados positivos representativos da PCR obtidos em diferentes tecidos de animais do grupo TC.

Quando os resultados da PCR em tecidos dos animais TC foram avaliados considerando cada combinação genotípica, foi verificado que animais infectados com as combinações 20+39 e 19+39 apresentaram positividade para todos os seis tecidos analisados (Figura 13), sendo que na combinação 20+39 foram detectados DNA do parasito em 100% dos tecidos analisados. Em animais infectados com a combinação 19+32 apenas o coração e a bexiga foram positivos. Nos animais infectados com a combinação 39+32, com exceção do cérebro, os demais tecidos foram positivos para o kDNA do parasito, porém com taxas inferiores as observadas nas demais combinações.

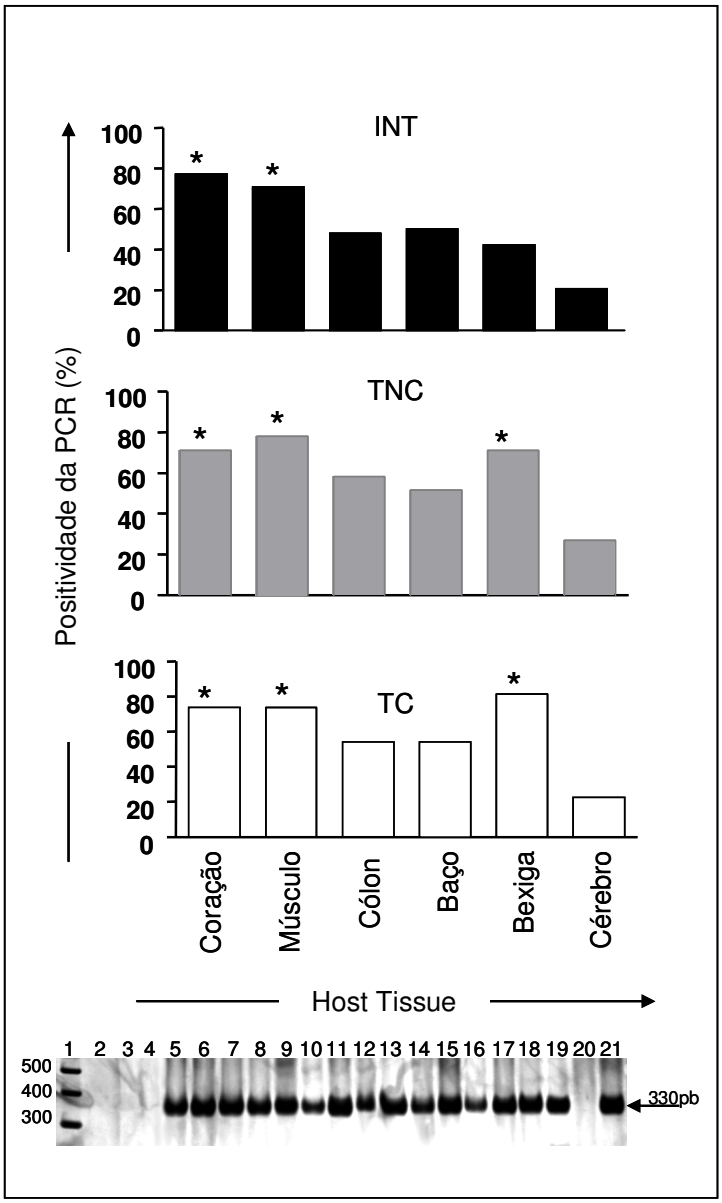


Figura 12. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em tecidos de camundongos BALB/c infectados com diferentes combinações genotípicas desse classificados como infectados não tratados (INT= ■), tratados não curados (TNC= ▬) e tratados curados (TC= ▭), considerando o critério proposto por Krettli & Brener (1982).
* : representa tecidos com maior taxa de positividade. Canaleta 1: perfil do padrão de tamanho molecular de 100pb de DNA; Canaleta 2: controle de reagentes usado durante a extração do DNA; Canaleta 3: controle de reagentes usado durante a PCR. Canaleta 4: fragmento do coração coletado animal não infectado; Linhas 5-10: mostram resultados de tecidos de animais infectados com a mistura Cuica cl1+Bug2148 cl1 (20+39) positivos na PCR (coração, músculo esquelético, colon, baço, bexiga e cérebro, respectivamente). Canaletas 11-16: tecidos de animais infectados com a mistura OPS21 cl11+IVV cl4 (19+32); Canaletas 17-20: tecidos de animais infectados com a mistura SO3 cl5+MAS cl1 (39+32) incluindo coração, baço, bexiga e cérebro, respectivamente. Canaleta 21: controle positivo coletado de animal infectado com a cepa Y.

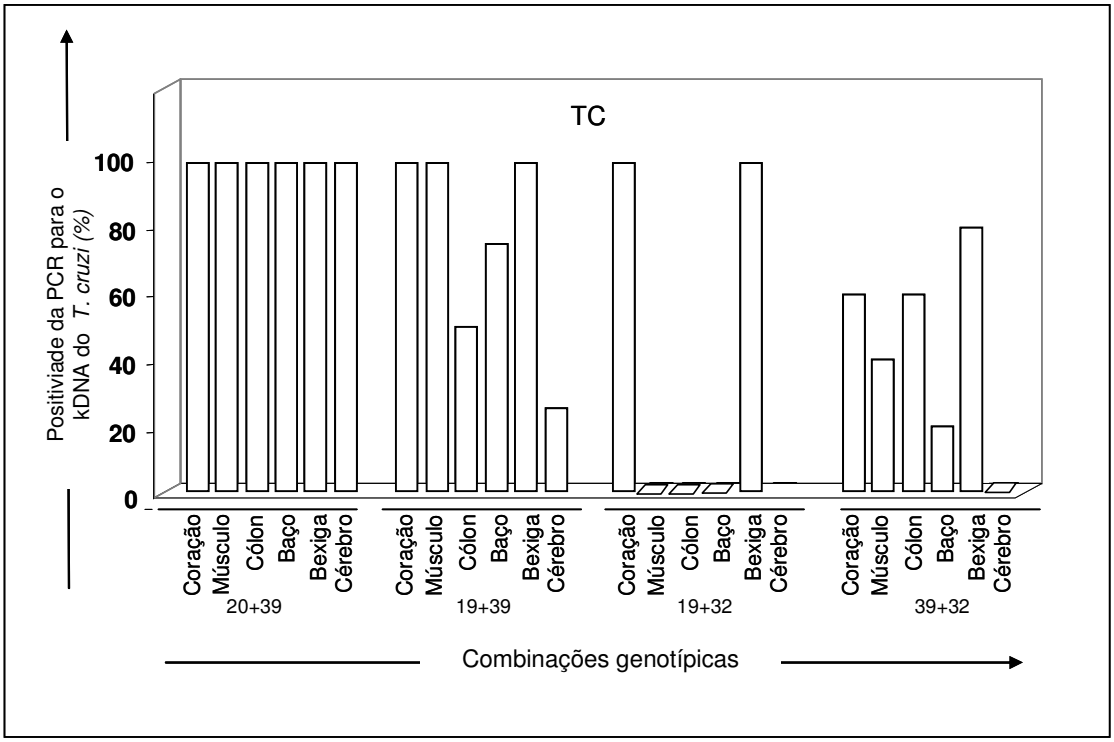


Figura 13. Positividade da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em tecidos de camundongos BALB/c infectados com diferentes combinações genotípicas desse parasito (20+39, 19+39, 19+32 e 39+32), tratados durante a fase aguda da infecção e considerados curados pelo critério proposto por Kretlli & Brener (1982).

4.5 Identificação das Populações do Trypanosoma cruzi Presentes nas Amostras Biológicas de Camundongos BALB/c Infectados por Combinações de Clones Pertencentes aos Genótipos Principais

4.5.1 Análise Molecular dos Padrões de Referência dos Oito Clones do *T. cruzi* Pertencentes aos Genótipos Principais em Estudo

As amostras de extrato enzimático e de DNA obtidas dos clones do *T. cruzi* foram previamente caracterizadas por meio do perfil eletroforético de isoenzimas e de microssatélites para serem empregadas como padrões nas análises moleculares.

4.5.1.1 Padronização da Análise de Isoenzimas para os Oito Clones do *T. cruzi* em Estudo

Na análise isoenzimática foram utilizados quatro sistemas enzimáticos (GPI, G6PD, ICD e PGM) e os resultados obtidos para cada um dos clones estão mostrados na Figura 14. Cada enzima empregada nesse estudo apresentou perfis distintos para os clones pertencentes aos genótipos 19/20, 39 e 32. O padrão de referência do clone Cuica cl1 inesperadamente apresentou perfis de isoenzimas distintos dos demais clones dos genótipos 19/20 para as quatro enzimas estudadas (Figura 14). Clones pertencentes aos genótipos 39+32 apresentaram sobreposição nos perfis de bandas eletroforéticas detectados para as enzimas ICD e PGM e, portanto, somente as enzimas GPI e a G6PD foram capazes de discriminaram misturas contendo esses genótipos. As quatro enzimas utilizadas não foram capazes de diferenciar os clones dos genótipos 19 e 20. Somente a enzima fosfogluconato desidrogenase (6PGD), não analisada neste trabalho, é capaz de diferenciar esses genótipos. O genótipo 20 apresenta duas bandas eletroforéticas, sendo uma delas coincidente com a observada no genótipo 19. Conseqüentemente, em infecções mistas essa enzima também não é capaz de distinguir se há uma mistura de clones dos genótipos 20+19 ou somente a presença do genótipo 20.

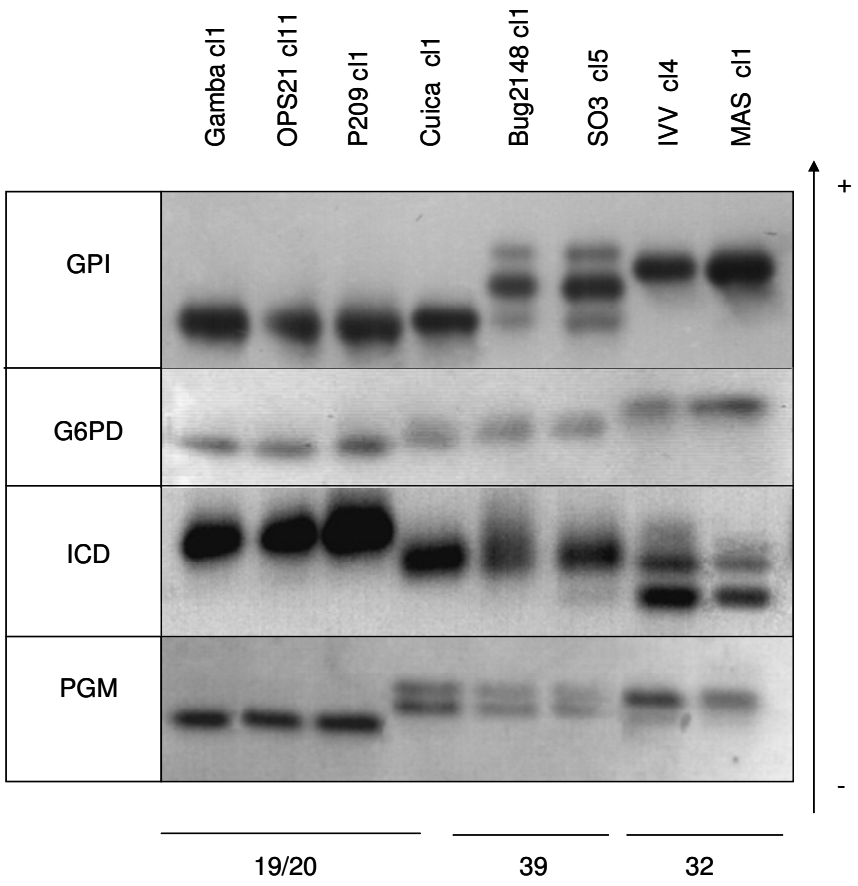


Figura 14. Perfis eletroforéticos das enzimas GPI, G6PD, ICD e PGM dos clones do *Trypanosoma cruzi*, pertencentes aos genótipos principais 19, 20, 19 e 32. A seta indica o sentido de migração, (-) representa o catodo e (+) anodo no sistema eletroforético.

4.5.1.2 Padronização da Análise de Microssatélites para os Oito Clones do *T. cruzi* em Estudo

Os DNA(s) obtidos das amostras de referência dos oito clones do *T. cruzi*, utilizados nesse estudo, foram caracterizado por meio da análise de oito locos de microssatélites cujos resultados estão descritos na Tabela IX. Na análise dos clones, foram observados apenas um ou dois alelos de microssatélites para sete dos oito padrões analisados. Esses resultados são compatíveis com o esperado para populações clonadas (Tabela IX). Entretanto, o clone Cuica cl1, utilizado como referência nesse estudo, apresentou três ou quatro alelos de microssatélites, resultado previsto para populações policlonais e foi, portanto, excluído do estudo da relação filogenética entre os clones pertencentes aos genótipos principais. Esses resultados juntamente com os observados na análise isoenzimática motivaram novas investigações para melhor caracterizar esse "clone".

A relação filogenética dos clones em estudo foi realizada utilizando o tamanho dos alelos de microssatélites para cada loco, por meio do método da máxima parcimônia. A topologia da rede de Wagner mostrou a existência de dois agrupamentos, o primeiro contendo os clones pertecentes a DTU1 ou *T. cruzi* I (genótipos 19 e 20) e o segundo pertencente a DTU2 que por sua vez contém os grupos de *T. cruzi* e *T. cruzi* II (genótipos 39 e 32) - Figura 15.

Tabela IX. Tamanho dos alelos em pares de base identificados nos clones do *Trypanosoma cruzi* nos oito locos de microssatélites analisados.

Linhagens	Genótipos	Clones	LOCOS DE MICROSSATÉLITES							
			SCLE10	**TcTAC15**	**TcTAT20**	**TcAAT8**	**TcAAAT6**	**TcATT14**	**TcGAG10**	**TcCAA10**
***T. cruzi* I**	**19**	**Gamba cl1**	253/255	96/96	184/184	235/235	239/255	250/253	144/144	125/152
		OPS21 cl11	255/257	96/96	178/178	229/229	255/255	250/250	144/144	125/125
		P209 cl1	239/255	96/96	178/178	229/235	255/255	253/253	144/144	125/125
	20	**Cuica cl1**	239/253/255/275	96/141	181/181	235/292	239/255	250/253/271	138/144	131/155
T. cruzi	**39**	**Bug2148 cl1**	255/289	99/99	184/220	250/292	259//271	265/274	129/144	131/152
		SO3 cl5	255/289	99/99	184/220	250/292	259/271	265/274	131/144	131/152
***T. cruzi* II**	**32**	**IVV cl4**	289/289	99/99	181/223	238/250	259/271	262/262	129/144	152/152
		MAS cl1	271/289	99/99	187/205	250/259	259//275	253/262	132/144	146/155

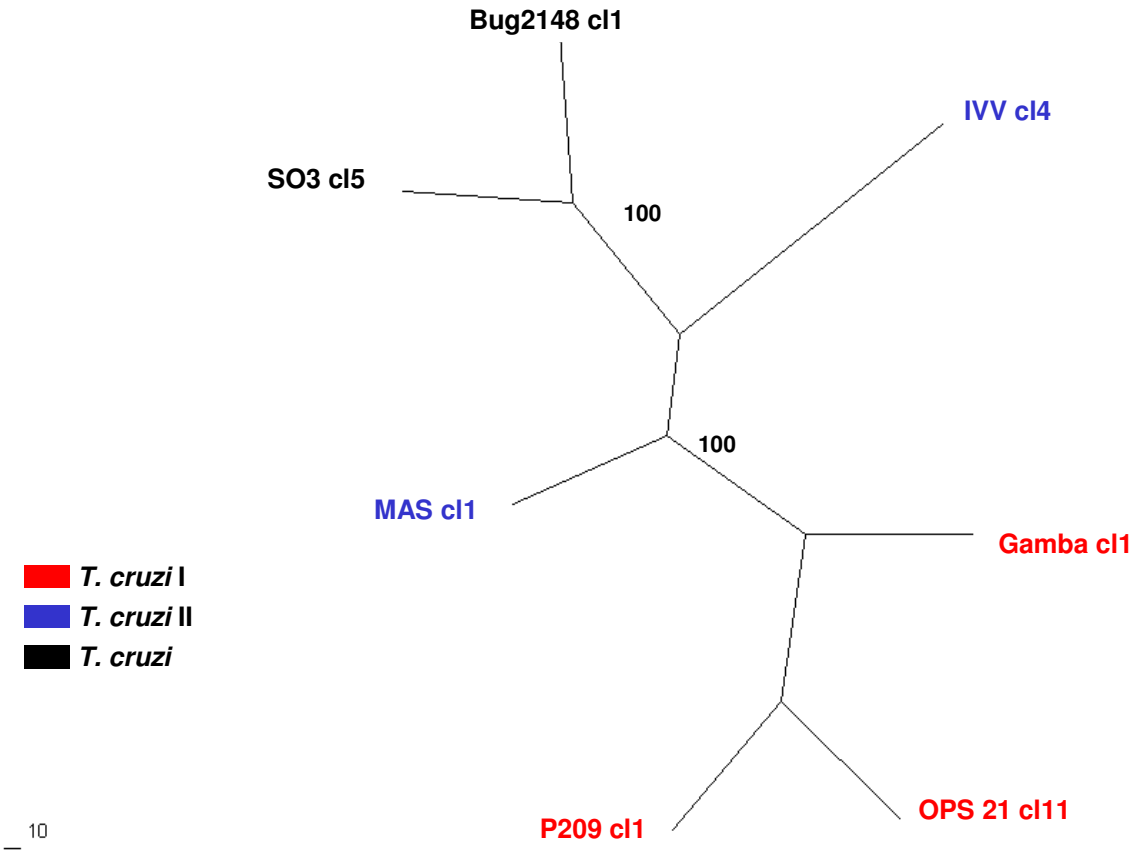


Figura 15. Rede de Wagner construída pelo método de máxima parcimônia, a partir dos dados obtidos das análises de sete locos de microssatélites (TcTAC15, TcTAT20, TcAAT8, TcAAAT6, TcATT14, TcGAG10 e TcCAA10) para os clones do *T. cruzi* utilizados neste trabalho. Os clones da linhagem *T. cruzi* I estão representados em vermelho, os da linhagem *T. cruzi* II em azul e os da linhagem *T. cruzi* em preto. Os níveis de significância de cada ramificação nesta rede foram realizados por *bootstrapping* usando o programa SEQBOOT do pacote de programas PHYLIP versão 3.67 e estão indicados por número no ramo separando os dois agrupamentos observados.

Os locos de microssatélites foram também avaliados quanto à eficácia na amplificação e na distinção dos dois clones presentes em misturas teóricas de DNA combinados em diferentes proporções. A identificação de ambos os clones foi bem sucedida na maioria dos casos, quando seus respectivos DNA(s) encontravam-se misturados na proporção 1:9 ou 9:1 (Figura 16A, Linhas 2 e 6). Entretanto, em alguns casos, ambos os clones somente foram identificados quando seus DNA(s) foram misturados na proporção de 3:1 ou 1:3 (Figura 16B, Linhas 3 e 5).

Entre os locos utilizados o TcAAAT6 foi o que apresentou melhores resultados na amplificação das amostras analisadas. Entretanto, esse loco não permitiu distinguir clones geneticamente próximos. Em função disso, quatro outros locos (SCLE10, TcAAT8, TcTAT20, TcCAA10) foram selecionados para a identificação dos clones do *T. cruzi* presentes em isolados de animais infectados com as diferentes misturas do parasito, inicialmente, obtidos por meio da hemocultura e cultivado em meio LIT.

Posteriormente amostras de DNA obtidas diretamente do sangue e de tecidos foram também submetidas à análise pelos mesmos locos já mencionados, exceto pelo SCLE10, que foi substituído pelo loco TcATT14 ou TcCAA10, uma vez que as regiões flanqueadoras da seqüência de microssatélites para esse loco são curtas e não permitiriam o desenho de iniciadores mais externos para serem utilizados na PCR *Nested* .

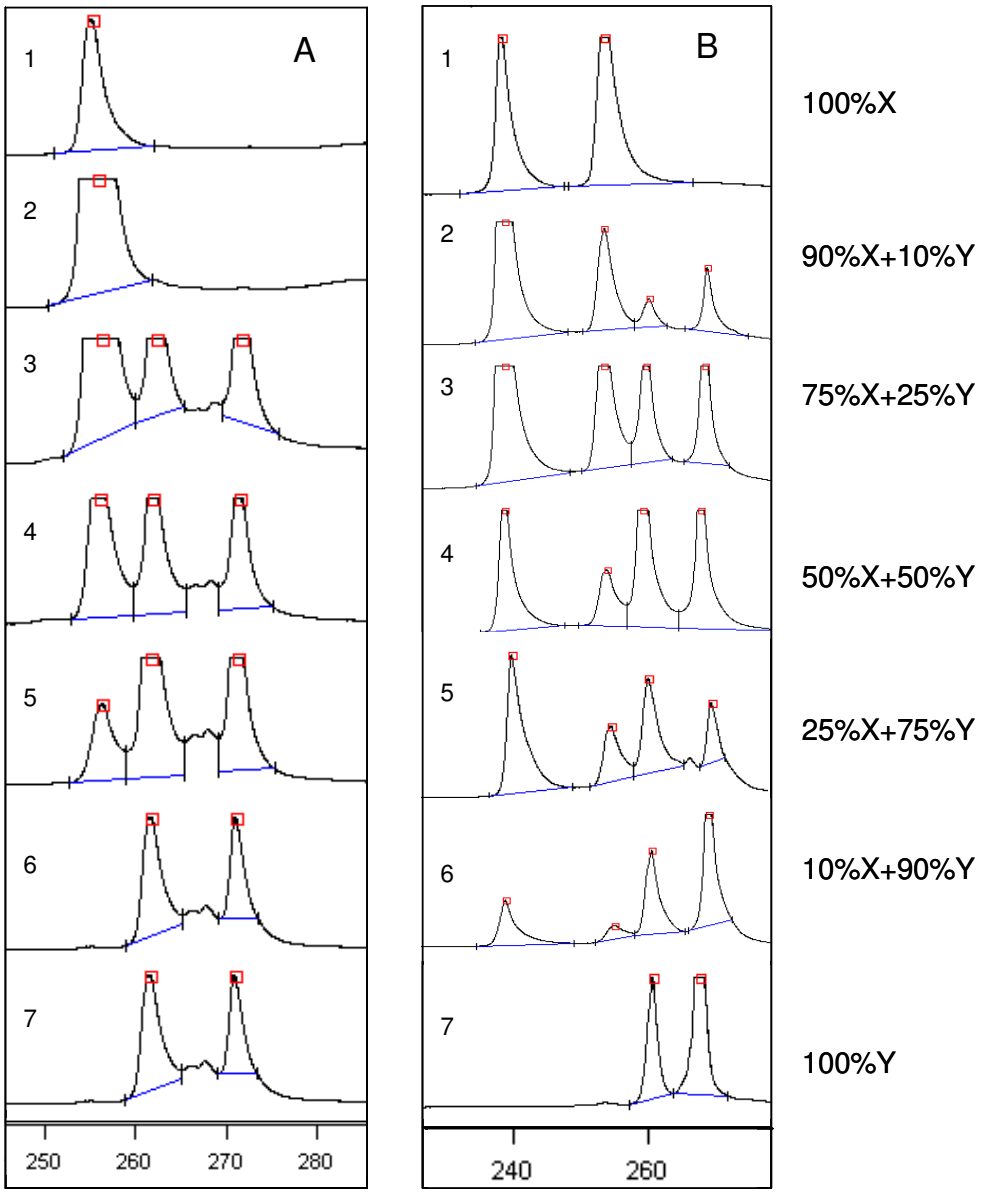


Figura 16. Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise dos alelos de microssatélites amplificados para o loco TcAAAT6 no seqüenciador automático de DNA A.L.F. feita em misturas teóricas de DNA do *Trypanosoma cruzi* (X+Y). A: Mistura dos estoques P209 cl1+SO3 cl5 (combinação 20+39), B - Gamba cl1+IVVcl4 (combinação 19+32).

Linha 1A: contém DNA de referência do clone P209 cl1. Linha 7B: contém DNA de referência do clone SO3 cl5. Linhas 1B: contém DNA de referência do clone Gamba cl1. Linhas 7B: contém DNA de referência para o clone IVV cl4. Linhas 2-6A contêm misturas de DNA dos clones P20 cl1 e Gamba cl1 em diferentes proporções. Linhas 2-6B: contém misturas dos clones Gamba cl1+So3 cl5 em diferentes proporções. Os picos correspondem aos fragmentos de microssatélites amplificados, sendo detectado para o clone P209 cl1 um fragmento de 255pb, SO3 cl5 e IVV cl4 (259/271pb) e Gamba cl1 (239pb/255pb).

4.5.2 Análises Adicionais do Clone Cuica cl1

A clonagem do até então denominado clone Cuica cl1 por *FACS Cell Sorter* seguida da análise de microssatélites demonstrou que esse apresentava pelo menos duas populações distintas. A Figura 17 mostra os resultados obtidos para o loco TcTAC15 onde uma população apresentou um alelo de 141pb (linhas 7 -10 e 13 - 21) e outra, um alelo de 96pb (linhas 11 e 12).

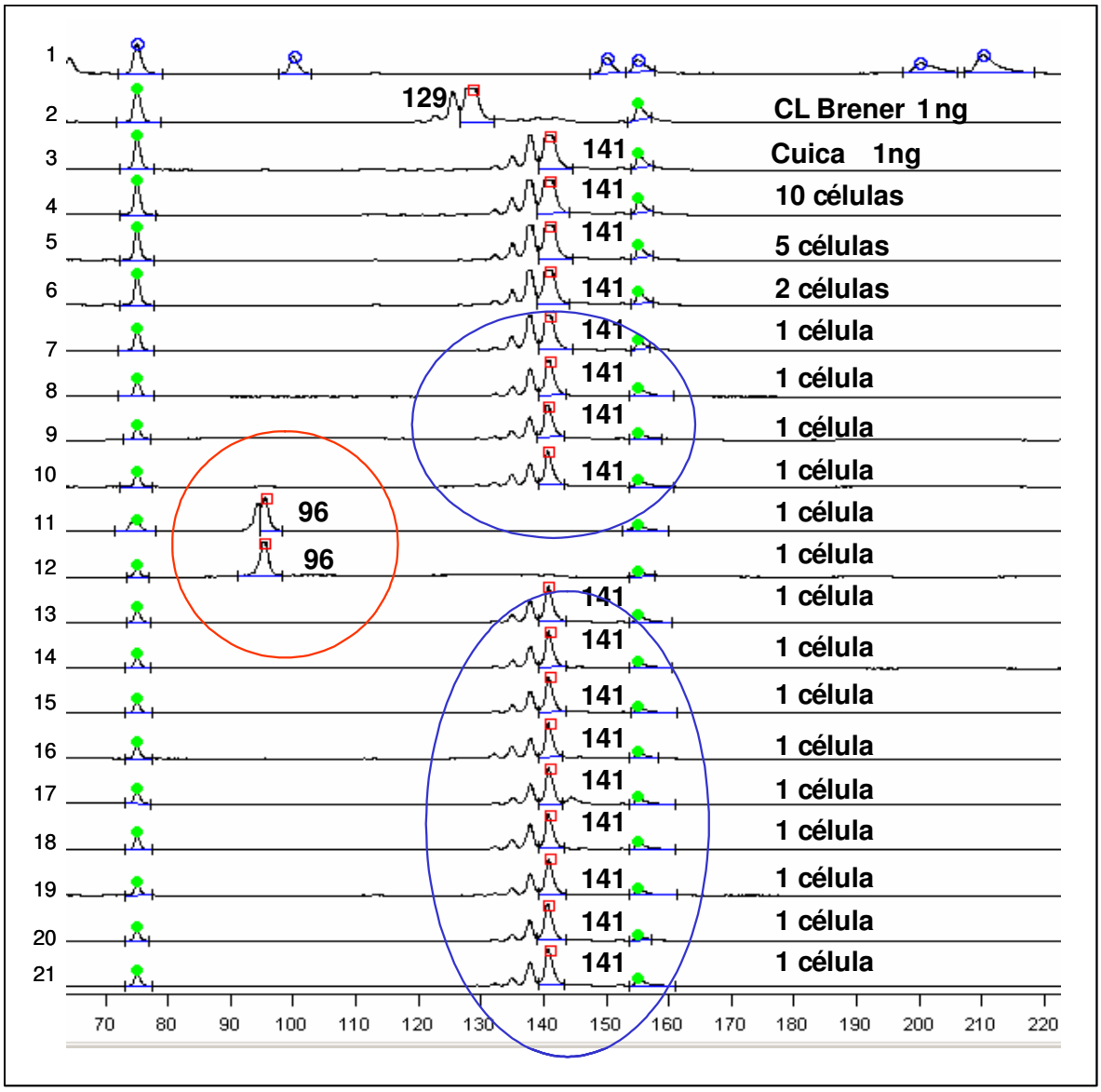


Figura 17. Eletrofluograma obtido a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos alelos do loco TcTAC15 de microssatélites em células únicas do clone Cuica cl1 do *Trypanosoma cruzi*. Os números representam o tamanho dos alelos em pares de bases, os picos de 75pb e 155pb são os padrões internos e os picos da linha 1 a escala alélica, ambos utilizados para o alinhamento da corrida.

A população que apresentou o alelo de 141pb foi denominada C1 e a que apresentou o de 96pb de C2 e, foram também diferenciadas pelos locos SCLE10, TcTAC15, TcAAAT6, TcATT14 e TcAAT8 (Tabela X). Nas primeiras caracterizações do "clone" Cuica cl1 apenas a população C1 foi detectada. Posteriormente, quando a concentração de DNA utilizado nas amplificações foi aumentada, a população C2 também foi detectada. Esses dados indicam que a população C1 estava presente em maior concentração no até então denominado clone Cuica cl1 em relação à população C1. As análises dos resultados da clonagem corroboram essas observações uma vez que a freqüência de isolamento da população C1 foi significativamente maior que a da população C2 (P =0,014).

Tabela X. Tamanho dos alelos de microssatélites, em pares de base, identificados para as populações C1 e C2 presentes no "clone" Cuica cl1 do *Trypanosoma cruzi*.

	Locos				
Amostras	**SCLE10**	**TcTAC15**	**TcAAAT6**	**TcATT14**	**TcAAT8**
C1	239/275	141/141	232/250/259	271/271	292/292
C2	253/253	96/96	250/259	250/253	235/235

Esses achados no "clone" Cuica cl1 estimularam novas investigações. Nesse sentido, foram realizadas análises comparativas dos perfis eletroforéticos de isoenzimas e de microssatélites entre o "clone" Cuica cl1 empregado nesse estudo proveniente da França em 2002 e outro que estava mantido criopreservado desde sua introdução no Laboratório de Doença de Chagas em 1997, que foi aqui denominado Cuica cl1A.

Ao contrário do observado para o "clone" Cuica cl1, a amostra Cuica cl1A apresentou perfil de isoenzimas compatível com o constatado para os outros clones dos genótipos 19/20. No entanto, essas diferenças moleculares não foram associadas à alteração no perfil de susceptibilidade ao BZ, sendo ambos os clones 100% resistentes a esse fármaco.

Os resultados da análise do perfil de microssatélites demonstraram que ambas as populações (C1 e C2, descritas acima) estavam presentes nos dois clones analisados, porém em proporções diferentes. No "clone" Cuica cl1, a população predominante foi a C1, enquanto no clone Cuica cl1A a população predominante foi a C2. Entretanto, no clone Cuica cl1A a população C1 não pôde ser detectada na maioria das amplificações.

4.5.2.1 Caracterização molecular do "clone" Cuica do *T. cruzi* após manutenção em cultura e em camundongos

Após a obtenção dos resultados descritos anteriormente, o "clone" Cuica cl1 foi mantido em condições distintas de manuseio para esclarecer os resultados obtidos. Desse modo, amostras desse clone foram mantidas em fase estacionária de crescimento, em cultura acelular, por aproximadamente oito meses e em camundongos Swiss, por meio de passagens sangüíneas sucessivas em intervalos regulares de 20 dias, até a 15ª, passagem. Os parasitos foram reisolados destes animais por hemocultura na 5ª e 15ª passagens, cultivados em meio LIT e analisados em paralelo à amostra deste mesmo estoque mantida por longo período em cultura.

Os resultados da análise do perfil de isoenzimas demonstraram que a população obtida na 5ª passagem em camundongos e aquela mantida por longo período em cultura apresentaram perfis semelhantes ao do "clone" Cuica cl1. Já a população do *T. cruzi* obtida na 15ª passagem apresentou perfil semelhante ao da população C2 compatível com os clones do genótipo19/20 (Figura 18).

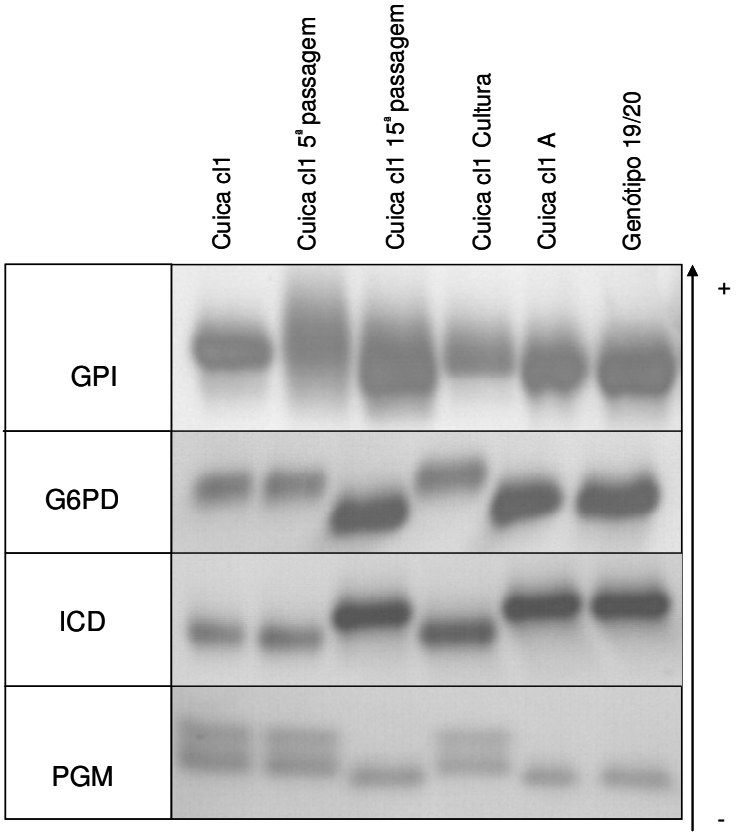


Figura 18. Perfis eletroforéticos das enzimas GPI, G6PD, ICD e PGM observados no estoque Cuica cl1 do *Trypanosoma cruzi* em cultura acelular e em camundongos *Swiss* (5ª e 15ª passagens). A seta indica o sentido de migração, (-) representa o catodo e (+) representa o anodo no sistema eletroforético.

Os resultados da PCR de microssatélites corroboraram os obtidos na análise isoenzimática e demonstram que o manuseio laboratorial do "clone" Cuica cl1 promoveu alteração na dinâmica das populações C1 e C2 presentes na amostra original. Dessa maneira, foi observado que após cerca de oito meses de manutenção em cultura, apenas a população C1 foi detectada pelo perfil de microssatélites. Por outro lado, a manutenção no hospedeiro vertebrado favoreceu a população C2, em todos os locos analisados. Curiosamente, a população do parasito, isolada após cinco passagens em camundongos demonstrava a presença da população C1, enquanto na 15ª passagem foi detectada apenas a população C2 (Figura 19).

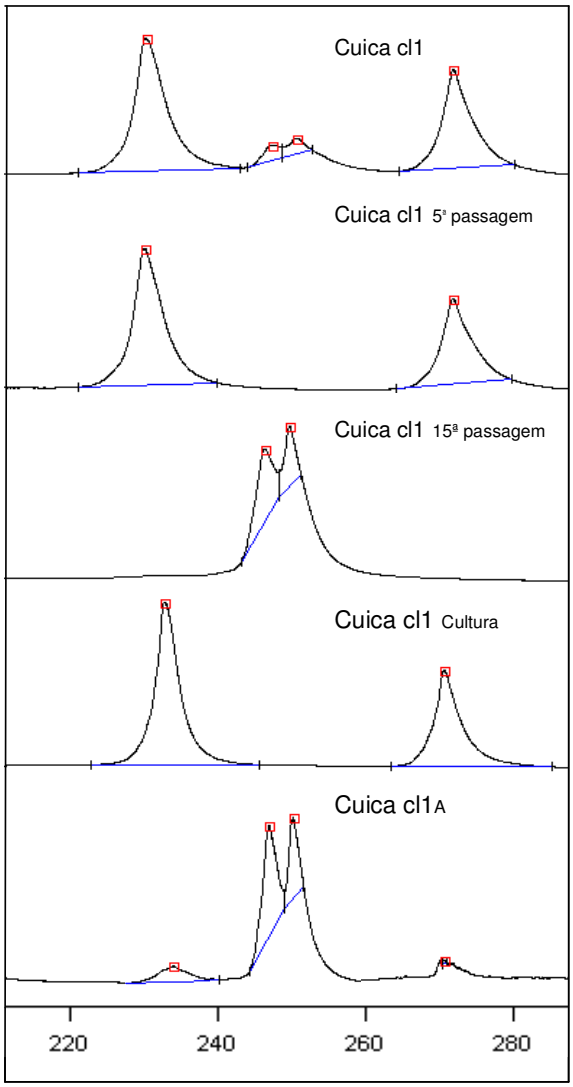


Figura 19. Eletrofluograma obtido a partir da análise no sequenciador automático de DNA A.L.F. dos alelos de microssatélites do loco SCLE10 do clone Cuica cl1 do *Trypanosoma cruzi*, após sua manutenção em cultura acelular e em camundongos *Swiss* (5ª e 15ª passagens). Os picos representam o tamanho dos alelos em pares de bases, sendo a escala indicada na parte inferior.

4.5.3 Identificação dos Isolados do *Trypanosoma cruzi* Obtidos por Hemocultura dos Animais Infectados com Misturas dos Genótipos Principais pelas Análises de Isoenzimas e Microssatélites

A identificação dos clones do *T. cruzi* foi realizada em 180 isolados provenientes de animais infectados com as diferentes misturas do parasito. Desses, 78 amostras foram obtidas de animais TNC e 102 de seus respectivos controles INT. Resultados representativos dos padrões de isoenzimas para a GPI estão demonstrados na Figura 20 e os resultados de microssatélites estão descritos na Tabela XI.

Misturas de clones do *T. cruzi* foram observadas em apenas 7,7% dos isolados (14/180), dos quais 6,8% foram obtidos de animais TNC (7/102) e 9,0% de animais INT (7/78) - Tabela XI, sendo predominantemente observadas na combinação genotípica 20+19.

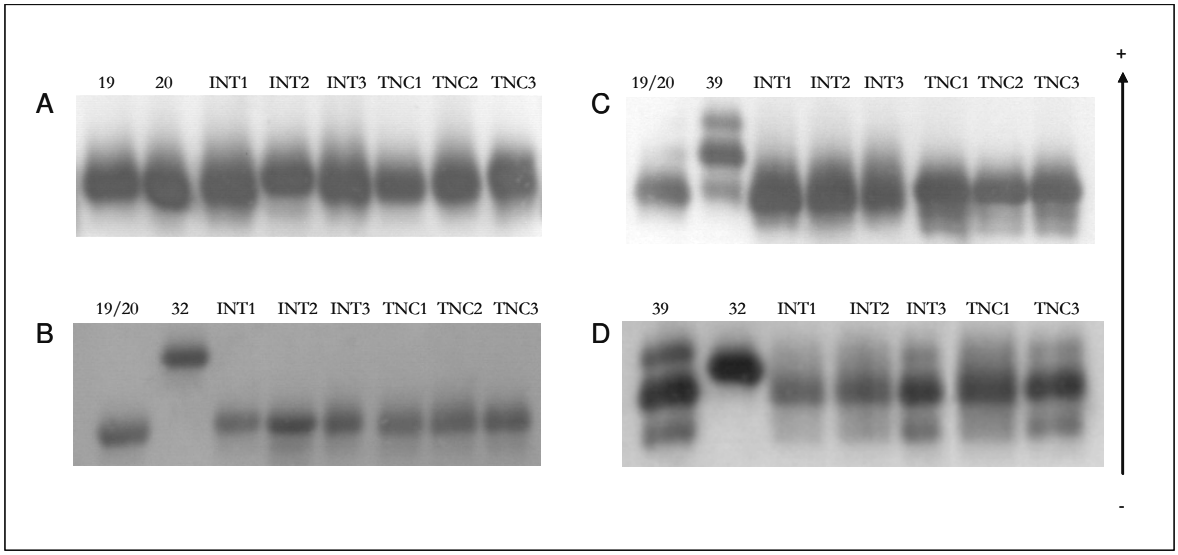


Figura 20. Perfis eletroforéticos da enzima GPI representativos dos resultados obtidos para isolados de animais com diferentes combinações genotípicas do *Trypanosoma cruzi*. A: Combinação 19+20. B: 19/20+39. C: Combinação 19/20+32. D: 39+32. 19, 20, 39 e 32: padrões dos clones dos genótipos principais. INT: isolados de animais infectados não tratados. TNC: isolados de animais infectados tratados e não curados. A seta indica o sentido de migração, (-) representa o catodo e (+) o anodo no sistema eletroforético.

Clones do genótipo 39 só foram detectados em combinações com o genótipo 32, enquanto esse último nunca foi detectado em nenhuma associação (Tabela XI e Figura 20).

Em combinações 20+19, ambos os genótipos foram isolados dos animais TNC e INT. Entretanto, a freqüência de cada clone nas misturas dessa combinação foi bastante heterogênea.

Curiosamente, em animais infectados com a mistura Cuica cl1+Gamba cl1 (clone do genótipo 20, 100% resistente ao BZ + clone do genótipo 19, 40% susceptível ao BZ em infecções simples), o clone Gamba cl1 foi detectado em quatro de cinco isolados provenientes de animais INT e em todos os animais TNC (6/6). Em animais infectados com a mistura P209 cl1+Gamba cl1 (clone do genótipo 20, 100% resistente ao BZ + clone do genótipo 19, 100% susceptível ao BZ em monoinfecções) os dois clones foram observados na mesma proporção em animais INT (6 e 5/6, respectivamente), enquanto em animais TNC foi observada uma predominância do clone P209 cl1 (5/6) - Figura 21. Na mistura P209 cl1+ OPS21 cl11 (clone do genótipo 20, 100% resistente ao BZ em monoinfecções + clone do genótipo 19, 100% susceptível ao BZ), embora ambos os estoques tenham sido observados na mesma proporção em animais INT (3/6), somente clone suscept OPS21 cl11 foi observado em animais TNC (5/5) – Tabela XI.

Tabela XI - Identificação de isolados do *Trypanosoma cruzi* provenientes de camundongos BALB/c infectados com diferentes misturas dos genótipos principais*.

Genótipos	Clones do *T. cruzi*	Locos	INT		TNC	
			Tamanho de alelo (bp)	*Clone de **T. cruzi** (n)*	*Tamanho de alelo (bp)*	*Clone de T. cruzi (n)*
20+19	**P209 cl1** +Gamba cl1	SCLE10	253/255+239/255	P209 cl1 (6) + Gamba cl1 (5)	253/255, 239/255	P209 cl1 (5))+ Gamba cl1(1
20+19	**Cuica cl1**+Gamba cl1	TcTAT20	184/184+181/181	Cuica cl1 (2) + Gamba cl1 (5)	181/181, 184/184	Cuica cl1 (1) + Gamba cl1 (6)
20+19	**P209 cl1**+OPS21 cl11	SCLE10	255/257+ 239/255	P209 cl1 (3)+ OPS21 cl11 (3)	255/257	OPS21 cl11 (5)
20+19	**Cuica cl1**+OPS21 cl11	SCLE10	255/257239+/275,253/255	Cuica cl1 (4)+ OPS21 cl11 (2)	255/257,253/255	Cuica cl1 (4) + OPS21 cl11 (1)
20+39	**P209 cl1+Bug2148 cl1**	TcAAAT6	255/255	P209 cl1 (4)	255/255	P209 cl1 (6)
20+39	**Cuica cl1 +Bug2148 cl1**	TcAAAT6	239/255 + 271/275	Cuica cl1 (2) + Indeterminado (2)	239/255, 271/275	Cuica cl1 (2) + Indeterminado (2)
20+39	**P209 cl1** +SO3 cl5	TcAAAT6	255/255	P209 cl1 (5)	255/255, 263/263	P209 cl1 (4) + Indeterminado (3)
20+39	**Cuica cl1**+ SO3 cl5	TcAAAT6	239/255 + 263/263	Cuica cl1 (4) + Indeterminado (1)	239/255	Cuica cl1 (3)
20+32	**P209 cl1**+IVV cl4	TcAAAT6	255/255	P209 cl1 (5)	255/255	P209 cl1 (2)
20+32	**Cuica cl1** +IVV cl4	TcAAAT6	239/255	Cuica cl1 (5)	239/255	Cuica cl1 (6)
20+32	**P209 cl1** +MAS cl1	TcAAAT6	255/255	P209 cl1 (5)	255/255	P209 cl1 (3)
20+32	**Cuica cl1**+ MAS cl1	TcAAAT6	239/255	Cuica cl1 (5)	239/255	Cuica cl1 (4)
19+39	Gamba cl1+**Bug2148 cl1**	SCLE10	239/255	Gamba cl1 (6)	239/255, 271/275	Gamba cl1 (3) + Indeterminado (2)
19+**39**	OPS21 cl11+**Bug2148 cl1**	TcAAAT6	255/255	OPS21 cl11 (6)	255/255	OPS21 cl11 (3)
19+39	Gamba cl1 +SO3 cl5	TcAAAT6	239/255	Gamba cl1 (5)	239/255	Gamba cl1 (6)
19+39	OPS21 cl11+SO3 cl5	-	-	-	-	-
19+32	**Gamba cl1**+IVV cl4	TcAAAT6	239/255	Gamba cl1 (5)	239/255	Gamba cl1 (2)
19+32	**Gamba cl1**+MAS cl1	TcAAAT6	239/255	Gamba cl1 (4)	239/255; 263/263	Gamba cl1 (4) + Indeterminado (2)
19+32	OPS21 cl11+IVV cl4	TcAAAT6	263/263	Indeterminado (2)	263/263	Indeterminado (2)
19+32	OPS21 cl11+MAS cl1	TcAAAT6	263/263	Indeterminado (2)	263/263	Indeterminado (2)
39+32	**Bug2148 cl1** +IVV cl4	TcAAAT8	292/292	Indeterminado (1)	-	-
39+32	SO3 cl5+ IVV cl4 cl4	TcAAT8	292/292	Indeterminado (1)	-	-
39+32	**Bug2148 cl1+** MAS cl1	SCLE10	255/289	Bug2148 cl1 (6)	-	-
39+32	SO3 cl5+MAS cl1	TcAAT8	250/292	SO3 cl5 (5)	-	-

O tamanho dos alelos está expresso como número de pares de bases (pb). Em **negrito**: genótipos e clones do *Trypanosoma cruzi* resistentes ao Benzonidazol e que, portanto, deveriam ser detectados preferencialmente nas misturas. Em cinza genótipos e clones do *Trypanosoma cruzi* parcialmente susceptíveis ao Benzonidazol. Em letra normal: genótipos e clones do *Trypanosoma cruzi* parcialmente susceptíveis ao Benzonidazol. Sublinhado: representa isolados em que houve a predominância após tratamento do clone do *T. cruzi* mais susceptível ao Benzonidazol nas respectivas monoinfecções. Indeterminado: representa isolados cujo tamanho de alelos não foram compatíveis com o esperado para os clones originais de *Trypanosoma cruzi* utilizados na infecção dos animais. (-) Representa combinações em que os clones não foram recuperados após a infecção dos animais.

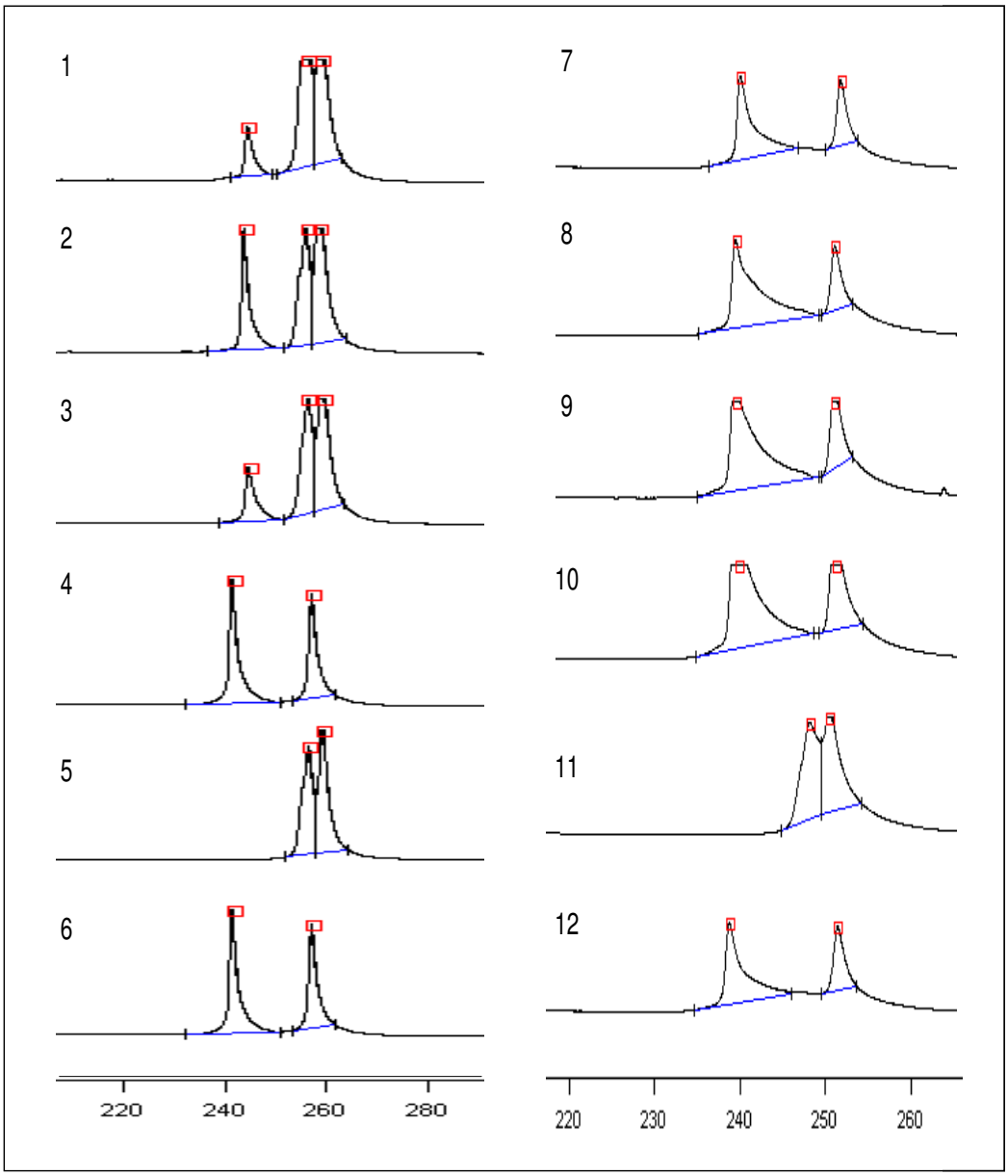


Figura 21. Eletrofluograma obtido a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos alelos de microssatélites amplificados para o loco SCLE10 de isolados de animais infectados com a mistura P209 cl1+Gamba cl1 do *Trypanosoma cruzi*. Os picos representam o tamanho dos alelos em pares de bases. Linhas 1-4: Animais infectados e não tratados. Linha 5: padrão de referência do clone Gamba cl1. Linha 6: padrão de referência do clone P209 cl1. Linhas 7-12: animais infectados e tratados com Benzonidazol. A presença de ambos os clones foi detectada apenas nos animais não tratados, enquanto nos tratados houve predomínio do P209 cl1.

Isolados de animais infectados com misturas dos genótipos 19+39 apresentaram apenas os clones do genótipo 19 (Gamba cl1, 40% susceptível ao BZ ou OPS21 cl11, 100% susceptível ao BZ em infecções simples) mesmo quando combinados com o clone Bug2148 cl1, o mais resistente do genótipo 39, que apresentou taxa de cura de 0% nas monoinfecções (Tabela XI e Figura 22).

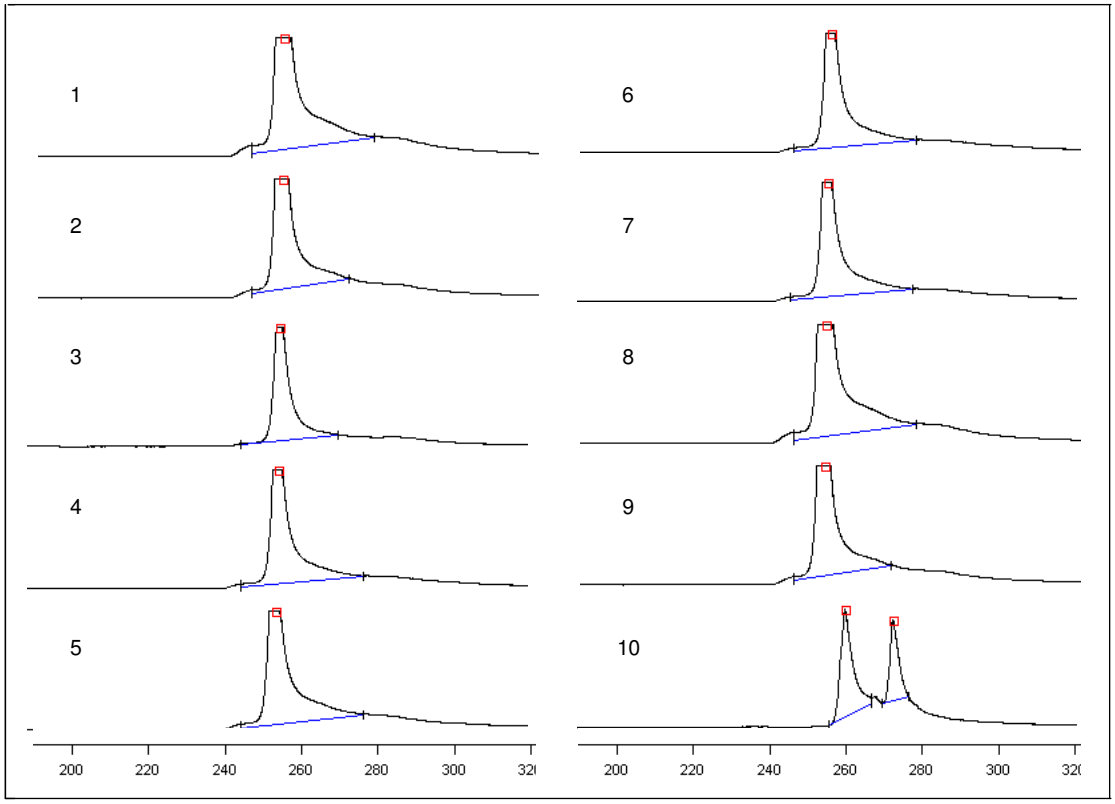


Figura 22. Eletrofluograma obtido a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos alelos de microssatélites amplificados para o loco SCLE10 de isolados de animais infectados com a mistura OPS21cl11+Bug2148 cl1 de *Trypanosoma cruzi*. Os picos representam o tamanho dos alelos em pares de bases, Linhas 1-5: Animais infectados não tratados. Linhas 6-8: animais infectados e tratados com Benzonidazol. Linha 9: clone OPS21 cl11. Linha 10: clone Bug2148 cl1. Nessas infecções apenas o clone sensível ao tratamento foi isolado de ambos os grupos de animais.

4.5.3.1 Mudanças do Perfil Genético em Amostras do *Trypanosoma cruzi* Isoladas de Animais Infectados com Misturas dos Genótipos Principais por Hemocultura e Cultivados em Meio LIT

Resultados intrigantes foram observados no que concerne à detecção de populações do *T. cruzi*, com perfil de isoenzimas e microssatélites distintos dos clones originais utilizados na infecção dos animais. Perfis distintos dos clones inoculados foram detectados pelo perfil de isoenzimas e/ou microssatélites em 15,5% dos isolados avaliados (28/180). Desses, 21 isolados apresentaram mudanças tanto no perfil de isoenzimas quanto no de microssatélites. Contudo, seis isolados apresentaram mudanças apenas no perfil de isoenzimas e um, apenas no perfil de microssatélites. Essas alterações ocorreram em combinações que continham principalmente os clones dos genótipos 39 (18 em 28 camundongos) e 32 (15/28), sendo que 57,1% deles (16/28) foram detectados nos animais TNC e 42,9% (12/28) nos animais INT. Em combinações genotípicas 19+20, não foram detectadas alterações nos perfis de isoenzimas e microssatélites.

A análise de isoenzimas revelou a presença de dois novos perfis distintos do previamente caracterizado para os clones dos genótipos 19/20, 39, 32 e para o "clone" Cuica cl1 (Figura 22). Esses perfis foram denominados de P1 e P2 (Figura 23). Considerando os isolados que apresentaram alterações apenas nos perfis de isoenzimas (6/28), três foram obtidos de animais infectados com a mistura Bug2148 cl1+MAScl1 (39+32) e três com a mistura Gamba cl1+Bug2148l1. Os isolados de animais infectados com a mistura Bug2148 cl1+MAS cl1 apresentaram perfil P2, enquanto aqueles obtidos de animais infectados com a mistura Gamba cl1+Bug2148 cl1 apresentaram combinação de uma população com perfil característico do genótipo 19/20 e outra, com o perfil P2.

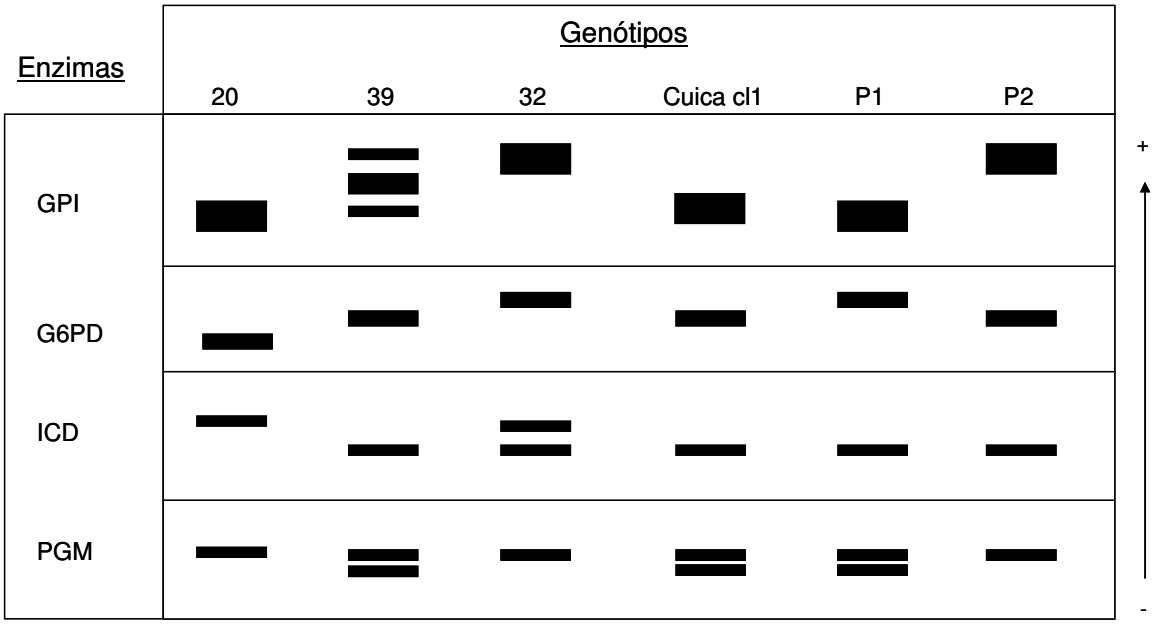


Figura 23. Diagrama representativo dos perfis eletroforéticos das enzims GPI, G6PD, ICD, PGM detectados na caracterização enzimática de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais e de isolados provenientes de animais infectados com misturas desses genótipos. Os perfis P1 e P2 foram padrões inesperados e distintos dos detectados para os clones originais utilizados nas infecções dos animais.

Na análise de microssatélites perfis incompatíveis com os verificados para os clones originais foram inicialmente detectados empregando o loco selecionado para a identificação dos isolados em cada uma das misturas (Tabela XII). Posteriormente, esses isolados foram também caracterizados por outros locos de microssatélites que também demonstraram mudanças no perfil genético desses isolados, que permitiram caracterizar três novos perfis denominados Pi, Pii e Piii. (Tabela XII).

Tabela XII. Perfis de microssatélites inesperados detectados em isolados provenientes de camundongos BALB/c com infecções mistas por clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais.

	Locos			
	TcAAAT6	**SCLE10**	**TcATT14**	**TcAAT**
i	263/263	239/275	271/271	-
ii	271/275	267/267	262/262	259/268
iii	-	239/275	271/275	292/292

O conjunto desses resultados permitiu agrupar os isolados de classificação indeterminada em três grupos distintos, descritos a seguir:

(1) Grupo A – A análise de isoenzimas demonstrou que isolados desse grupo mostraram o perfil um (P1) esquematizado na Figura 23 e apresentaram alelos de microssatélites de 263/263pb para o loco TcAAAT6, de 239/275pb para o loco SCLE10 e de 271/271pb para o loco TcAAT14 (Perfil i) – Tabela XII. A maioria dos isolados com perfis inesperados se enquadraram nesse grupo (14/22), ocorrendo nas combinações genotípicas 20+39 (Cuica cl1+SO3 cl5 e P209 cl1+SO3 cl5) e 19+32 (Gamba cl1+MAS cl1, OPS21 cl11+IVV cl4 e OPS21 cl11+MAS cl1). Os resultados de ambos os marcadores foram concordantes, exceto em dois isolados, um obtido de um animal infectado com a mistura Gamba cl1+MAS cl1 (19+32) e outro com a mistura P209 cl1+SO3 cl5 (20+39). O perfil de isoenzimas do isolado da mistura Gamba cl1+MAS cl1 (19+32) foi compatível com o genótipo 19/20, enquanto no isolado da mistura P209 cl1+SO3 cl5 (20+39) foi detectado apenas o perfil desconhecido (P1). A análise de microssatélites revelou que os isolados de ambas as misturas eram constituídos de uma mistura de um clone do genótipo 19 e outra população com perfil desconhecido Pi.

(2) Grupo B – constituído pelos isolados que apresentaram o perfil dois (P2) na análise de isoenzimas (Figura 23) e perfil de microssatélites Pii (Tabela XII) com alelos de 271/275pb para o loco TcAAAT6, de 267/267pb para o loco SCLE10 e de 262/262pb para o loco TcAAT14. Seis isolados foram observados nesse grupo (6/22) distribuídos entre as combinações genotípicas 20+39 (Cuica cl1+Bug2148 cl1: 4 isolados) e 19+39 (Gamba cl1+Bug2148 cl1: 2 isolados) tanto em animais TNC (4/6) quanto em animais INT (2/6). Dois dos seis isolados apresentaram uma mistura de genótipos 19/20 e outra com perfil P2, detectado pelas enzimas GPI e PGM.

(3) Grupo C – os dois isolados desse grupo foram obtidos de animais infectados com as misturas Bug2148 cl1+IVV cl4 e SO3 cl5+IVV cl4 (39+32) e não tratados. Esses isolados apresentaram o perfil P1 na análise de isoenzimas (Figura 23). E perfil de microssatélites Piii (Tabela XII) com alelos de microssatélites de 292/292pb para o loco TcAAT8, que não foi compatível com o perfil

heterozigoto esperado para os clones desses estoques (250/292pb), de 239/275pb para o loco SCLE10 e de 271/275pb para o loco TcAAT14.

4.6 Identificação dos Isolados do Trypanosoma cruzi por Microssatélites em DNA Obtidos diretamente do Sangue e de Tecidos de Animais Infectados com Misturas dos Genótipos Principais.

A triagem das amostras de sangue para detecção do fragmento de 330pb do kDNA do minicírculo do *T. cruzi* demonstrou que 105 delas foram positivas nos animais TNC e 139, nos animais INT. Contudo, a caracterização dessas amostras pela análise de microssatélites apresentou baixo rendimento. O sucesso de amplificação dos alelos de microssatélites foi obtido em 23,4% das amostras positivas para o kDNA do parasito e ocorreu, predominantemente, em 40 das 57 amostras obtidas de animais INT correspondentes a 70,2%. Amostras de sangue obtidas de animais infectados com todas as combinações genotípicas foram identificadas pelo perfil de microssatélites, exceto as da combinação 39+32, que não apresentaram sucesso de amplificação para nenhuma das amostras positivas para o kDNA.

A amplificação dos alelos de microssatélites dos lisados de tecido e animais INT e TNC apresentou rendimento ainda menor do que o observado para o DNA extraído diretamente das amostras de sangue. Ambos os tecidos analisados (coração e músculo esquelético) demonstraram percentuais semelhantes de positividade para o kDNA, tanto nos animais INT (73,9% = 71/96) quanto nos animais TNC (72,9% = 70/96). Entretanto, somente 12,0% dessas amostras (17/141) puderam ser caracterizadas pelo perfil de microssatélites e a amplificação também foi obtida, predominantemente, em amostras dos animais INT (9/13).

Os resultados da identificação dos isolados do *T. cruzi* nas amostras de DNA obtidas diretamente do sangue ou de tecidos foram semelhantes aos obtidos para as amostras isoladas por hemocultura. Na mistura de clones dos genótipos 19/20 com clones dos genótipos 39 ou 32, apenas aqueles pertencentes aos genótipos 19 ou 20 foram detectados. Na combinação 20+19, ambos os clones pertecentes a esses genótipos foram isolados dos animais TNC e INT, tanto no coração quanto no músculo esquelético.

5. *Discussão*

O *T. cruzi* é composto de clones naturais que apresentam uma ampla heterogeneidade biológica (Revisado por Devera *et al.*, 2003: Buscaglia & Di Noia, 2004). Diversos estudos têm demonstrado que a genética do parasito apresenta correlação com a resposta ao tratamento específico (Andrade *et al.*, 1985a; Andrade *et al.*, 1992; Revollo *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2003), embora certa heterogeneidade de características biológicas seja observada entre os componentes de um mesmo grupo genético (Laurent e*t al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2002; Toledo *et al.*, 2003). Recentemente, foi verificado que em infecções mistas experimentais em camundongos BALB/c (Martins *et al.*, 2006) ocorrem interações entre as populações do *T. cruzi*, que podem resultar em importantes mudanças nas propriedades biológicas do parasito e, conseqüentemente, no curso da infecção. Esses resultados corroboraram outros trabalhos nesse mesmo modelo experimental (Lana *et al.*, 2000) e também em relação ao desenvolvimento no vetor (Pinto *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram obtidos em relação ao tropismo tecidual por Franco *et al.* (2003) em ratos.

Desse modo, considerando a freqüente ocorrência de infecções mistas na natureza e também o fato de que esse tipo de infecção produz alterações significativas na relação parasito-hospedeiro em modelos experimentais, é provável que infecções mistas influenciem na eficácia do tratamento etiológico da infecção pelo *T. cruzi*. Nesse contexto, o objetivo dessa investigação foi avaliar em camundongos BALB/c o impacto de infecções mistas com clones do *T. cruzi* representativos da grande heterogeneidade do parasito. Os clones foram utilizados combinados aos pares constituindo misturas com diferentes níveis de diversidade genética e biológica referentes aos parâmetros de virulência e de susceptibilidade ao BZ previamente conhecidos.

Os resultados aqui obtidos corroboraram essa hipótese e demonstraram claramente que as infecções mistas apresentaram resposta ao tratamento com BZ, distinta da resposta esperada com base nos resultados das monoinfecções, sugerindo que o estabelecimento de correlação entre a genética do parasito e a resposta ao tratamento pode ser ainda mais difícil de ser determinada nessa situação.

Assim, animais experimentalmente infectados com a maioria dos genótipos e suas combinações apresentaram redução significativa em todos os parâmetros relacionados à virulência (PAR, PP, PM e DPMP) após o tratamento, tanto em monoinfecções quanto nas infecções mistas. Esses dados comprovam o forte efeito supressor do BZ sobre a parasitemia, mesmo em animais infectados com clones resistentes a este fármaco e com elevada virulência como já demonstrado na quimioterapia experimental da infecção por estes clones do *T. cruzi*

no modelo murino (Toledo *et al.*, 2003). Martins *et al.* (2006), estudando infecções mistas com alguns destes mesmos clones, verificaram claramente que a virulência das combinações não poderia ser prevista fundamentada apenas no conhecimento do seu comportamento em monoinfecções, uma vez que tanto efeitos de estimulação quanto de inibição de um clone sobre o outro foram observados. Entretanto, essas alterações não foram capazes de exercer influência pelo menos sobre a ação supressora do BZ na multiplicação do parasito. Deste modo, em infecções com os clones Gamba cl1 e P209 cl1 foi observada a reativação da parasitemia entre 10 a 20 dias após interrupção do tratamento a qual permaneceu patente por até 60 dias após reativação. Resultados semelhantes foram observados em algumas misturas contendo esses clones. Esse comportamento sugere elevada virulência e resistência desses clones ao BZ o que poderia explicar a maior tendência à reativação da infecção pelos genótipos 19 e 20 observadas após tratamento e à imunossupressão (Santos, 2007). No entanto, animais infectados com clones do genótipo 39 e com a combinação genotípica 39+32 apresentaram menor virulência com picos de parasitemia baixos e períodos patentes curtos. Nesses casos, ao contrário do observado anteriormente, o efeito do BZ sobre a parasitemia não foi evidente.

Não foi possível estabelecer uma correlação direta entre as alterações no perfil de susceptibilidade ao BZ e as mudanças nos perfis das curvas de parasitemia observados por Martins *et al.* (2006) nestas infecções mistas. Entre as 24 misturas estudadas, 19 apresentaram mudanças no perfil da curva de parasitemia em relação ao valor esperado. Nas nove misturas em que foram detectados mudanças no perfil de susceptibilidade ao BZ, tanto valores esperados (2), quanto inibição (5) ou estimulação (2) da parasitemia foram observados. Aumento da resistência ao BZ associado a uma diminuição da taxa de crescimento "*in vitro*" foi observado por Villareal *et al.* (2005). Entretanto, no presente estudo o mesmo comportamento não foi detectado "*in vivo*".

Em relação à mortalidade, não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados e os não tratados, provavelmente devido à baixa patogenicidade dos clones em estudo (taxas de mortalidade variando de 0 a 15,7% em monoinfecções). Apenas na mistura P209 cl1+OPS21 cl11 foi observada diminuição considerável da mortalidade (40 a 0%) após o tratamento. Quatro outras misturas apresentaram redução na taxa de mortalidade de aproximadamente 12% para 0%, embora todas essas diferenças não tenham sido significativas.

A eficácia do tratamento da doença de Chagas é muito complexa de ser definida devido a dificuldades para a demonstração de cura e às limitações dos métodos parasitológicos

e sorológicos disponíveis para sua definição. Nesse estudo, uma combinação de diferentes métodos parasitológicos e sorológicos foi utilizada no controle de cura dos animais submetidos ao tratamento, objetivando assegurar a acurácia dos resultados e também na tentativa de estabelecer um protocolo para definição precoce da eficácia ao tratamento no modelo murino. Em conjunto, essas metodologias detectaram eficiência do tratamento específico em 27,8% dos animais tratados, sendo que 19,1% foram classificados como tratados e curados e 8,76% como dissociados. A falha terapêutica foi verificada em 72,2% dos animais tratados.

Embora o ESF tenha sido exaustivamente repetido, esse método detectou parasitemia patente em somente 19,3% dos animais TNC. Esses resultados estão de acordo com o observado por outros autores que também verificaram a limitação desse exame para a detecção do parasito em animais submetidos ao tratamento específico, mesmo após a falha terapêutica ter sido demonstrada por outras metodologias (Brener, 1962).

A hemocultura detectou falha terapêutica em 79,3% dos animais e, menor sensibilidade desse método foi associada, principalmente, ao genótipo 39 e à combinação 39+32, tanto em animais TNC quanto nos INT. Esses resultados indicam que a Hc não deve ser usada isoladamente como controle de cura na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, mesmo no modelo murino, uma vez que sua sensibilidade é dependente da população do parasito envolvida na infecção como já observado por Toledo *et al.* (2002) e Lana *et al.* (2000). Ao contrário, Filardi & Brener (1987) e Toledo *et al.* (1997) obtiveram elevada sensibilidade da hemocultura na verificação de cura em animais infectados com diferentes cepas do *T. cruzi* e tratados na fase aguda da infecção. Esses resultados apresentaram correlação significativa com os testes sorológicos. No entanto, os autores não realizaram a caracterização genética dessas populações o que impede comparações mais precisas com os dados aqui obtidos. Nossos dados indicam claramente que a interpretação dos resultados negativos da hemocultura como controle de cura de animais infectados com diferentes populações do parasito deve ser cuidadosa, principalmente, quando não se conhece o seu comportamento prévio, sendo então necessários métodos adicionais para definição segura da cura parasitológica.

A PCR foi o método parasitológico mais sensível, apresentando um bom percentual de positividade independentemente do genótipo ou combinação dos clones do *T. cruzi* analisados. Essa técnica detectou DNA do parasito em 96,9% e 95,3% das amostras de sangue provenientes de animais TNC e INT, respectivamente. Além disso, a PCR foi positiva na maioria das amostras (27/29) provenientes de animais TNC que apresentaram hemocultura negativa. Esses dados demonstram a elevada sensibilidade dessa metodologia para

determinação precoce da falha terapêutica no modelo murino e corroboram dados de outros autores que verificaram sua eficiência na detecção da infecção nesse modelo animal (Vera-Cruz *et al.*, 2003; Caldas *et al.*, 2007), independentemente do grupo genético do parasito (Miyamoto *et al.*, 2006). A sensibilidade dessa metodologia foi avaliada por Campos *et. al.* (2002) que demonstraram que a PCR é capaz de detectar um único tripomastigota sangüíneo em 500μL de sangue. Entretanto, Camandaroba *et al.* (2003) não verificaram a mesma eficiência da PCR no controle de cura após tratamento de animais infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Os autores observaram que somente 37% das amostras de animais que apresentaram positividade por outros métodos parasitológicos (subinoculação e Hc) foram positivas pela PCR. Essas discrepâncias podem ser provavelmente decorrentes de diferenças nos protocolos experimentais usados para realização da PCR.

A PCR apresentou menor porcentagem de positividade do que os testes sorológicos, sendo negativas em 7% das amostras obtidas de animais INT e TNC. Esse método mostrou maior capacidade de detecção da infecção do que a Hc (96,1 contra 84, 3%, respectivamente), sendo negativo em sete amostras que apresentaram hemocultura positiva, mesmo após repetição. Esses dados são concordantes como demonstrado por Campos *et al.* (2002) de que essa técnica pode falhar principalmente em casos em que o número de parasitos circulantes é limitado. Esses autores observaram que a PCR é capaz de detectar até mesmo um parasito no sangue, mas a repetição dos testes pode ser necessária para correta definição do diagnóstico. A falha pode ser devido à perda de DNA durante a etapa de extração. No entanto, a repetição dos testes neste trabalho não levou a resultados positivos. Provavelmente, a negatividade da PCR e deve estar associada à escassez do parasito na circulação no momento da coleta, uma vez que esses animais apresentaram baixos níveis de parasitemia e período patente muito curto. Em humanos e no modelo cão, essa questão é ainda mais problemática devido ao pequeno volume de sangue coletado para exame em relação ao volume total do hospedeiro (Brito *et. al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2000; Veloso 2007). Por conseguinte, a PCR deve ser utilizada como um método complementar a outros testes parasitológicos, quando pequenos volumes de sangue são individualmente analisados. Além disso, a interpretação dos dados deve ser muito cuidadosa quando a PCR é utilizada isoladamente (Campos *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2000).

Os dados obtidos na sorologia convencional pela ELISA demonstraram que a aplicação dessa técnica em amostras coletadas somente dois meses após o tratamento pode produzir resultados falso-negativos em animais que apresentaram testes parasitológicos positivos. Quando essa técnica foi realizada em amostras de soro coletadas três meses após o término do tratamento, napenas um animal permaneceu negativo, indicando que essa técnica

não deve ser empregada como controle de cura antes de três meses após a realização do tratmento. Além disso, os resultados obtidos nesse estudo são concordantes com estudos prévios nos quais foi demonstrado que a sorologia convencional pode permanecer reativa por vários meses (6-12 meses) mesmo após o tratamento eficaz da infecção pelo *T. cruzi* (Kretelli & Brener, 1982; Filardi & Brener, 1982; Andrade *et al.*, 1985a; Andrade *et al.*, 1987; Andrade *et al.*, 1991b). No presente trabalho também foi observado que muitas amostras do grupo DIS, coletadas aos seis meses após o término do tratamento, ainda permaneceram reativas pela ELISA. Andrade *et al.* (1991b) consideram que esta demora na negativação da sorologia convencional pode estar relacionada à persistência de parasitos nas células dendríticas do baço que forneceria estimulação antigênica necessária à manutenção da memória imunológica.

Por outro lado, os resultados da sorologia não convencional para detecção de anticorpos antitripomastigotas vivos pela citometria de fluxo (AATV) foram mais eficientes na categorização dos diferentes grupos de animais, apresentando negativação precoce aos três meses após tratamento com BZ, confirmando assim dados de outros autores observados no modelo murino (Kretelli & Brener, 1982; Toledo, 2000; Araújo *et al.*, 2000). Foi ainda demonstrado que animais tratados não curados que apresentaram hemocultura negativa mostraram menor reatividade quando comparados aos animais TNC com hemocultura positiva. Esses resultados confirmam o achado de que parasitemia mais elevada e, conseqüentemente, maior estimulação antigênica, está associada com maior produção de anticorpos como verificado em diferentes hospedeiros (Andrade *et al.*, 1985b; Martins-Filho *et al.*, 1995; Veloso *et al.*, 2001; Guedes *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2005). Somente dois animais tratados permaneceram com resultados duvidosos em relação à definição da cura (positivos nos testes sorológicos e negativos na Hc e PCR). Entretanto, esses animais apresentaram testes sorológicos positivos mesmo aos seis meses após término do tratamento. Considerando a ocorrência da negativação precoce da AATV nos animais TC, estes dois camundongos foram então considerados não curados.

Um animal, que apresentou exames parasitológicos positivos, foi negativo nos testes sorológicos. Discordância semelhante entre os resultados desses testes já foi também relatada em humanos por Martins-Filho *et al.* (1995) e Gomes *et al.* (1999) e, provavelmente, deve estar relacionada ao padrão da resposta imune do hospedeiro.

Os dados obtidos nos animais INT e TNC confirmam a elevada capacidade da PCR e da AATV na detecção da infecção pelo *T. cruzi* no modelo murino. Essas técnicas foram as que apresentaram a melhor concordância de resultados e foram as mais apropriadas para definir precocemente a eficácia do tratamento. Apenas dois animais dos 194 animais avaliados

não foram positivos pela AATV ou PCR quando combinadas à Hc. Conseqüentemente, a associação de uma dessas técnicas com a Hc constitui uma abordagem apropriada para realizar o controle de cura da infecção aguda no modelo murino.

A histopatologia convencional detectou escasso parasitismo nos tecidos de animais infectados com as diferentes combinações genotípicas (dados não mostrados). Trabalhos prévios, utilizando os mesmos clones deste estudo, também apresentaram dificuldade de detecção do parasito pela histopatologia convencional e pela imunohistoquímica em tecidos de camundongos monoinfectados (Toledo, 2000). Quando a PCR foi utilizada para a detecção do kDNA do *T. cruzi* em tecidos, resultados positivos foram observados em todos os tecidos de animais infectados com as diferentes combinações genotípicas tanto nos IT quanto nos INT. Esses dados revelam a elevada sensibilidade dessa técnica para a detecção do parasito em tecidos, como já relatado por Vera-Cruz *et al.* (2003) e Cruz (2002). Resultados semelhantes foram observados por Veloso (2007) em amostras de tecidos cardíacos de cães infectados com a cepa Y, detectando, inclusive, positividade superior à observada em amostras de sangue. Os tecidos com maior positividade foram o músculo esquelético e o coração, que constituem aqueles mais comumente parasitados pelo *T. cruzi*. Adicionalmente, a bexiga constituiu um importante sítio para a detecção do parasito nos animais IT. Esses resultados estão de acordo com estudos de infecções monoclonais com esses mesmos clones do *T. cruzi* (Diego *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2002; Toledo *et al.*, 2003), nas quais os autores verificaram pela histopatologia convencional a presença do parasito, preferencialmente, no músculo esquelético seguido de coração e dos tratos geniturinário e digestivo.

O envolvimento do trato urinário na doença de Chagas ainda é pouco estudado. Entretanto, alguns trabalhos existentes na literatura demonstraram a presença do *T. cruzi* na bexiga e inclusive presença de anormalidades nesse órgão como aumento de peso, dilatação, inflamação e fibrose, sugerindo ser a bexiga um importante local de infecção (Scremin *et al.*, 1999; Cabrine-Santos *et al.*, 2003; Boczko *et al.*, 2005). Recentemente, foi ainda demonstrado que a urina humana estimula o crescimento *"in vitro"* do *T. cruzi*, o que poderia contribuir para explicar a presença do parasito nesse órgão (Ferreira *et al.*, 2007). Entretanto, curiosamente, esse achado foi mais evidente nos animais submetidos ao tratamento. Brito *et al.* (comunicação pessoal) por meio da inoculação de kDNA do *T. cruzi* na em camundongos não infectados verificaram elevada positividade da PCR na bexiga, sugerindo que o cleareance das moléculas de minicírculo é urinário. Essa observação fornece uma justificativa plausível para o aumento da positividade da PCR na bexiga de animais infectados e tratados observada nesse estudo. Entretanto, a positividade do kDNA na bexiga (> 80%) foi elevada apenas na FC da infecção,

ou seja quando os tecidos foram coletados longo período após a interrupção do tratamento, ao contrário do que ocorreu na FA, quando os tecidos foram coletados logo após a interrupção do tratamento. Assim, os dados aqui obtidos sugerem, a persistência do parasito na bexiga e não apenas a presença de kDNA residual. Esta opinião pode ser ainda reforçada se considerarmos os dados obtidos anteriormente por Toledo *et al.* (2004) que verificaram que o tratamento da fase aguda de animais infectados com o genótipo 39 promovia alteração desfavorável no curso da infecção com aumento significativo do parasitismo tecidual e inflamação de diferentes órgãos, comprovados pela histopatologia convencional.

De uma maneira geral, maior positividade da PCR em tecido foi observada nos tecidos de animais infectados e tratados coletados na fase crônica da infecção (FC) do que nos coletados na fase aguda (FA). Na fase aguda experimental o *T. cruzi* infecta diferentes órgãos e tecidos. À medida que a resposta imune contra o parasito se estabelece e a infecção cronifica, sua multiplicação é controlada, sendo o tropismo direcionado a tecidos específicos. A análise dos dados da PCR em tecidos de animais INT reproduziu claramente essa situação, sendo o parasitismo significativamente maior nos tecidos coletados na FA. Entretanto, em animais IT esse quadro não foi observado, sendo a positividade da PCR semelhante entre os tecidos coletados imediatamente (FA) ou após longo período após tratamento (FC) na maioria dos tecidos. Apenas na bexiga a positividade da PCR foi maior na FC. Além disso, a comparação da positividade da PCR detectada nos tecidos de animais INT e de animais IT revelou que o tratamento da FA reduziu significativamente a positividade para todos os tecidos na maioria das combinações genotípicas. Contudo quando os tecidos foram coletados na FC, o mesmo não foi observado, sendo a positividade da PCR semelhante entre os grupos INT e IT ou mesmo superior nos animais IT. Esses dados sugerem fortemente que o tratamento produz uma drástica redução do parasitismo no início da infecção, que pode, contudo, se restabelecer após sua interrupção, gerando possivelmente um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro que se estabelece naturalmente em um hospedeiro infectado e não tratado.

Surpreendentemente, quando amostras de tecidos de 12 animais considerados curados pelo critério de cura clássico (ESF, Hc, PCR em sangue, ELISA e AATV) foram analisadas pela PCR, todas apresentaram resultados positivos. O coração, o músculo esquelético e a bexiga foram novamente os tecidos mais freqüentemente positivos pela PCR, como também observado nos tecidos de animais TNC. As infecções mistas com maior positividade foram aquelas contendo o genótipo 39. Curiosamente, alguns tecidos de animais TNC e TC, infectados com as combinações genotípicas 20+39 20+32 e 19+39, apresentaram maior positividade da PCR do que tecidos de animais INT. Se essa positividade for considerada

como um indicativo de infecção ativa, provavelmente, em algum momento e dependendo da genética do parasito, o tratamento específico pode aumentar o parasitismo tecidual como previamente demonstrado por Toledo *et al.* (2004) para o genótipo 39. Nesse trabalho, os autores sugeriram que pelo menos para o genótipo 39, o tratamento parece ter um efeito negativo na relação parasito-hospedeiro. Neste estudo, devido à elevada sensibilidade da PCR para detecção de kDNA do *T. cruzi*, os dados indicam apenas maior dispersão do parasito nos tecidos do hospedeiro, sem contudo, significar maior carga parasitária. Devido à dificuldade de detecção desses clones pela histopatologia convencional para conclusões mais seguras, torna-se necessário avaliar quantitativamente a presença do parasito nos tecidos dos animais INT e IT pela PCR e correlacioná-los com o processo inflamatório para elucidar do real benefício do tratamento nesses animais.

Uma provável explicação para esses resultados inesperados obtidos pela PCR em tecidos de animais TC, seria a presença de DNA residual do *T. cruzi* nos sítios teciduais, mesmo após a morte dos parasitos. Esse fenômeno foi previamente descrito para antígenos do *T. cruzi* em células dendríticas do baço (Andrade *et al*., 1991). Outra possibilidade é a integração de DNA do *T. cruzi* ao genoma da célula hospedeira demonstrada por Teixeira *et al*, (1994) e Nitz *et al.* (2004). Resultados similares aos obtidos aqui foram também observados por Michailowsky *et al.* (1998) quando corações de animais tratados, considerados curados por outras metodologias foram analisados pela PCR. Independentemente das explicações aqui mencionadas é evidente a necessidade de novas investigações sobre a eficácia do tratamento com BZ na eliminação do *T. cruzi* do hospedeiro vertebrado. Uma importante questão suscitada por esses resultados é até que ponto a cura parasitológica existe realmente na infecção por este parasito. O fato é que o uso de ferramentas mais sensíveis de diagnóstico parece demonstrar ainda mais a presença da infecção em animais tratados.

Os resultados obtidos na análise do perfil de susceptibilidade ao BZ das monoinfecções e infecções mistas revelaram que clones da linhagem *T. cruzi* I e suas combinações foram mais resistentes ao tratamento do que clones pertencentes à linhagem *T. cruzi* II, corroborando os achados de Toledo *et al.* (2003). Clones com características híbridas (*T. cruzi*) apresentaram susceptibilidade ao BZ intermediária a esses grupos. Entretanto, diferenças significativas no padrão de susceptibilidade foram observadas entre as monoinfecções, provavelmente devido ao fato de terem sido utilizados apenas dois dos cinco clones de cada genótipo principal estudados por Toledo *et al.* (2003), incluindo aqueles com graus de susceptibilidade ao BZ mais polares em cada grupo. A única exceção ocorreu com o genótipo 20 onde todos os clones são 100% resistentes ao BZ. Alterações no perfil de

susceptibilidade ao BZ não foram detectadas quando foram consideradas as grandes subdivisões genéticas do *T. cruzi*. Por outro lado, mudanças no perfil de susceptibilidade ao BZ foram evidentes quando as subdivisões menores foram consideradas em duas combinações genotípicas e em nove das 24 misturas de clones do *T. cruzi*. Além disso, misturas de uma mesma combinação genotípica apresentaram respostas distintas ao tratamento. Esses achados suportam a observação de Toledo *et al.* (2003) de que é necessário levar em consideração as subdivisões genéticas menores do parasito devido à heterogeneidade de comportamento existente entre os clones de uma mesma linhagem. Desse modo, diminuição da susceptibilidade ao BZ foi observada nas combinações genotípicas 19+39 e 19+32, que passaram, respectivamente, de susceptíveis e parcialmente susceptíveis a resistentes, respectivamente. Quando os resultados das infecções mistas foram analisados considerando os clones do *T. cruzi* que constituiam as misturas, tanto diminuição quanto aumento da susceptibilidade ao BZ foram observados. Foi verificado aumento da taxa de cura em cinco infecções mistas envolvendo quase todas as misturas de genótipos (exceto nas combinações 19+32 e 20+19) enquanto redução foi detectada em quatro misturas pertencentes às combinações 19+39 e 19+32.

Os mecanismos envolvidos na resistência a fármacos em *T. cruzi* ainda não são bem definidos e compreendidos. Em parasitos protozoários, diferentes capacidades de captação e exportação de drogas, de metabolização, de diferenças em enzimas que participam na interação com o fármaco (Ullman, 1995) e na regulação de vias metabólicas responsáveis pela excreção do mesmo (Engel *et al.*, 2000) parecem estar relacionadas à resistência a quimioterapia. Aumento na resistência ao BZ já foi descrita para populações do *T. cruzi* após exposição ao BZ (Vilarreal *et al.*, 2005) e após longo tempo de manutenção no hospedeiro (Veloso *et al.*, 2001; Caldas *et al.*, 2007). Entretanto, nesse estudo, esses fatores não devem ser os responsáveis pelas diferenças observadas na eficácia do tratamento com BZ nas infecções mistas pelo fato deste ter sido realizado nas mesmas condições, sem prévia exposição ao fármaco e somente na fase aguda da infecção. As mudanças no fenótipo de susceptibilidade ao BZ ocorreram em todas as direções com clones resistentes ou susceptíveis a esse fármaco nas monoinfecções invertendo seu perfil de susceptibilidade nas infecções mistas. Esses dados sugerem que importantes interações ocorreram entre os clones da mistura levando a um equilíbrio diferente na relação parasito-hospedeiro como já observado por Pinto *et al.* (1998) no vetor e por Lana *et al.* (2000) em camundongos ao analisarem infecções mistas por alguns dos clones aqui estudados.

Essas mudanças poderiam estar relacionadas à modulação diferencial da resposta imune nas infecções mistas e na expressão gênica de ambos, parasito e hospedeiro. Neste contexto, há registros na literatura descrevendo diferenças nos padrões de expressão gênica entre as populações do *T. cruzi* (Cortez *et al.*, 2003; Dost *et al.*, 2004; Risso *et al.*, 2004: Vilarreal *et al.*, 2005) e também na célula hospedeira (Burleigh & Andrews, 1998; Burleigh & Woolsey, 2002; Yoshida, 2006). Essas diferenças poderiam implicar em habilidades específicas do *T. cruzi* no estabelecimento da infecção. Por conseguinte, é razoável supor que em infecções mistas, interações entre vias metabólicas distintas poderiam ocorrer devido à expressão gênica diferenciada de cada componente da mistura, que levariam inclusive às mudanças nos níveis de expressão ou mesmo à produção de novas proteínas. Essas alterações no padrão de expressão gênica poderiam modificar o curso da infecção, conferindo ao parasito novas propriedades biológicas, o que poderia explicar os dados aqui obtidos e também por outros autores que estudaram infecções mistas (Pinto *et al.*, 1998; Lana *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2006).

Vários autores têm registrado que o *T. cruzi* apresenta elevada plasticidade o que pode representar um fator envolvido nas mudanças observadas na eficácia do tratamento nas infecções mistas. Já foram descritos polimorfismos nas seqüências de minicírculos (Pacheco & Brito 1999), DNA genômico (Alves *et al.*, 1996), no cariótipo (MacDaniel e Dvorak, 1993) e no perfil eletroforético de isoenzimas (Alves *et al.*, 1993; Lana & Toledo, 2004) de populações clonadas que poderiam estar relacionadas a erros na replicação do DNA, rearranjos na seqüência de DNA ou processos de recombinação genética, que embora raro na natureza, foi demonstrado em modelos experimentais por Gaunt *et al.* (2003). Essas modificações também têm sido descritas em outros parasitos protozoários com estrutura clonal, como *Leishmania*, sendo a mudança observada no cariótipo associada a alterações na taxa de crescimento dos clones (Dujardin *et al.*, 2007). Essas modificações gênicas poderiam conferir ao hospedeiro a capacidade de expressar novas proteínas e, conseqüentemente, de responder diferentemente às pressões ambientais.

O sistema imune também tem um importante papel no controle da infecção (Nabors & Tarleton, 1991; Brener & Gazzinelli, 1997; Abrahamsohn, 1998; Martin & Tarleton, 2004) e ação sinérgica entre o mesmo e a resposta ao tratamento já foram claramente demonstradas (Lages-Silva *et al.*, 1990; Toledo, 1992; Michailowsky *et al.*, 1998; Murta *et al.*, 1999; Romanha *et al.*, 2002). Portanto, sua atuação pode ter participação relevante nas mudanças do perfil de susceptibilidade ao BZ observado nas infecções mistas. A infecção pelo *T. cruzi* é um processo complexo que depende da capacidade do parasito de invadir as células, multiplicar

intracelularmente e, evadir da resposta imune. Durante a infecção, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune específica contra o parasito, mas concomitantemente ocorre ativação policlonal não específica de linfócitos, que pode ser prejudicial à eficiência da atividade imune contra o parasito (Minoprio, 2001). Populações diferentes do *T. cruzi* apresentam distintos graus de susceptibilidade a anticorpos (Kretlli & Brener, 1982) e podem induzir respostas imunes distintas (Andrade *et al.*, 1985; Gonzalez *et al.*, 1995; Tarleton *et al.*, 1992) em relações às quais os clones do parasito apresentarão diferentes graus de capacidade de evasão do sistema imune (Wallace *et al.*, 1995; Garzon *et al.*, 2005). Essas variações podem ser explicadas devido a diferenças na expressão de glicoproteínas de membrana do parasito, alvos da resposta imune que conferem variação na composição antigênica entre as diferentes populações do *T. cruzi* e também entre as suas formas evolutivas (Carreira *et al.*, 1996; Pollevick *et al.*, 2000; Costa-Serrano *et al.*, 2001; Previato *et al.*, 2004; Campo *et al.*, 2006; Buscaglia *et al.*, 2006). Recentemente, Santos *et al.*, (artigo submetido) demonstraram que clones pertencentes aos genótipos principais podem induzir respostas humorais distintas em camundongos *Swiss*. Desse modo, é provável que a complexa interação entre a resposta acionada por um clone poderia favorecer a capacidade de escape de outro e sua permanência no hospedeiro. O efeito contrário também poderia ser esperado favorecendo a eliminação de um clone bem adaptado no hospedeiro, em monoinfecções, por meio da reposta imune mais efetiva acionada pela interação dessas populações entre si e também com o hospedeiro.

Vilarreal *et al.* (2005) sugeriram que vários mecanismos estão provavelmente relacionados à resistência ao BZ em *T. cruzi* e que os mecanismos envolvidos na resistência natural são diferentes daqueles envolvidos na resistência induzida pelo fármaco. Novos estudos para esclarecer os fatores envolvidos nesse processo são necessários e abrem novas perspectivas para o entendimento da resposta ao tratamento da doença de Chagas.

A caracterização pela PCR de microssatélites dos clones do *T. cruzi* pertencentes aos genótipos principais demonstrou maior eficiência dessa técnica em distinguir os oito clones empregados nesse estudo, comparativamente à análise de isoenzimas, que detectou apenas quatro perfis: (1) clones do genótipo 19 e 20; (2) clones do genótipo 39; (3) clones do genótipo 32 e (4) Cuica cl1. Esses resultados confirmam os dados de Oliveira *et al.* (1998) que descreveram a robustez dessa técnica para a análise da diversidade genética das populações do *T. cruzi*. A análise filogenética desses clones pelo perfil de microssatélites confirmou a relação genética previamente determinada por Tibayrenc *et al.* (1993), empregando a análise dos perfis de MLEE e o RAPD. Os dados obtidos dividiram os clones em dois ramos principais, um contendo os clones dos genótipos 19 e 20 (DTU I ou *T. cruzi* I) e outro contendo os clones

dos genótipos 39 e 32 (DTU 2 ou *T. cruzi* I e *T. cruzi* II). Entretanto, o clone Cuica cl1 não pôde ser incluido nessa análise, uma vez que, surpreendentemente, revelou a presença de três ou quatro alelos de microssatélites em diferentes locos, sugerindo ser uma população policlonal. Esse clone também apresentou perfil de isoenzimas distinto do esperado para os clones do genótipo 19/20. O clone Cuica cl1 vem sendo utilizado como referência para a grande linhagem do *T. cruzi* I em diversos estudos filogenéticos (Bastrenta *et al.,* 1999; Barnabé *et al.,* 1999; Brisse *et al*., 2000; Pimenta 2002; Brisse *et al*., 2001; Freitas *et al*., 2006), cujos autores empregaram outros marcadores moleculares ou mesmo microssatélites. Até o momento, em nenhum desses estudos foi observada tal natureza policlonal.

Em virtude desses resultados, essa população do *T. cruzi* foi melhor investigada , sendo novamente clonada. Os resultados obtidos demonstraram que este clone realmente continha duas populações com perfis de microssatélites distintos (C1 e C2). Duas hipóteses, que não são mutuamente exclusivas, poderiam ser propostas para explicar estes resultados: (1) a possibilidade de que na amostra original existia na verdade duas populações do *T. cruzi*, uma delas presente em muito baixa proporção e que a dinâmica populacional inicial foi alterada durante a sua manutenção em laboratório; (2) após isolamento, clonagem e manutenção em laboratório ocorreram mudanças genéticas na população original gerando subpopulações. Há evidências na literatura que reforçam essas duas hipóteses. De fato, a clonagem de populações do *T. cruzi* não é complexa e durante o processo mais de uma célula foi selecionada apresentando diferentes taxas de crescimento. Além disso, a eliminação de uma ou mais populações de uma cepa após manutenção no hospedeiro vertebrado ou em cultura acelular tem sido sugerida por diferentes autores (Deane *et al*., 1984; Bosseno *et al*., 2000; Veloso *et al.* 2006). Mudanças genéticas em parasitos clonais têm sido descritas em relação a diferentes marcadores como mecanismo de adaptação a diferentes pressões ambientais (McDaniel & Dvorak, 1993; Alves *et al*, 1996; Pacheco *et al*., 1995; Pacheco & Brito, 1999; Lana & Toledo, 2004).

Para elucidar tais aspectos, foram realizadas análises comparativas entre o perfil molecular da amostra Cuica cl1 empregada neste estudo e o de outra amostra do clone Cuica cl1 (Cuica cl1A) mantida criopreservada desde 1997. Essas análises revelaram que o clone Cuica cl1A mantinha o padrão de isoenzimas esperado para os estoques do genótipo19/20. Entretanto, embora a população C2 estivesse predominantemente presente, algumas vezes a população C1 foi também detectada. A manutenção do clone Cuica cl1 por longo tempo em cultura e no hospedeiro vertebrado demonstrou diferenças na capacidade de adaptação de suas subpopulações às diferentes condições. A população C1 foi favorecida pela manutenção

em cultura e estava predominantemente presente na amostra usada nesse estudo e, a população C2 foi favorecida pela manutenção em camundongos, que levou ou a eliminação de C1 ou a sua redução a níveis indetectáveis sem clonagem prévia. Esses eventos sugerem que no momento do isolamento do estoque Cuica cl1 as duas populações estavam presentes e que a clonagem pode não ter sido bem sucedida. Desse modo, a manutenção em cultura levou a alteração da dinâmica dessas duas populações (hipótese 1 mencionada). Entretanto, também é possível, que após a clonagem prévia, alterações genéticas tenham ocorrido levando a origem de uma nova sub-população mais adaptada à cultura que a população inicial (hipótese 2 mencionada).

Quando se buscou fazer a identificação dos clones presentes nos isolados obtidos de animais INT e TNC foram encontrados resultados interessantes e inesperados para algumas misturas. Em quatro delas [P209 cl1+ OPS21 cl11 e Cuica cl1+Gamba cl1 (20+19), Gamba cl1 +Bug2148 cl1 e OPS21 cl11+Bug2148 cl1 (19+39)] o clone detectado foi o mais susceptível ao BZ em monoinfecções em detrimento do clone mais resistente presente na mistura. Esses dados sugerem que a correlação esperada entre a susceptibilidade ao tratamento e a genética do parasito é difícil de ser estabelecida em infecções mistas. Em todas essas misturas o clone detectado foi o pertencente ao genótipo 19, demonstrando um maior potencial para expressão de resistência ao BZ quando clones desse genótipo estavam presentes em infecções mistas.

Além disso, 15,5% (28/180) dos isolados do *T. cruzi* obtidos de animais TNC e INT apresentaram perfis moleculares distintos do esperado determinado para os clones originais neles inoculados. Vinte e um desses isolados apresentaram mudanças reveladas por ambos os marcadores, um apenas pela análise de microssatélites e seis somente pela análise de isoenzimas. Em duas das 24 misturas (OPS21cl11+MAS cl1, OPS21 cl11+IVV cl4) foram também observadas mudanças no perfil molecular quanto ao perfil de susceptibilidade ao BZ.

Essas mudanças são consideradas surpreendentes devido à estrutura clonal do *T. cruzi* que pressupõe sua estabilidade genética ao longo do tempo e espaço, mesmo considerando a possibilidade rara de troca genética nesta espécie (Tibayrenc *et al.*, 1995). Entretanto, a possibilidade de que nas amostras originais existiam populações do *T. cruzi* presentes em baixa proporção cuja passagem no hospedeiro vertebrado propiciou o crescimento preferencial de uma delas, não pode ser excluída. Além disso, mudanças genéticas já foram também registradas por outros autores em amostras clonadas de *T. cruzi* e *Leishmania*, possivelmente resultantes da pressão exercida por droga ou pela modificação das condições de cultivo (Iovannisci & Beverley, 1989; Beverley & Coburn, 1990; MacDaniel e Dvorak, 1993; Alves *et*

al., 1996; Pacheco & Brito, 1999) o que poderia ter contribuído para a geração de variantes. Mudanças no perfil genético dos mesmos clones aqui estudados já foram verificadas por Lana & Toledo (2004) em infecções monoclonais de animais submetidos ao tratamento. A caracterização destes isolados por MLEE e RAPD demonstrou interconversão dos genótipos 19 e 32 para o perfil híbrido do genótipo 39, do genótipo 32 para perfil do genótipo 19/20 e a presença de três novos perfis. No entanto este trabalho foi desenvolvido utilizando outra alíquota dos mesmos clones adquiridos do laboratório de origem em momento distinto das amostras utilizadas no presente estudo (1997 *versus* 2002).

Os dados aqui obtidos demonstraram que 21 dos 28 isolados com perfis inesperados apresentaram mudanças tanto no perfil de isoenzimas quanto no de microssatélites. Um deles mudou apenas o perfil de microssatélites e seis alteraram apenas o perfil de isoenzimas. Não foi observada interconversão entre os genótipos, mas a análise de isoenzimas demonstrou caráter misto, sendo que em algumas enzimas foi observado o caráter híbrido do genótipo 39. Este fato tem sido ignorado e constantemente interpretado como contaminações das amostras ou insucesso da clonagem devido à estrutura clonal do *T. cruzi* que pressupõe sua estabilidade genética. Os dados obtidos nesse estudo, juntamente com os de Toledo (2001) sugerem fortemente que esses aspectos precisam ser melhor investigados nessa espécie.

Embora a identificação pela PCR de microssatélites tenha verificado a presença de somente um clone na maioria dos isolados (83,7%), a detecção em animais duplamente infectados após tratamento do clone susceptível ao BZ em monoinfecções, comprovou claramente a mudança no perfil de susceptibilidade ao BZ desses clones em infecções mistas. Os resultados sugerem que mesmo se uma das populações inoculadas nos animais tenha sido eliminada do hospedeiro vertebrado, a coexistência dos dois clones no início da infecção parece ser suficiente para promover tais mudanças.

A coexistência de duas cepas do *T. cruzi* em infecções mistas experimentais foi primeiramente verificada por Deane *et al.* (1984). Entretanto, os autores demonstraram que tanto o tempo quanto o método de isolamento podem agir como fatores seletivos de modo que passagens sucessivas da mistura em cultura acelular ou em animais podem eliminar totalmente uma das duas populações. Essa seleção poderia explicar os baixos índices de infecções mistas detectados em nosso estudo após reisolamento dos clones. A persistência de ambos os clones do *T. cruzi* foram detectadas na maioria dos isolados de animais infectados com as combinações dos genótipos 19 e 20 que contém os clones que apresentam maior virulência e maiores taxas de crescimento em culturas, quando analisados isoladamente (Laurent *et al.*, 1997; Revollo *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2002). Entretanto, esses resultados

foram diferentes dos obtidos por Pinto *et al.* (1998) e Lana *et al.* (2000) ao estudarem infecções mistas com alguns desses mesmos clones no vetor e em camundongos. Esses autores detectaram maior persistência das duas populações em *Triatoma infestans* (87%) do que em camundongos (38%), sendo essa diferença atribuída à maior pressão do sistema imune existente no hospedeiro vertebrado. As populações foram identificadas pelas análises de MLEE e RAPD, sendo a combinação genotípica 19/20+32 a mais presente. As diferenças dos resultados aqui obtidos com os de Lana *et al.* (2000) que adotaram o mesmo modelo experimental deste estudo, devem estar associadas às diferenças metodológicas entre as investigações. O dobro do inóculo foi empregado por Lana *et al.* (2000) e o reisolamento foi realizado mais precocemente, aos 30 d.a.i., o que pode ter favorecido a detecção de ambos os clones do *T. cruzi*. De fato, os clones do genótipo 39 e 32 apresentam período patente curto e baixos níveis de parasitemia, o que facilita o seu isolamento quanto mais cedo a hemocultura for realizada.

Em virtude da possibilidade de seleção clonal pelo método de isolamento, atualmente diversos grupos têm tentado desenvolver metodologias capazes de detectar o parasito diretamente no sangue e nos tecidos do hospedeiro vertebrado ou nas fezes dos triatomíneos. Entretanto, resultados divergentes foram observados entre alguns trabalhos. Pinto *et al.* (2000) empregando a PCR em amostras de DNA obtidas diretamente das fezes dos triatomíneos seguida de hibridização com sondas específicas para cada genótipo detectou a presença dos dois clones em somente 52,1% das amostras contra 87% das isoladas por xenocultura e caracterizadas por MLEE e RAPD. Por outro lado, Bosseno *et al.* (2000) estudando infecções naturais do parasito em *T. infestans* verificaram que a PCR seguida de hibridização com sondas específicas para cada genótipo foi consideravelmente melhor na detecção das infecções mistas dos genótipos 20+39 do que a análise de MLEE. Os autores sugerem que esta diferença se deva, provavelmente, à capacidade dos clones do genótipo 20 de crescerem melhor e mais rapidamente em cultura, levando à eliminação do genótipo 39 ou à sua redução a níveis indetectáveis pela análise de MLEE. Além disso, o genótipo 39 parece ser menos sensível a resposta imune e, portanto, mais freqüentemente encontrado em pacientes adultos infectados do que o genótipo 20, enquanto no vetor e em crianças (onde a resposta imune é provavelmente menos eficiente que no adulto) ambos podem ser observados na mesma freqüência em regiões da Bolívia. Esses resultados são discordantes daqueles encontrados neste estudo que parecem demonstrar maior resistência dos clones dos genótipos 19 e 20 ao sistema imune e ao mesmo tempo foram concordantes com os obtidos por Toledo (2001), que sugeriu que os genótipos 32 e 39 são mais susceptíveis à ação do sistema imune.

Adicionalmente, clones que não foram detectados no sangue poderiam estar localizados preferencialmente em tecidos, especialmente no caso do genótipo 39, e serem de difícil detecção na circulação sanguínea (Toledo *et al.*, 2004). Os resultados obtidos por Lana *et al.* (2000) corroboram essa observação uma vez que o genótipo 39 foi o menos presente em amostras isoladas de animais duplamente infectados com clones dos genótipos principais identificados por MLEE e RAPD. Por essas razões, a caracterização dos clones presentes diretamente em amostras de sangue e tecidos foi também realizada para melhor entendimento da dinâmica das infecções mistas nesses animais e com o objetivo adicional de verificar se os métodos de isolamento levariam à seleção clonal.

A PCR de microssatélites não apresentou bom rendimento para identificação dos clones do *T. cruzi* presentes no sangue e nos tecidos. Somente 17,9% do total de amostras analisadas puderam ser caracterizadas, embora todas fossem positivas para o kDNA do parasito. A caracterização dos clones do *T. cruzi* presentes nessas amostras pode não ter sido bem sucedida devido à baixa carga parasitária situada abaixo do limiar de sensibilidade da técnica que é baseada no polimorfismo de marcador nuclear de cópia única. O fato de que a maioria das amostras em que a caracterização pela PCR de microssatélites foi bem sucedida ser proveniente de animais INT inoculados com a combinação 20+19 (que contém os clones mais virulentos) corroboram esta hipótese. Além disso, nenhuma amostra de animais infectados com a combinação 39+32 (clones menos virulentos) pôde ser caracterizada. De um modo geral, os resultados foram concordantes com os obtidos nas amostras isoladas por hemocultura o que sugere que não tenha ocorrido seleção clonal. Entretanto, em decorrência do pequeno número de amostras em que a identificação foi bem sucedida, seria conveniente novas caracterizações utilizando marcadores alvos mais expressos no genoma do parasito para obter conclusões definitivas.

Vários estudos já demonstraram que algumas cepas do *T. cruzi* apresentam estrutura multiclonal (Deane *et al.*, 1984; Tibayrenc *et al.*, 1986; Marques de Araújo & Chiari, 1988*;* Carneiro *et al.* 1990; Oliveira *et al.*, 1998) e alguns grupos têm trabalhado em sentido inverso ao desse estudo, ao clonar estas cepas e comparar o comportamento dos clones obtidos com a cepa parental. Esses estudos têm verificado que o comportamento de uma cepa policlonal não é necessariamente o mesmo verificado nos clones provenientes dela (Lauria-Pires *et al.*, 1996b; Lauria Pires *et al.*, 1997). Esses dados são compatíveis com os aqui obtidos e fornecem evidências que misturas de clones podem produzir propriedades distintas daquelas esperadas em monoinfecções. A estrutura multiclonal das cepas do *T. cruzi* pode contribuir para resolver alguns problemas evolucionários observados em populações clonais, uma vez que os clones

presentes em misturas podem desenvolver interações mutualísticas que resultariam em novas propriedades permitindo melhor adaptação às pressões ambientais (Bernstein *et al.*, 1985).

Interações entre estoques clonais do *T. cruzi* de diferentes genótipos que sugerem estimulação ou inibição recíprocas já foram verificadas em infecções experimentais de *Triatoma infestans* (Pinto *et al*, 1998; Pinto *et al*, 2000) e camundongos (Lana *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2006), que resultaram em alterações das propriedades biológicas do parasito com conseqüente mudança no curso da infecção. Resultados similares foram obtidos por outros autores qu estudaram infecções mistas com outras populações monoclonais do *T. cruzi* e confirmaram que infecções mistas apresentam comportamento diferente do esperado com base nas monoinfecções em relação ao tropismo tecidual (Franco *et al.*, 2003) e ao desenvolvimento no vetor (Aguilar, 2000; Araújo *et al.*, 2007).

Vários estudos têm demonstrado elevada prevalência de infecções mistas nos diferentes ciclos de transmissão do *T. cruzi* (Tibayrenc e *et al.*, 1985; Bosseno *et al.*, 1996; Solari *et al.* 1998; Brenière *et al.*, 1995; Lauria-Pires *et al.*, 1996a; Brenière *et al.*, 1998; Vago *et al.* 2000; Solari *et al.* 2001; Di Noia *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003; Mejia & Triana, 2005; Lisboa *et al.*, 2006), confirmando sua importância na epidemiologia da doença de Chagas. Conseqüentemente, sua dinâmica na natureza entre hospedeiros vertebrados e invertebrados necessita ser melhor estudada. Provavelmente, resultados contraditórios obtidos no tratamento da doença de Chagas observados entre diferentes autores poderiam também ser influenciados pela ocorrência de infecções mistas, uma vez que indivíduos em áreas endêmicas podem ter sido submetidos a infecções por mais de um clone de *T. cruzi* e também a várias reinfecções por populações geneticamente distintas (Breniére *et al.*, 1998; Macedo & Pena, 1998).

Em conclusão, o conjunto de resultados apresentados nesse estudo mostra que o tratamento de infecções mistas é mais complexo do que o de monoinfecções devido à possibilidade de ocorrência de interações entre os clones da mistura e abrem perspectivas para novas investigações em relação ao tratamento da doença de Chagas.

6. CONCLUSÕES

1) O tratamento com Benzonidazol foi capaz de promover a supressão da parasitemia, tanto nos animais monoinfectados quanto naqueles com infecções mistas, logo após o início do tratamento. Entretanto, alguns clones do *T. cruzi* pertencentes aos genótipos 19 e 20 foram capazes de reativar a parasitemia tardiamente de maneira persistente, sugerindo que o benefício do tratamento pode depender da população do parasito, além de produzir alteração na relação parasito-hospedeiro e, conseqüentemente, no curso da infecção.

2) Os resultados indicam que a ELISA não pode ser usada precocemente como controle de cura da infecção murina pelo *T. cruzi* devido a demora de sua negativação após o tratamento efetivo da fase aguda da infecção e também por produzir resultados falso negativos quando realizada em amostras coletadas antes de três meses após o tratamento.

3) A sorologia não convencional para detecção de anticorpos antitripomastigotas vivos pela citometria de fluxo (AATV) foi eficiente na antecipação da detecção de cura após tratamento da fase aguda da infecção murina com Benzonidazol demonstrando sua aplicabilidade para determinação da cura, já aos três meses após o tratamento.

4) A hemocultura não deve ser utilizada isoladamente como controle de cura da infecção aguda pelo *T. cruzi* no modelo murino, pois pode apresentar baixa positividade dependendo da população do parasito, sendo a falha da técnica associada principalmente ao genótipo 39 e à combinação de clones dos genótipos 39 e 32.

5) A PCR foi o método parasitológico mais sensível, independentemente do genótipo do *T. cruzi,* mas não deve ser empregada isoladamente como controle de cura, uma vez que em alguns casos pode produzir resultados falso negativos inclusive em animais que apresentaram outros métodos parasitológicos positivos.

6) A combinação da pesquisa de anticorpos antitripomastigotas vivos ou da PCR para detecção de kDNA do *T. cruzi* com a hemocultura constitui uma abordagem apropriada para definir precocemente a cura pós-terapêutica na infecção aguda pelo *T. cruzi* no modelo murino.

7) A PCR em tecido apresentou elevada sensibilidade para a detecção do DNA do *T. cruzi* em todos os tecidos analisados, inclusive com sensibilidade maior que a PCR de sangue. Se os resultados da PCR em tecido forem considerados como indicativos de infecção ativa, essa metodologia revelou diminuição do número de animais com sucesso terapêutico em comparação ao critério de cura clássico, sugerindo que a cura da infecção pelo *T. cruzi* é mais difícil do que o até então demonstrado.

8) De um modo geral, a positividade da PCR em tecidos coletados na fase crônica de animais INT foi significativamente menor que a positividade observada na FA, oposta a observada nos animais IT. Esses dados sugerem que o tratamento com Benzonidazol promove importante supressão da multiplicação do parasito durante a sua administração, mas a infecção tende a restabelecer após a interrupção do mesmo. Isto foi verificado em várias combinações genotípicas, onde não houve cura parasitológica, indicando que o tratamento pareceu influenciar negativamente o curso da infecção.

9) A técnica de microssatélites foi mais eficiente do que a análise de isoenzimas na identificação dos clones nas 24 misturas analisadas, uma vez que essa forneceu perfis distintos para cada um dos oito clones estudados. Por outro lado, as isoenzimas dividiram as amostras apenas em quatro grupos distintos. Esses dados conjuntamente comprovam a elevada eficácia da análise de microssatélites na detecção da variabilidade genética em *T. cruzi.*

10) A análise da divergência filogenética dos clones estudados confirma a aplicabilidade do emprego da análise de microssatéllites em estudos de genética de população de *T. cruzi*, como já verificado por outros autores, sendo os resultados análogos aos obtidos como marcadores clássicos como Isoenzimas e RAPD.

11) A PCR de microssatélites não apresentou sensibilidade adequada para detecção de pequenas quantidades de DNA presentes nas amostras de sangue ou tecido, sendo mais positiva para as combinações que apresentam maior virulência e parasitismo tecidual (20+19) e em animais não tratados. Desse modo, é necessária à otimização dessa técnica ou a busca de alvos mais abundantes no genoma do *T. cruzi,* capazes de identificar o parasito em amostras obtidas diretamente de sangue ou tecidos.

12) Apesar de terem sido caracterizadas poucas amostras obtidas diretamente do sangue e dos tecidos de animais INT e TNC, os resultados foram concordantes com os encontrados em amostras isoladas por hemocultura, o que sugere não ter ocorrido seleção clonal pelo método de isolamento do parasito. Os genótipos 20 e 19 foram os mais freqüentemente isolados demonstrando uma maior capacidade de adaptação dessas populações ao hospedeiro vertebrado.

13) A amostra do clone Cuica cl1 mostrou ser constituída de duas subpopulações do *T. cruzi* que apresentaram diferentes capacidades de adaptação e de desenvolvimento em cultura e no hospedeiro vertebrado. Foi verificada ainda que a manutenção laboratorial dessa amostra resultou em alterações na dinâmica das duas subpopulações. Desse modo, essa amostra antes considerada um clone, mostrou ser policlonal.

14) Pressões ambientais como a manutenção no hospedeiro vertebrado e/ou a exposição ao fármaco parecem ser capazes de promover mudanças no perfil genético nas populações de *T. cruzi* em estudo, uma vez que em muitos isolados de animais infectados tratados ou não tratados foi detectada mudança do perfil nos clones previamente inoculados nos animais.

15) Embora não tenha sido demonstrada uma correlação clara entre a genética do parasito e as mudanças no perfil de susceptibilidade ao BZ aqui observadas, no caso do genótipo 19 especialmente, foi verificada uma maior tendência à resistência ao tratamento, quando os clones deste genótipo estavam presentes em infecções mistas.

16) O tratamento de infecções mistas parece ser mais complexo que o tratamento de monoinfecções, possivelmente devido à ocorrência de interações entre as populações do parasito envolvidas. As infecções mistas apresentam resposta terapêutica distinta da esperada quando se consideram os resultados observados em monoinfecções, o que sugere que nessas condições a correlação entre a resposta à quimioterapia e a genética do parasito é ainda mais difícil de ser estabelecida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamsohn IA, Coffman RL (1996). *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol. 84,** 231-244.

Abrahamsohn IA (1998). Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res. 31,** 117-121.

Abrahamsohn IA, da Silva AP, Coffman RL (2000). Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun. 68,** 1975-1979.

Aldunate J, Ferreira J, Letelier ME, Repeto Y, Morello M (1986). t-Butyl-4-hidroxyanisole, a novel respiratory chain innibitor: effects on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **FEBS Lett. 195,** 295-297.

Aguilar R (2000). Influência da espécie de triatomíneo na seleção de subpopulações em infecções mistas de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado, UFMG, 127pp.

Alves ABM, Tanuri A, Almeida DF, von Kruger WMA (1993). Reversible Changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol. 77,** 246-253.

Alves ABM, Almeida DF, von Kruger WMA (1996). Genoma variation in *Trypanosoma cruzi* clonal cultures. **Parasitol. Res. 82,** 410-415.

Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida SS, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM (1996). Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet 348,** 1407-1413.

Andrade SG (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Ver. Pat. Trop. 1,** 65-121.

Andrade SG, Magalhaes JB, Pontes AL (1985a). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull. World Health Organ. 63,** 721-726.

Andrade SG, Andrade V, Brodskyn C, Magalhaes JB, Netto MB (1985b). Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol. 79,** 397-407.

Andrade SG, Silva RC, Santiago CM, Freitas LA (1987). Therapeutic action of MK-436 (2,5-nitroimidazole) on *Trypanosoma cruzi* infections in mice: a parasitological, serological, histopathological, and ultrastructural study. **Bull. World Health Organ. 65,** 625-633.

Andrade SG, Magalhaes JB, Pontes AL (1989). Therapy of the chronic phase of the experimental infection by *Trypanosoma cruzi* with benzonidazole and nifurtimox. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. **22,** 113-118.

Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA (1991a). Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86,** 187-200.

Andrade SG, Freitas LA, Peyrol S, Pimentel AR, Sadigursky M (1991b). Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. **Bull. World Health Organ. 69,** 191-197.

Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Ferriolli FF, Luquetti AO (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86,** 624-626.

Andrade SG, Magalhaes JB (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 V, Brodskyn C, Andrade SG (1983). Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77,** 796-799.

Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG, Magalhaes JB (1985). Immunological aspects of infection of 6 inbred strains of mice by 3 different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 80,** 203-211.

Anez N, Crisante G, Rojas A (2004). Update on Chagas disease in Venezuela- a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99,** 781-787.

Anonymous (1999). Recommendations from a Satellite Meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (suppl. 1).,** 429-432.

Apt W, Aguilera X, Arribada A, Gomes ML, Miles MA, Widmer G (1987). Epidemiology of Chagas Disease in Nothern Chile: isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 37,** 307-302.

Apt W, Aguilera X, Arribada A, Perez C, Miranda C, Sànchez G, Zulantay I, Cortes P, Rodriguez J, Juri D (1998). Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59,** 133-138.

Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sànchez G, Vargas SL, Rodriguez J (2003). Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. **Ann. Trop. Med. Parasitol. 97,** 23-29.

Araújo CA, Cabello PH, Jansen AM (2007). Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: In vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. **Acta Trop. 101,** 225-231.

Araújo MS, Martins-Filho OA, Pereira ME, Brener Z (2000). A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **J. Antimicrob. Chemother. 45,** 819-824.

Arner E, Kindlund E, Nilsson D, Farzana F, Ferella M, Tammi MT, Andersson B (2007). Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20 000 additional gene variants. BMC. **Genomics 8,** 391.

Assis GF, Azeredo BV, Carbajal de la Fuente AL, Diotaiuti L, de LM (2007). Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata* (Correa e Espinola 1964). in the Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med .Trop. 40,** 391-396.

Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan S, Simpson L (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanasoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas´disease. **Parasitol. 48,** 222.

Ávila JL, Ávila A (1981). *Trypanasoma cruzi:* allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. **Exp. Parasitol. 51,** 204-208.

Ávila JL, Ávila A, Monzón H (1984). Differences in allopurinol and 4-aminopyrazolo(3,4-d) pyrimidine metabolism in drug-sensitive and insensitive strains of *Trypanasoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol. 11,** 51-60.

Augusto-Pinto L, Teixeira SM, Pena SD, Machado CR (2003). Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics 164,** 117-126.

Baptista CS, Vencio RZ, Abdala S, Carranza JC, Westenberger SJ, Silva MN, Pereira CA, Galvao LM, Gontijo ED, Chiari E, Sturm NR, Zingales B (2006). Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. **Mol. Biochem. Parasitol. 150,** 236-248.

Barnabé C, Tibayrenc M, Marcondes CB (1999). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*, natural clones from state of Paraíba, Brazil. **Parasitol. 100 (Suppl. 3),** 273-275.

Barnabé 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 (Suppl. 5).,** 513-526.

Bastrenta B, Bosseno MF, Barnabé C, Tibayrenc M, Brenière SF (1999). Restriction fragment length polymorphism of 195 bp repeated satellite DNA of *Trypanosoma cruzi* supports the existence of two phylogenetic groups. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94,** 323-328.

Bastrenta B, Mita N, Buitrago R, Vargas F, Flores M, Machane M, Yacsik N, Torrez M, Le PF, Brenière F (2003). Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98,** 255-264.

Beckman JS, Weber JL (1992). Survey of human and rat microsatellites. **Genomics 12,** 627-631.

Ben Abderrazak S, Guerrini F, Mathieu-Daude F, Truc P, Neubauer K, Lewicka K, Barnabé C, Tibayrenc M (1993). Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. **Methods Mol. Biol. 21,** 361-382.

Becton-Dinckson (1997). FACS Vantage ™ Reference Manual. Becton-Dinckson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA.

Bernstein H, Byerly HC, Hopf FA, Michod RE (1985). Genetic damage, mutation, and the evolution of sex. **Science 229,** 1277-1281.

Beverley SM, Coburn CM (1990). Recurrent de novo appearance of small linear DNAs in *Leishmania major* and relationship to extra-chromosomal DNAs in other species. **Mol. Biochem. Parasitol. 42,** 133-141.

Bice DE, Zeledon R (1970). Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). **J. Parasitol. 56,** 663-670.

Bittecourt AL (2000). Transmissão da doença de Chagas. *In* : *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Brener Z, Andrade ZA & Barral-Neto M (Orgs.), 16-20.

Bock M , Gonert R, Haberkon A (1969). Studies with Bay2502 on animals. **Bol. Chil. Parasitol. 24,** 13-19.

Boczko J, Tar M, Melman A, Jelicks LA, Wittner M, Factor SM, Zhao D, Hafron J, Weiss LM, Tanowitz HB, Christ GJ (2005). *Trypanosoma cruzi* infection induced changes in the innervation, structure and function of the murine bladder. **J. Urol. 173,** 1784-1788.

Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC (1996). Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. **Acta Trop. 61,** 31-40.

Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, Brenière SF (1996). *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian Triatoma infestans vectors shows a high frequency of mixed infections. **Exp. Parasitol. 83,** 275-282.

Bosseno MF, Yacsik N, Vargas F, Brenière SF (2000). Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39). isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95,** 601-607.

Bosseno MF, Barnabé C, Magallon GE, Lozano KF, Ramsey J, Espinoza B, Brenière SF (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. **J. Clin. Microbiol. 40,** 627-632.

Branche C, Ochaya S, Aslund L, Andersson B (2006). Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. Mol.Biochem. **Parasitol. 147,** 30-38.

Brener Z (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 4,** 389-396.

Brener Z, Chiari E (1963). Morphological variations observed in different strain of *Trypanasoma cruzi*. **Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo 19,** 220-224.

Brener Z, Costa CA, Chiari C (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo 18,** 450-455.

Brener Z, Cancado JR, Galvao LM, da Luz ZM, Filardi LS, Pereira ME, Santos LM, Cancado CB (1993). An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88,** 149-153.

Brener Z, Gazzinelli RT (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol. 114,** 103-110.

Brenière SF, Tibayrenc M, Antezana G, Pabon J, Carrasco R, Selaes H, Desjeux P (1985). Preliminary results suggesting a tenuous or nonexistent relation between clinical forms of Chagas disease and isoenzyme strains of *Trypanosoma cruzi*. **C .R. Acad. Sci.III 300,** 555-557.

Brenière SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yaksic N, Noireau F (1995). Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 53,** 179-184.

Brenière SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, Noireau F, Alcazar JL, Barnabé C, Wincker P, Tibayrenc M (1998). Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. **Exp. Parasitol. 89,** 285-295.

Brenière SF, Bosseno MF, Noireau F, Yacsik N, Liegeard P, Aznar C, Hontebeyrie M (2002). Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97,** 289-295.

Brenière SF, Barnabé C, Bosseno MF, Tibayrenc M (2003). Impact of number of isoenzyme loci on the robustness of intraspecific phylogenies using multilocus enzyme electrophoresis: consequences for typing of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. 127,** 273-281.

Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Int. J. Parasitol. 30,** 35-44.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **Int. J. Parasitol. 31,** 1218-1226.

Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M (2003). Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infect. Genet. Evol**. **2,** 173-183.

Brito C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macedo V, Fernandes O (2001). Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnostic and polimerare chain reaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96,** 823-826.

Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, Teijeiro R, Lopez AH, Deccarlini F, Freilij H, Levin MJ, Levalle J, Macedo AM, Schijman AG (2005). Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 73,** 1016-1018.

Burleigh BA, Andrews NW (1998). Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Opin. Microbiol. 1,** 461-465.

Burleigh BA, Woolsey AM (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell Microbiol. 4,** 701-711.

Buscaglia CA, Di Noia JM (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes. Infect. 5,** 419-427.

Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat. Rev. Microbiol. 4,** 229-236.

Cabrine-Santos M, dos S, V, de Lima MA, de Abreu ME, Lages-Silva E, Ramirez LE (2003). Genitourinary changes in hamsters infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98,** 523-528.

Caldas S, Santos FM, Lana MD, Diniz LF, Machado-Coelho GL, Veloso VM, Bahia MT (2007). *Trypanosoma cruzi*: Acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. **Exp. Parasitol.** *In press.*

Camandaroba ELP, Reis EG, Gonçalves MS, Reis MG, Andrade SG (2003). *Trypanosoma cruzi*: Susceptibilidade to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34 (2),** 201-209.

Camargo EP (1964). Growth and differetiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metaciclic Trypanosomes in Liquid Media. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 12,** 93-100.

Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Gazzinelli RT (1997). Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J. Immunol. 158,** 5890-5901.

Campo VA, Buscaglia CA, Di Noia JM, Frasch AC (2006). Immunocharacterization of the mucin-type proteins from the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. **Microbes. Infect. 8,** 401-409.

Campos MA, Gazzinelli RT (2004). *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators. **Inflamm**. **13,** 139-143.

Campos RF, Magalhaes JB, Reis EA, Reis MG, Andrade SG (2002). Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of known aliquots of *Trypanosoma cruzi* in the blood of mice: an in vitro study. **Rev. Soc. Bras. Med . Trop. 35,** 487-490.

Cano MI, Gruber A. Vazquez M, Cortés A, Levin MJ, Gonzalez A, Degrave W, Rondinelli E, Ramirez JL, Alonso C, Requena JM e Franco da Silveira J (1995). Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome Project. **Mol. Biochem. Parasitol. 71**, 273-278.

Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ (1990). Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. **Acta Trop 47,** 35-45.

Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86,** 387-393.

Carrasco HJ, Frame IA, Valente SA, Miles MA (1996). Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 54,** 418-424.

Carreira JC, Jones C, Wait R, Previato JO, Mendonca-Previato L (1996). Structural variation in the glycoinositolphospholipids of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Glycoconj. J. 13,** 955-966.

Castro C, Craig SP, Castaneda M (1981). Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol. 4,** 273-282.

Chagas CJ (1909). Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1,** 159-218.

Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Costa Rocha MO, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Romanha AJ (2001). Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. **Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8,** 112-118.

Coronado X, Zulantay I, Albrecht H, Rozas M, Apt W, Ortiz S, Rodriguez J, Sànchez G, Solari A (2006a). Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 74,** 1008-1012.

Coronado X, Zulantay I, Rozas M, Apt W, Sànchez G, Rodriguez J, Ortiz S, Solari A (2006b). Dissimilar distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in humans after chemotherapy with allopurinol and itraconazole. **J. Antimicrob. Chemother. 58,** 216-219.

Corrales M, Cardozo R, Segura MA, Urbina JA, Basombrio MA (2005). Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. **Antimicrob. Agents Chemother. 49,** 1556-1560.

Cortez M, Neira I, Ferreira D, Luquetti AO, Rassi A, Atayde VD, Yoshida N (2003). Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infect. Immun. 71,** 6184-6191.

Costa-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S (2001). The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol. Biochem. Parasitol. 114,** 143-150.

Coura JR, Castro SL (2002). A critical review on Chagas' disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97,** 3-24.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol. 18,** 171-176.

Cruz RE (2002). PCR em tecidos-órgãos na detecção da infecção chagásica crônica em cães infectados com as cepas Be-62 e Be-78 de *Trypanosoma cruzi* e caracterização fenotípica e molecular do parasito. Dissertação de Mestrado, UFOP, 99pp.

Cruz RE, Macedo AM, Barnabé C, Freitas JM, Chiari E, Veloso VM, Carneiro CM, Bahia MT, Tafuri WL, Lana M (2006). Further genetic characterization of the two *Trypanosoma cruzi* Berenice strains (Be-62 and Be-78) isolated from the first human case of Chagas disease (Chagas, 1909). **Acta Trop. 97,** 239-246.

Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O (2002). Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97,** 877-880.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De M, I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J (1995). Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92,** 3541-3545.

de Luca D'oro GM, Gardenal CN, Perret B, Crisci JV, Montamat EE (1993). Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. **Parasitol. 107 (Pt 4),** 405-410.

Deane MP, Mangia RH, Pereira NM, Momen H, Gonçalves AM, Morel CM (1984). *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79,** 495-497.

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, van HH, Kidane GZ, Cardoso MA, Mueller RU, Simpson L, Morel CM (1988). Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol. 27,** 63-70.

Devera R, Fernandes O, Coura JR (2003). Should *Trypanosoma cruzi* be called complex? A review of the parasite diversity and the potencial of selecting population after *in vitro* culturing na mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cru 98 (Supp. 1),** 1-12.

Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **J. Exp. Med. 195,** 401-413.

Dias JCP (1992). Epidemiology of Chagas disease. *In*: Chgas disease (American trypanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, Brazil - SBHH 49-80.

Dias JCP (2006a). Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. **39,** 370-375.

Dias JCP (2006b). Chagas disease: Sucesses and challenges. **Cad. de Saude Publica 22,** 2020-2021.

Dias JCP (2007). Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of Triatoma infestans and the interruption of Transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** *In press*

Dias JCP, Schofield C (1999). The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis). control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (Suppl . 1),** 103-121.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97,** 603-612.

Díaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzullo JJ (1988). Interaction on Benznidazole reative metabolites with nuclear and Kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experentia 44,** 880-881.

Diego JA, Palau MT, Gamallo C, Penin P (1998). Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. **Trop. Med. Int. Health 3,** 222-233.

Diosque P, Barnabé C, Padilla AM, Marco JD, Cardozo RM, Cimino RO, Nasser JR, Tibayrenc M, Basombrio MA (2003). Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. **Int. J. Parasitol. 33,** 997-1003.

Diotaiuti L, Faria Filho OF, Carneiro FC, Dias JC, Pires HH, Schofield CJ (2000). Operational aspects of *Triatoma brasiliensis* control. **Cad. Saúde Pública 16 (Suppl. 2),** 61-67.

Docampo R, Stoppani AO (1980). Mechanism of the trypanocidal action of nifurtimox and other nitro-derivatives on *Trypanosoma cruzi*. **Medicina (B Aires) 40 (Suppl. 1),** 10-16.

Docampo R, Moreno SN (1984). Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis. 6,** 223-238.

Dost CK, Saraiva J, Monesi N, Zentgraf U, Engels W, Albuquerque S (2004). Six *Trypanosoma cruzi* strains characterized by specific gene expression patterns. **Parasitol. Res. 94,** 134-140.

D'Silva C, Daunes S (2002). The therapeutic potential of inhibitors of the trypanothione cycle **Exp. Opin. Invest. Drugs 11,** 217-231.

Du X, Guo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, Holler TP, McKerrow JH, Cohen FE (2002). Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzipain. **J. Med. Chem. 45,** 2695-2707.

Dujardin JC, De DS, Jacquet D, Banuls AL, Balavoine M, Van BD, Tibayrenc M, Arevalo J, Le RD (2007). Clonal propagation and the fast generation of karyotype diversity: An in vitro Leishmania model. **Parasitol. 134,** 33-39.

Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. Trends **Parasitol. 21,** 581-587.

Dvorak JA, Hartmam DL (1980). *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. **J. Protozool. 27,** 472-474.

Einicker-Lamas M, Malaquias AT, de Castro SL, Smith GA, Oliveira MM (1999). Effects of fluorinated inositols on the phosphoinositide metabolism and the proliferation of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res. 85,** 232-238.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C,

Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de JP, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sànchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van AS, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science 309,** 409-415.

Ellegren H (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat. Rev. Genet 5,** 435-445.

Engel JC, Torres C, Hsieh I, Doyle PS, McKerrow JH (2000). Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell Sci. 113 (Pt 8).,** 1345-1354.

Felsenstein J (2007). PHYLIP: Phylogenetic inference Package, Versão, 3.67c. Universtiy of Washington.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degrave W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR (1998). Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 58,** 807-811.

Fernandes O, Jansem A.M.cols, cols (1999). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by nontrascribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitol. 118,** 161-166.

Ferreira J, Coloma J, Fones E, Letelier ME, Repetto Y, Morello A, Aldunate J. (1988). Effects of t-butyl-4-hidroxyanisole and other phenolic antioxidants on tumurol cells and *Trypanosoma* parasites. **FEBS Lett. 234,** 485-488.

Ferreira KA, Lemos-Junior PE, Lages-Silva E, Ramirez LE, Pedrosa AL (2007). Human urine stimulates *in vitro* growth of *Trypanosoma cruzi* and Trypanosoma rangeli. **Parasitol. Res. 101,** 1383-1388.

Filardi LS, Brener Z (1982). A nitromidazole-thiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Ann. of tropical Med. Parasitol**. 76**,** 293-297.

Filardi LS, Brener Z (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81,** 755-759.

Forattini OP (2006). Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliarity in Brazil. **Rev. Saúde Pública 40,** 964-998.

Fragata-Filho AA, da Silva MA, Boainain E (1995). Ethiologic treatment of acute and chronic Chagas' Disease. **São Paulo Med. J. 113,** 867-872.

Francisco AF, Vieira MD, Arantes JM, Pedrosa ML, Martins HR, Silva M, Veloso VM, Lana M, Bahia MT, Tafuri WL, Carneiro CM (2008). *Trypanosoma cruzi*: effect of Benzonidazole

therapy combined with the iron chelator Desferrioxamine in mice. **Exp. Parasitol., artigo submetido.**

Franco DJ, Vago AR, Chiari E, Meira FC, Galvao LM, Machado CR (2003). *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. **Exp. Parasitol. 104,** 54-61.

Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM (2005). Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int. J. Parasitol. 35,** 411-417.

Freitas JM, ugusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS. Pathog.. 2,** e24.

Freymann DM, Wenck MA, Engel JC, Feng J, Focia PJ, Eakin AE, Craig SP (2000). Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. **Chem. Biol. 7,** 957-968.

Galvão Da Silva AP, Jacysyn JF, De AA, I (2003). Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology 108,** 230-237.

Garcia E, Azanbuja P (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol. Today 7,** 240-244.

Garcia ES, Dvorak JA (1982). Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 31,** 259-262.

Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB (2005). Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrob. Agents Chemother. 49,** 1521-1528.

Garraud O, Andreu G, Elghouzzi MH, Laperche S, Lefrere JJ (2007). Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in non-endemic countries. **Travel. Med. Infect. Dis. 5,** 110-112.

Garzon E, Genna F, Bosseno MF, Simony-La FJ, Radal M, Sereno D, Mathieu-Daude F, Ouaissi A, Brenière SF (2005). Differential infectivity and immunopathology in murine experimental infections by two natural clones belonging to the *Trypanosoma cruzi* I lineage. **Parasitol. 131,** 109-119.

Garzoni LR, Waghabi MC, Baptista MM, de Castro SL, Meirelles MN, Britto CC, Docampo R, Oldfield E, Urbina JA (2004). Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. **Int. J. Antimicrob. Agents 23,** 286-290.

Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR, Miles MA (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature 421,** 936-939.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A (1992). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. Eur. **J. Immunol. 22,** 2501-2506.

Gobbi P, (2007), Lo Presti MS, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Plagini-oliva C, Rivorola HW. Allopurinol is effective to modiffy the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection mice. **Parasitol. Res. 101,** 1459-1462.

Goldstein DB, Pollock DD (1997). Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic interference. **J. Hered. 88,** 335-342.

Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvao LM, Chiari E (1998). *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Exp. Parasitol. 88,** 28-33.

Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E (1999). Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 60,** 205-210.

Gonzalez J, Munoz S, Ortiz S, Anacona D, Salgado S, Galleguillos M, Neira I, Sagua H, Solari A (1995). Biochemical, immunological, and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* populations of the Andean north of Chile. **Exp. Parasitol. 81,** 125-135.

Guedes PM, Veloso VM, Tafuri WL, Galvao LM, Carneiro CM, Lana M, Chiari E, Ataide SK, Bahia MT (2002). The dog as a model for chemotherapy of the Chagas' disease. **Acta Trop. 84,** 9-17.

Guedes PM, Urbina JA, de Lana M, Afonso LC, Veloso VM, Tafuri WL, Machado-Coelho GL, Chiari E, Bahia MT (2004). Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in dog hosts. **Antimicrob. Agents Chemother. 48,** 4286-4292.

Guedes PM, Fietto JLR, Lana M, Bahia MT (2006). Advances in Chagas Disease Chemotherapy. **Anti-infective Agents in Med. Chem.** 5:175-186.

Guhl F (2007). Chagas disease in Andean countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102 (Suppl . 1),** 29-38.

Gurtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Petersen RM, Chuit R, Segura EL, Cohen JE (2005). Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 73,** 95-103.

Hajduk SL, Sabatini RS (1996). RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. *In*: Smith DF & Parsons M. Molecular Biology of Parasitic Protozoa, IRL Press Oxford, 135-158.

Hancock JM (1999). Microssatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms 1, 1-9 *In*: Goldestein DB & Schlöllterer, C. Microssatellites: evolution and applications, Oxford University Press.

Hecker K & Roux KH (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown an step-down PCR. **Biotechiniques 20**, 478-485.

Henderson ST, Petes TD (1992). Instability of simple sequence DNA in Saccharomyces cerevisiae. **Mol. Cell Biol. 12,** 2749-2757.

Henriksson J, Pettersson U, Solari A (1993). *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. **Exp Parasitol 77,** 334-348.

Henriksson J, Aslund L, Pettersson U (1996). Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today 12,** 108-114.

Henriksson J, Dujardin JC, Barnabé C, Brisse S, Timperman G, Venegas J, Pettersson U, Tibayrenc M, Solari A (2002). Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. **Parasitol. 124,** 277-286.

Higo H, Miura S, Horio M, Mimori T, Hamano S, Agatsuma T, Yanagi T, Cruz-Reyes A, Uyema N, Rojas de AA, Matta V, Akahane H, Hirayama K, Takeuchi T, Tada I, Himeno K (2004). Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. **Parasitol. Int. 53,** 337-344.

Higuchi MD, Brito Td, Reis MM (1993). Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism an myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: ligth microspy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc. Path. 2,** 101-106.

Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F (1997). Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 56,** 485-489.

Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV (1993). Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol. 151,** 7038-7047.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich SS, Sachs JD (2006). Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS. Med. 3,** e102.

Iovannisci DM, Berveley SM (1989). Structural alterations of chromosome 2 in *Leishamnia major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. **Mol. Biochem. Parasitol. 34,** 177-188.

Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Societé vaudoise de Sciences Naturalles 44,** 223-270.

Jaramillo N, Moreno J, Triana O, rcos-Burgos M, Munoz S, Solari A (1999). Genetic structure and phylogenetic relationships of Colombian *Trypanosoma cruzi* populations as determined by schizodeme and isoenzyme markers. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 61,** 986-993.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature 314,** 67-73.

Kilgour V, Godfrey DG (1976). Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70,** 219-224.

Kirchhoff LV (1993). American trypanosomiasis (Chagas' disease).--a tropical disease now in the United States. **N. Engl. J. Med. 329,** 639-644.

Kirchhoff LV, Paredes P, Lomeli-Guerrero A, Paredes-Espinoza M, Ron-Guerrero CS, gado-Mejia M, Pena-Munoz JG (2006). Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for Transfusion medicine in the United States. **Transfusion 46,** 298-304.

Kirchhoff LV, Pearson RD (2007). The emergence of chagas disease in the United States and Canada. **Curr. Infect. Dis. Rep. 9,** 347-350.

Korochkin L (1978). Genetic regulation of isozyme synthesis in cells. **Int. Rev. Cytol. Suppl 8,** 171-228.

Kretteli AU, Brener Z (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol. 128,** 2009-2012.

Lages-Silva E, Filardi LS, Brener Z (1990). Effect of the host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85,** 401-405.

Lages-Silva E, Ramirez LE, Pedrosa AL, Crema E, da Cunha Galvao LM, Junho Pena SD, Macedo AM, Chiari E (2006). Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **J. Clin. Microbiol. 44,** 2167-2171.

Lana M, da Silveira PA, Barnabé C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. **Exp. Parasitol. 90,** 20-25.

Lana M, da Silviera PA, Bastrenta B, Barnabé C, Noel S, Tibayrenc M (2000). *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. **Exp. Parasitol. 96,** 61-66.

Lana M, Toledo MJO (2004). Genetic instability in *Trypanosoma cruzi* stocks. *In*: VII International Meeting on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infeccious Disease (MEEGID VII), Valência., p.124.

Lanar DE, Levy LS, Manning JE (1981). Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol. 3,** 327-341.

Laurent JP, Barnabé C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M (1997). Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. 114 (Pt 3).,** 213-218.

Lauria-Pires L, de Castro CN, Emanuel A, Prata A (1988). Ineffectiveness of allopurinol in patients in the acute phase of Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 21,** 79.

Lauria-Pires L, Bogliolo AR, Teixeira AR (1996a). Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP characterizations. **Exp. Parasitol. 82,** 182-190.

Lauria-Pires L, Teixeira AR (1996b). Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 55,** 304-310.

Lauria-Pires L, Santana JM, Tavares FS, Teixeira AR (1997). Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I--Behavioral characterization in vitro. **Rev. Soc. Bras. Med .Trop. 30,** 187-192.

Lenzi HL, Castelo-Branco MT, Pelajo-Machado M, Oliveira DN, Gattass CR (1998). *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. **Acta Trop. 71,** 117-129.

Levinson G, Gutman GA (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequences evolution. **Mol. Biol. Evol**. **4**, 203-221.

Lewicka K, Brenière-Campana SF, Barnabé C, Dedet JP, Tibayrenc M (1995). An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana. **Exp. Parasitol. 81,** 20-28.

Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski A, Jr., Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM (2006). Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. **Parasitol. 133,** 603-611.

Lisboa CV, Pinho AP, Monteiro RV, Jansen AM. (2007). Trypanosoma cruzi (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. Exp. Parasitol. 116 (Suppl. 2): 150-155.

Lo Presti MS, Rivar HW, Bustamante JM, Ferndez AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Paglini-Oliva PA (2004). Thioridazine treatment prevents cardiopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice **Int. J. Antimicrob. Agents. 23,** 634-636.

Litt M, Luty JA (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Gen. 44**, 397-401.

Luitgards-Moura JF, Vargas AB, Almeida CE, Magno-Esperanca G, gapito-Souza R, Folly-Ramos E, Costa J, Tsouris P, Rosa-Freitas MG (2005). A *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). population from Roraima, Amazon region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 47,** 131-137.

Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD (1992). DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Mol. Biochem. Parasitol 55,** 147-153.

Macedo AM, Pena SDJ (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitol. Today 14,** 119-123.

Machado CA, Ayala FJ (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98,** 7396-7401.

Maldonado RA, Molina J, Payares G, Urbina JA (1993). Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. **Antimicrob. Agents Chemother. 37,** 1353-1359.

Marques de Araújo S, Chiari E (1988). Caracterização Biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83,** 175-181.

Marr JJ (1991). Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. **J. Lab. Clin. Med. 118,** 111-119.

Martin D, Tarleton R (2004). Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol. Rev. 201,** 304-317.

Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, Heath HT, III, Bailey BN, Kendrick H, Yardley V, Caldera A, Lira R, Urbina JA, Moreno SN, Docampo R, Croft SL, Oldfield E (2001). Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. **J. Med. Chem. 44,** 909-916.

Martins HR, Toledo MJ, Veloso VM, Carneiro CM, hado-Coelho GL, Tafuri WL, Bahia MT, Maya JD, Morello A, Repetto Y, Rodriguez A, Puebla P, Caballero E, Medarde M, Nunez-Vergara LJ, Squella JA, Ortiz ME, Fuentealba J, San FA (2001). *Trypanosoma cruzi*: inhibition of parasite growth and respiration by oxazolo(thiazolo)pyridine derivatives and its relationship to redox potential and lipophilicity. **Exp. Parasitol. 99,** 1-6.

Martins-Filho OA, Pereira ME, Carvalho JF, Cancado JR, Brener Z (1995). Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. **Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2,** 569-573.

Maya JD, Rodriguez A, Pino L, Pabon A, Ferreira J, Pavani M, Repetto Y, Morello A (2004). Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Res. 37,** 61-69.

Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faundez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp. Biochem. Physiol. A. 146,** 601-620.

McCabe RE, Remington JS, Araujo FG (1984). Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. **J. Infect. Dis. 150,** 594-601.

McDaniel JP, Dvorak JA (1993). Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. **Mol. Biochem. Parasitol. 57,** 213-222.

Mejia AM, Triana O (2005). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR. **Biomedica. 25,** 76-86.

Melo RC, Brener Z (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol. 64,** 475-482.

Melo RC, Fabrino DL, D'Avila H, Teixeira HC, Ferreira AP (2003). Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. **Cell Biol. Int. 27,** 853-861.

Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, Romanha AJ, Gazzinelli RT (1998). Interleukin-12 enhances in vivo parasiticidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother. 42,** 2549-2556.

Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG (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 MA, Souza A, Povoa M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature 272,** 819-821.

Miles MA (1979). Transmission cycles and heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. In: Biology of the Kinetoplastida, Vol.2, Lumsden, W.H.R.& Evans, D.A.(Orgs.). 117-116.

Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Povoa M (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74,** 221-237.

Miles MA, de Souza AA, Povoa M (1981a). Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Para State, Brazil. **J. Med. Entomol. 18,** 266-278.

Miles MA, Cedillos RA, Povoa MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V (1981b). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **Lancet 1,** 1338-1340.

Miles MA, Povoa MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS (1981c). Chagas's disease in the Amazon Basin: The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75,** 667-674.

Minoprio P (2001). Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? **Int. J. Parasitol. 31,** 588-591.

Miralles DM, Marin C, Magan R, Fernandez-Ramos C, Entrala E, Cordova O, Vargas F, Sànchez-Moreno M (2002). *In vitro* culture and biochemical characterization of six trypanosome isolates from Peru and Brazil. **Exp. Parasitol. 102,** 23-29.

Miyamoto CT, Gomes ML, Marangon AV, Araujo SM, Bahia MT, Lana M, Toledo MJ (2006). *Trypanosoma cruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. **Exp. Parasitol. 112,** 198-201.

Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA (2000). Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. **Antimicrob. Agents Chemother. 44,** 150-155.

Moncayo A (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98,** 577-591.

Moncayo A, Ortiz Yanine MI (2006). An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann. Trop. Med. Parasitol. 100,** 663-677.

Montalvetti A, Bailey BN, Martin MB, Severin GW, Oldfield E, Docampo R (2001). Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **J. Biol. Chem. 276,** 33930-33937.

Montamat EE, Luca D'Oro GM, Gallerano RH, Sosa R, Blanco A (1996). Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 55,** 625-628.

Montilla MM, Guhl F, Jaramillo C, Nicholls S, Barnabé C, Bosseno MF, Brenière SF (2002). Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 66,** 394-400.

Moreira AAB, Souza HBWT, Amato-Neto V, Matusubara L, Pinto PLS, Tolezano JE, Nunes EV, Okumura M (1992). Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 34 (2),** 177-180.

Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77,** 6810-6814.

Moreno SN, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AO (1982). Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Arch. Biochem. Biophys. 218,** 585-591.

Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Mol. Biochem. Parasitol. 93,** 203-214.

Murta SM, Ropert C, Alves RO, Gazzinelli RT, Romanha AJ (1999). *In vivo* treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypansoma cruzi* population. **Parasite Immunol. 21,** 535-544.

Myler PJ (1993). Molecular variation in trypanosomes. **Acta Trop. 53,** 205-225.

Nabors GS, Tarleton RL (1991). Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol. 146,** 3591-3598.

Nakajima-Shimada J, Hirota Y, Aoki T (1996). Innibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. **Ant. Agents Chemother. 40,** 2455-2458.

Neira I, Ferreira AT, Yoshida N (2002). Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **Int. J. Parasitol. 32,** 405-414.

Nitz N, Gomes C, de Cassia RA, D'Souza-Ault MR, Moreno F, Lauria-Pires L, Nascimento RJ, Teixeira AR (2004). Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. **Cell 118,** 175-186.

Noireau F, Bosseno MF, Carrasco R, Telleria J, Vargas F, Camacho C, Yaksic N, Breniere SF (1995). Sylvatic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: trends toward domesticity and possible infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **J. Med. Entomol. 32,** 594-598.

Ogita Z (1968). Genetic control of isozymes. **Ann. N.Y. Acad. Sci. 151,** 243-262.

Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonca-Previato L, Nobrega A, Bellio M (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **J. Immunol. 173,** 5688-5696.

Oliveira MM, Einicker-Lamas M (2000). Inositol metabolism in *Trypanosoma cruzi*: potential target for chemotherapy against Chagas' disease. **Ann. Acad. Bras. Cienc. 72,** 413-419.

Oliveira RP, Macedo AM, Chiari E, Pena SD (1997). An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. **Parasitol. Today 13,** 196-200.

Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD (1998). Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95,** 3776-3780.

Pacheco RS, Brito CM (1999). Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 Suppl 1,** 199-201.

Pimenta JR (2002). Análises filiogenéticas e populacionais em *Trypanosoma cruzi* a partir de estudos de microsatélites polimórficos de DNA. Tese de doutorado, UFMG, Belo Horizonte. 150pp.

Pinto AS, de Lana M, Bastrenta B, Barnabé C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M (1998). Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in Triatoma infestans. **Parasitol. Res. 84,** 348-353.

Pinto AS, de Lana M, Britto C, Bastrenta B, Tibayrenc M (2000). Experimental *Trypanosma cruzi* biclonal infection in Triatoma infestans: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. **Int. J. Parasitol 30,** 843-848.

Pollevick GD, Di Noia JM, Salto ML, Lima C, Leguizamon MS, de Lederkremer RM, Frasch AC (2000). *Trypanosoma cruzi* surface mucins with exposed variant epitopes. **J. Biol. Chem. 275,** 27671-27680.

Ponce C (2007). Current situation of Chagas disease in Central America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102 (Suppl. 1),** 41-44.

Porcille PE, Santos MR, Souza RT,Verbisck NV, Brandão A, Urmenyi T, Silva R, Rondinelli E, Lorenzi H, Levin MJ, Degrave W, Franco da Silveira J (2003). A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener). by assignment of chromosome markers. **Gene 308,** 53-65.

Previato JO, Wait R, Jones C, DosReis GA, Todeschini AR, Heise N, Previato LM (2004). Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. **Adv. Parasitol. 56,** 1-41.

Reed SG (1988). In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol. 140,** 4342-4347.

Reesink HW (2005). European strategies against the parasite transfusion risk. **Transfus. Clin. Biol. 12,** 1-4.

Requena JM, Lopez MC, Alonso C (1996). Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today 12,** 279-282.

Revollo S, Oury B, Laurent JP, Barnabé 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.

Richle R (1973). Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of Ro-71051 on parasitemia and tissue parasitism. **Le Progress Med. 101,** 282.

Riou GF, Yot P (1977). Heterogeneity of the kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry 16,** 2390-2396.

Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, Gonzalez Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamon MS (2004). Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. **J. Infect. Dis. 189,** 2250-2259.

Rivarola HW, Paglini-Oliva PA (2002). *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord. 2,** 43-52.

Robello C, Gamarro F, Castanys S, varez-Valin F (2000). Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. **Gene 246,** 331-338.

Rodriguez-González I, Marin C, Hitos AB, Rosales MJ, Gutierrez-Sànchez R, Sànchez-Moreno M (2004). Biochemical characterization of new strains of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* isolates from Peru and Mexico. **Parasitol. Res. 94,** 294-300.

Romanha AJ, Silva Pereira AA, Chiari E, Kilgour V (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. **Comp. Biochem. Physiol. B 62,** 139-142.

Romanha AJ (1982). Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado, Belo Horizonte, UFMG, 110pp.

Romanha AJ, Alves RO, Murta SM, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT (2002). Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **J. Infect. Dis. 186,** 823-828.

Rozas M, De DS, Adaui V, Coronado X, Barnabé C, Tibyarenc M, Solari A, Dujardin JC (2007a). Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment--length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. **J. Infect. Dis. 195,** 1381-1388.

Rozas M, Botto-Mahan C, Coronado X, Ortiz S, Cattan PE, Solari A (2007b). Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and periodomestic mammals in Chile. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 77,** 647-653.

Ruiz RC, Favoreto S Jr, Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N (1998). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca2+ signalling activity. **Biochem. J**. **330 (Pt 1).,** 505-511.

Ryder NS, Mieth H (1992). Allylamine antifungal drugs. **Curr.Top.Med.Mycol**. **4,** 158-188.

Salazar A, Schijman AG, Triana-Chavez O (2006). High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures.. **Acta Trop. 100,** 110-118.

Sànchez-Guillén MC, Bernabe C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J, Totolhua JL, Mendez-Lopez J, Gonzalez-Mejia ME, Torres-Rasgado E, Lopez-Colombo A, Perez-Fuentes R (2006). *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101,** 585-590.

Sànchez G, Wallace A, Olivares M, Diaz N, Aguilera X, Apt W, Solari A (1990). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: *in vitro* differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. **Exp. Parasitol. 71,** 125-133.

Santos DM (2007). Influência da variabilidade genética (evolução clonal) do *Trypanosoma cruzi* na reativação da doença de Chagas após imunussupressão com ciclofasmida. Dissertação de Mestrado, UFOP, 86pp.

Santos DM, Talvani A, Guedes PMM, Veloso VM, Machado-Coelho GLL, Lana M, Bahia MT. (2007). *Trypanosoma cruzi*: genetic diversity influences the profile of immunoglobuline during experimental infections. **Exp. Parasitol.** Artigo submetido.

Santos FR, Pena SDJ, Epplen JT (1993). Genetic & population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Human Genetic 90,** 655-656.

Santos MR, Cano MI, Schijman A, Lorenzi H, Vazquez M, Levin MJ, Ramirez JL, Brandão A, Degrave WM, da Silveira JF (1997). The *Trypanosoma cruzi* genome project: nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92**, 821-828.

Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac C, Jr., Gomes TF, Cabello PH, Lima MM (2004). Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceara, Brazil. I. Presence of triatomines and

index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99,** 263-270.

Savino W, Villa-Verde DM, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki MP, Bottasso O, Guinazu N, Silva-Barbosa SD, Gea S (2007). Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine Growth Factor Rev. 18,** 107-124.

Schmunis GA (2007). Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** *In press*

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R (2006). The future of Chagas disease control. **Trends Parasitol. 22,** 583-588.

Shriver MD, Jin L, Chakraborty R (1993). VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model: a computer simulation approach. **Genetics 134,** 983-993.

Scremin LH, Corbett CE, Laurenti MD, Nunes EV, Gama-Rodrigues JJ, Okumura M (1999). Megabladder in experimental Chagas disease: pathological features of the bladder wall. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo 54,** 43-46.

Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2005). Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. de Med. Trop. 38 (Suppl. III),** 29pp.

Segura MA, Molina de RE, Basombrio MA (1994). Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanomicidal treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89,** 213-216.

Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG (1992). Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med. 175,** 169-174.

Silveira JF (2000). Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z Andrade ZA (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Segunda Edição, Editora Guanabara Koogan, RJ: 127-152.

Sloof P, Bos JL, Konings AF, Menke HH, Borst P, Gutteridge WE, Leon W (1983). Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Mol. Biol. 167,** 1-21.

Simpson L (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annu.Rev.Microbiol. 41,** 363-382.

Solari A S, Munoz J, Venegas A, Wallace X, Aguilera W, Apt S, Breniere F, Tibayrenc M (1992). Characterization of Chilean, Bolivian, and Argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. **Exp. Parasitol. 75,**187-195.

Solari A, Wallace A, Ortiz S, Venegas J, Sànchez G (1998). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors. **Exp. Parasitol. 89,** 312-322.

Solari A, Campillay R, Ortiz S, Wallace A (2001*)*. Identification of *Trypanosma cruzi* genotypes oacirculating in Chilean chagasic patients. **Exp. Parasitol. 97,** 226-233.

Souto RP, Zingales B (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Mol. Biochem. Parasitol. 62,** 45-52.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol. 83,** 141-152.

Steindel M, Dias NE, de Menezes CL, Romanha AJ, Simpson AJ (1993). Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol. Biochem. Parasitol. 60,** 71-79.

Stoppani AOM (1999). Quimioterapia de La Enfermedad de Chagas. **Med. 59 (Suppl. II),** 147-165.

Stuart K (1995). RNA editing: an overview, status report, and personal perspective. *In*: Boothroyd JC & Komuniecki R. **Molecular Approaches to Parasitol.,** Wiley-Liss, Inc. NY, 243-254.

Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol. Biochem. Parasitol. 33,** 205-214.

Sturm NR, Simpson L (1990). Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. **Cell 61,** 879-884.

Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol. 33,** 269-279.

Suasnábar SA, Arias E, Streiger m Piacenza M, Ingaramo M, Del Barco M, Amicone N (2000). Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nirfurtimox or benznidazole). and untreated chronic chagasic patients. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 42** (**suppl. 2)**, 99-109.

Szajnman SH, Montalvetti A, Wang Y, Docampo R, Rodríiguez JB (2003). Biophosphonare potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate sintase. **Bioorg. Med. Chem. Lett. 13,** 3231-3235.

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature 356,** 338-340.

Tarleton RL (2003). Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends Parasitol. 19,** 447-451.

Tarleton RL (2007). Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Opin. Immunol. 19,** 430-434.

Tautz D (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res**. **17**, 6463-6471.

Teixeira AR, Arganaraz ER, Freitas LH, Jr., Lacava ZG, Santana JM, Luna H (1994). Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. **Mutat. Res. 305,** 197-209.

The National Health Foudantion of Brazil (1996). Etiological Treatment for Chagas Disease. **Parasitol. Today 13 (4),** 127-130.

Thomaz S, V, Barnabé C, Castro E, Luz E, Tibayrenc M (2002). *Trypanosoma cruzi*: isoenzyme analysis suggests the presence of an active Chagas sylvatic cycle of recent origin in Parana State, Brazil. **Exp. Parasitol.** 100, 81-86.

Tibayrenc, M., Cariou, M. L., Solignac, J P, Dedet, J. P., and Poch, O. Dejeux P (1985). New electrophoretic evidence of genetic variation & diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **Genetic** 23, 223-225.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 83,** 115-119.

Tibayrenc M, Ayala FJ (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. **Evolution 42,** 277-292.

Tibayrenc M, Brenière SF (1988). *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83 (Suppl. 1),** 249-255.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90,** 1335-1339.

Tibayrenc M (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Adv. Parasitol. 36,** 47-115.

Tibayrenc M (1998). Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93,** 577-580.

Tibayrenc M (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units). and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid. Biol. Dis. 2,** 12.

Toledo MJO (1992). Influência da resposta imune na quimioterapia da doença de Chagas experimental em camundongos. Dissertação de Mestrado, UFMG, 104pp.

Toledo (2001). Comportamento biológico em camundongos de clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a diferentes genótipos. Tese de doutorado, UFMG, 165pp.

Toledo MJO, Guilherme AL, da Silva JC, de Gasperi MV, Mendes AP, Gomes ML, de Araujo SM (1997). *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Parana state and from different endemic areas of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 39,** 283-290.

Toledo MJO, Lana M, Carneiro CM, Bahia MT, hado-Coelho GL, Veloso VM, Barnabé C, Tibayrenc M, Tafuri WL (2002). Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. **Exp. Parasitol. 100,** 161-172.

Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL, de Lana M (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Antimicrob. Agents Chemother. 47,** 223-230.

Toledo MJO, Tafuri WL, Bahia MT, Tibayrenc M, Lana M (2004). Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas Disease. **Res. Adv. in Antimicrob Agents & Chemother 4,** 11-22.

Torres JP, Ortiz S, Solari A (2003). *Trypanosoma cruzi* isolate from Chile are heterogeneous & composed of mixed populations when characterization by Schizodeme & Southern analyses. **Parasitol.** 128, 161-168.

Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van ME, Billiau A, Carlier Y (1991). Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J. Immunol. 146,** 3626-3632.

Toyé PJ. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi* (1974).. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 68, 147.

Triana O, Ortiz S, Dujardin JC, Solari A (2006). *Trypanosoma cruzi*: variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis. **Exp. Parasitol. 113,** 62-66.

Turrens JF, Watts BP Jr., Zhong L, Docampo R (1996). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and T. brucei NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Mol. Biochem. Parasitol. 82,** 125-129.

Turrens JF (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspects Med. 25,** 211-220.

Ullman B (1995). Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa**. J. Bioenerg. Biomembr. 27,** 77-84.

Une C, Andersson J, Orn A (2003). Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Clin. Exp. Immunol. 134,** 195-201.

Urbina JA, Lazardi K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras MM, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de SW (1993). Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Antimicrob. Agents Chemother. 37,** 580-591.

Urbina JA (2001). Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Curr. Opin. Infect. Dis. 14,** 733-741.

Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D (1998). Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Antimicrob. Agents Chemother. 42,** 1771-1777.

Urbina JA, Moreno B, Vierkotter S, Oldfield E, Payares G, Sanoja C, Bailey BN, Yan W, Scott DA, Moreno SN, Docampo R (1999). *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores,

and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. **J. Biol. Chem. 274,** 33609-33615.

Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ (2003). Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **Int. J. Antimicrob.Agents 21,** 39-48.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila RD, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am. J. Pathol. 156,** 1805-1809.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, CHIARI E, Galvao LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S, Pena SD (1996*).* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **Am. J. Pathol. 149,** 2153-2159.

Valadares HM, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, de Paula OR, Chiari E, Moreira MD, Filho GB, Schijman AG, Franco GR, Machado CR, Pena SD, Macedo AM (2008). Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. **Int. J. Parasitol.** *In press*

Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1993). Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. **Genetics 133,** 737-749.

Vargas N, Pedroso A, Zingales B (2004). Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. **Mol. Biochem. Parasitol. 138,** 131-141.

Veloso VM (2007). Doença de Chagas experimental em cães da raça *Beagle*: avaliação, clínica, parasitológica, histopatológica e molecular. Tese de doutorado, Belo Horizonte, UFMG, 124pp.

Veloso VM, Carneiro CM, Toledo MJ, Lana M, Chiari E, Tafuri WL, Bahia MT (2001). Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96,** 1005-1011.

Veloso VM, Romanha AJ, Lana M, Murta SM, Carneiro CM, Alves CF, Borges EC, Tafuri WL, hado-Coelho GL, Chiari E, Bahia MT (2005). Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. **Parasitol. Res. 96,** 382-389.

Vera-Cruz JM, Magallon-Gastelum E, Grijalva G, Rincon AR, Ramos-Garcia C, Mendariz-Borunda J (2003). Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. **Parasitol. Res. 89,** 480-486.

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infect. Immun. 62,** 5177-5182.

Vianna G (1911). Contribuição para o estudo da antomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas". **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3,** 276-294.

Villarreal D, Nirde P, Hide M, Barnabé C, Tibayrenc M (2005). Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. **Antimicrob. Agents Chemother. 49,** 2701-2709.

Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **Am. Heart J. 127,** 151-162.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A (2006). Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann. Intern. Med. 144,** 724-734.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett A (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bull. World Health Organ. 53,** 55-65.

Wallace A, Sànchez G, Venegas J, Solari A (1995). Lack of cross-reactivity of lytic antibodies with bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* zymodemes generated in a mouse experimental model. **Exp. Parasitol. 80,** 176-185.

Wallace A, Ortiz S, Sànchez G, Villagra R, Muga M, Solari A (2001). Studies on parasitemia courses and mortality in mice infected with geneticaly distant *Trypanosoma cruzi* clonets. **Biol. Res. 34,** 83-90.

Wagner W, So M (1990). Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. **Infect. Immun. 58,** 3217-3224.

Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA (2006). *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. **Int. J. Parasitol. 36,** 337-346.

World Health Organization (2005). Tropical Disease Research: progress 2003-2004. Seventeenth Programme Report of the Unicef/UNDD/World Bank/ WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. Programme Report on 17, Geneva.

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sànchez H, Adamson S, Miles GA, Lopez E, Gonzalez N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA (2005). Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **Int. J. Parasitol. 35,** 225-233.

Yoshida N (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An. Acad. Bras. Cienc. 78,** 87-111.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int. J. Parasitol. 28,** 105-112.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (Suppl. 1),** 159-164.

8. *Anexos*

Anexo I. Comparação da parasitemia entre animais tratados e não tratados infectados com estoques do *Trypanasoma cruzi* pertecentes aos genótipos principais.

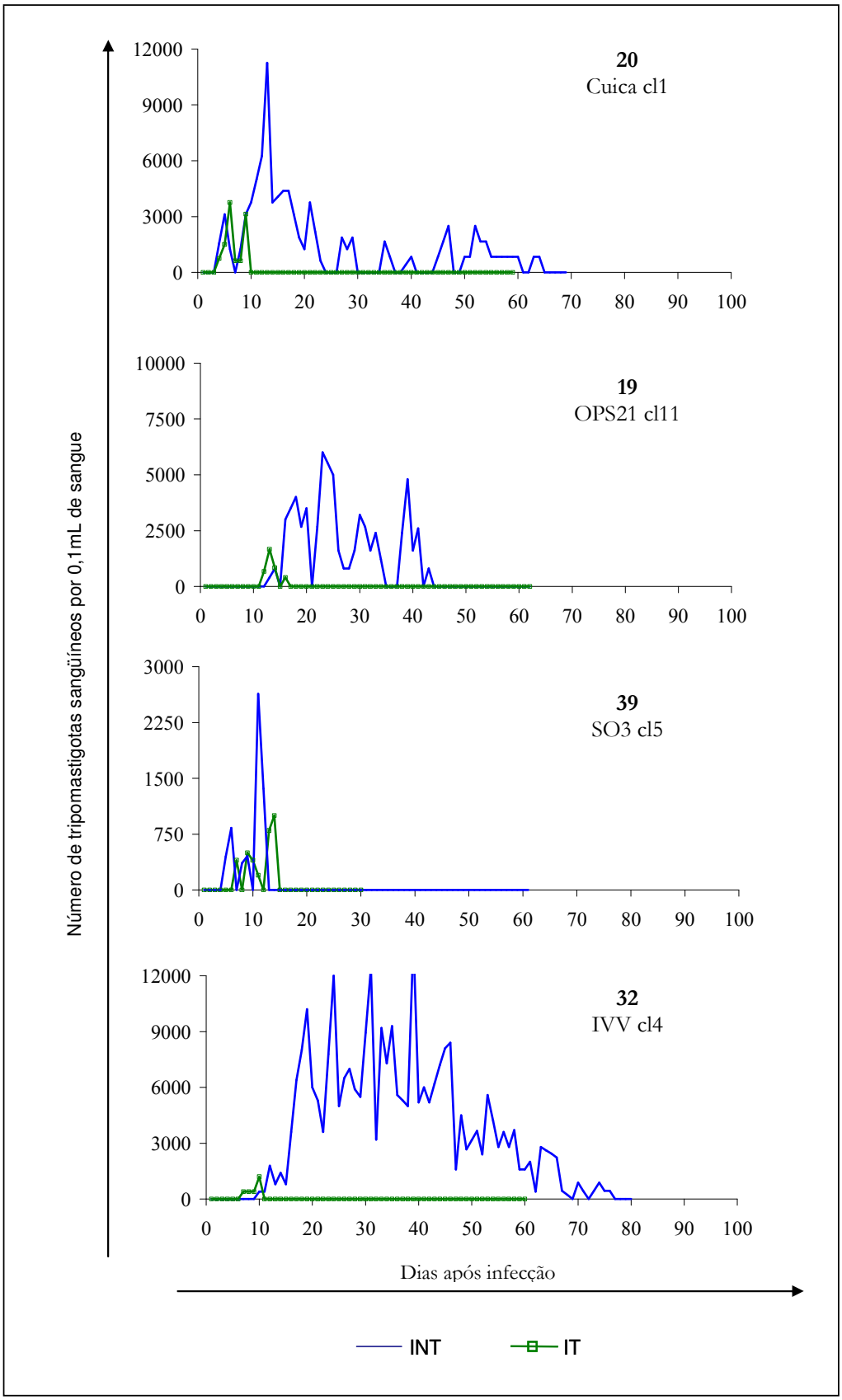
Genótipos	Estoques do *T. cruzi*	PAR x 10^3		PP		PMP x 10^3		DPMP		MOR	
		INT	IT	INT	IT	INT	IT	INT	IT	INT	IT
20	P209 cl1	1066,124	79,625	58,1±15,15	52,8±33,58	73,87±52,71	10,0±3,16	26,4±7,96	76,0±17,05	15,4	0,0
		P < 0,0001		***0,750***		*0,0151*		*0,0002*		***1,000***	
	Cuica cl1	52,65	1,35	11,2±12,50	0,2±0,44	9,8±6,34	1,0±0,71	24,0±5,92	2,4±1,41	0,0	0,0
		P = 0,002		*0,015*		*0,007*		*0,001*		***1,000***	
19	Gamba cl1	394,29	6,4	54,4±11,68	0,7±0,48	31,4±18,80	5,14±5,0	52,8±15,30	20,3±22,43	6,5	0
		P < 0,0001		*0,0001*		*0,009*		*0,002*		***1,000***	
	OPS 21 cl1	65,101	3,567	23,0±6,40	0,7±0,14	11,0±8,12	4,7±0,43	31,2±7,89	13,0±0,71	0,0	0,0
		P < 0,0001		*0,0001*		***0,062***		*0,002*		***1,000***	
39	Bug2148 cl1	17	12,5	4,10±1,63	1,5±1,0	7,8±2,48	4,7±0,50	8,6±1,65	10,5±2,65	0,0	0,0
		P = 0,057		*0,0161*		*0,033*		***0,210***		***1,000***	
	SO3Cl5	3,3	6,1	1,5±2,26	2,1±1,81	4,4±3,58	5,5±1,85	12,0±4,40	10,6±1,06	0,0	0,0
		P = 1,000		***0,065***		***0,558***		***0,508***		***1,000***	
32	IVV cl4	285,57	3,9	36,4±21,63	1,0±1,26	23,2±21,63	2,63±3,29	33,7±5,33	14,2±10,61	0,0	0,0
		P < 0,0001		*0,002*		*0,041*		*0,006*		***1,000***	
	MAS cl1	72,725	0,8	11,2±-3,2	0,3±0,45	17,0±6,53	1,14±1,8	15,4±4,59	7,0±0,00	0,0	0,0
		< 0,0001		*0,001*		*0,008*		*0,004*		***1,000***	
20+19	P209 cl1+Gamba cl1	2343,4	54,926	60,6±6,22	70,2±3,34	170,8±22,87	44,2±30,74	30,2±4,02	16,2±14,72	16,7	0,0
		P < 0,0001		*0,0011*		*< 0,0001*		*0,045*		***0,998***	
	Cuica cl1+OPS21 cl11	533,954	4,375	56,0±6,91	1,7±1,15	35,0±14,39	4,5±2,24	38,1±8,13	8,2±1,7	12,5	12,5
		P *< 0,0001*		*0,001*		*0,006*		*< 0,0001*		***1,000***	
	P209 cl1+OPS21 cl11	172,418	3,125	41,4±14,62	0,7±0,75	17,50±5,59	2,8±2,58	36,4±10,83	7,6±2,36	40	0,0
		p < 0,0001		*< 0,0001*		*0,0001*		*< 0,0001*		***0,3145***	
	Cuica cl1+Gamba cl1	437,286	28,299	79,7±9,29	1,9±3,35	25,16±8,23	2,5±3,93	52,2±14,37	7,7±1,41	0,0	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*0,0028*		*< 0,0001*		***1,000***	
20+39	P209 cl1+Bug2148 cl1	368,929	6,498	48,8±4,97	2,6±2,95	38,6±17,74	3,0±2,59	30,8±8,44	7,6±1,73	16,7	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*< 0,0001*		*0,001*		***0,998***	
	Cuica cl1+SO3 cl5	509,042	5	88,9±9,15	0,6±0,49	35,0±6,64	6,00±5,83	44,3±11,51	8,5±0,87	12,5	12,5
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*< 0,0001*		*< 0,0001*		***1,000***	
	Cuica cl1 +Bug2148 cl1	814,151	0,0	48,0±5,29	0,6±0,0	69,2±26,72	0,0	40,5±4,89	0,0	0,0	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*< 0,0001*		*< 0,0001*		***1,000***	
	P209 cl1+SO3 cl5	660,4795	2,5	72,2±5,19	0,8+1,17	41,8±20,64	2,0±2,45	38,7±32,97	6,5±1,50	0,0	0,0
		P< 0,0001		*< 0,0001*		*0,0009*		*0,038*		***1,000***	

INT: Animais infectados não tratodos. IT: Animais infectados tratados. PAR: número de tripomastigotas sanguíneos registrado durante o período de avaliação. PP: período patente expresso em dias. PMP: pico máximo de parasitemia expresso em número de tripomastigotas por 0,1mL de sangue. DPMP: dia do pico máximo de parasitemia. Mor: taxa de mortalidade cumulativa expressa em percentagem. P = nível de probabilidade de significância (em negrito significa que não houve diferença significativa entre os grupos INT e IT).

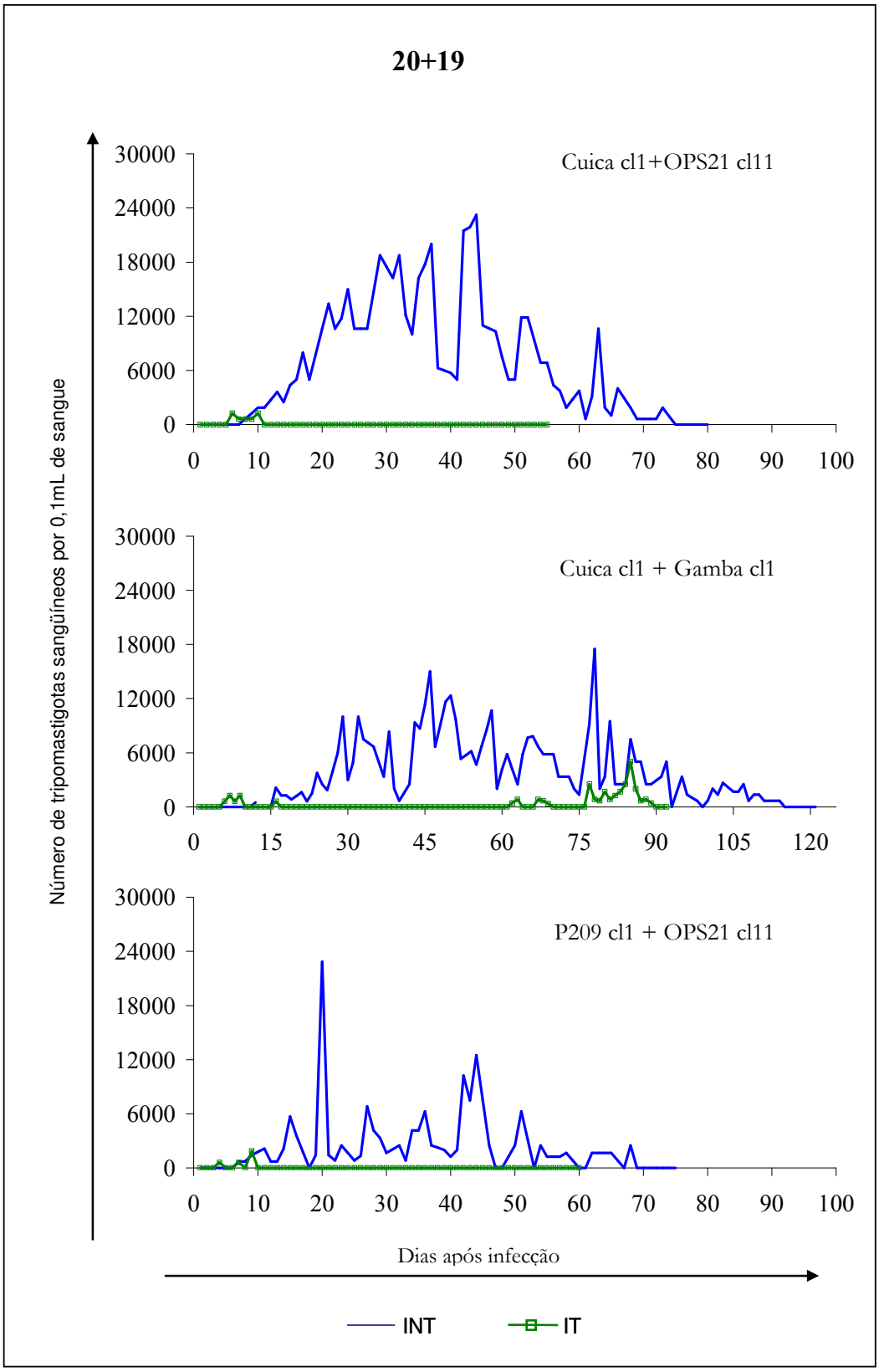
Anexo I (Continuação). Comparação da parasitemia entre animais tratados e não tratados infectados com estoques do *Trypanasoma cruzi* pertecentes aos genótipos principais.

Genótipos	Estoques de *T. cruzi*	PAR x 10^3		PP		PMP x 10^3		DPMP		MOR	
		INT	IT	INT	IT	INT	IT	INT	IT	INT	IT
20+32	P209 cl1+IVV cl4	498,015	2,375	61,8±14,79	0,4±0,55	35,5±17,82	2,0±2,58	36,5±9,71	8,0±1,73	0,0	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*0,001*		*< 0,0001*		***1,000***	
	Cuica cl1+MAS cl1	93,845	10,375	49,2±11,09	1,8±1,47	10,8±3,76	4,8±3,83	14,3±6,33	7,1±1,52	0,0	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*0,020*		*0,022*		***1,000***	
	Cuica cl1+IVV cl4	228,73	11,313	70,2±8,60	7,4±7,39	20,8±3,76	5,6±3,50	33,3±16,54	7,2±5,78	0,0	0,0
		P< 0,0001		*< 0,0001*		*< 0,0001*		*0,0039*		***1,000***	
	P209 cl1+MAS cl1	107,903	5,625	54,3±8,89	1,8±1,92	10,0±0,00	4,0±2,2	51,7±14,96	7,7±1,25	0,0	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*0,0001*		*< 0,0001*		***1,000***	
19+39	Gamba cl1+Bug2148 cl1	809,383	365,108	68,2±4,32	53,4±40,83	56,0±19,49	18,0±16,73	42,0±7,78	94,8±12,18	0,0	0,0
		P < 0,0001		*0,398*		*0,004*		*< 0,0001*		***1,000***	
	OPS21 cl11+SO3 cl5	0,833	0	0,11±0,33	0	0,55±1,67	0	NR	0	0,0	0,0
		P = 0,764		***1,000***		***1,000***		***1,000***		***1,000***	
	OPS21 cl11+Bug2148 cl1	224,112	17,375	60,6±6,48	2,8±2,27	19,4±7,29	6,5±3,82	23,2±10,86	8,2±1,17	0,0	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*< 0,0001*		*0,007*		***1,000***	
	Gamba cl1+SO3 cl5	349,926	5,313	88,7±4,32	4,7±4,27	22,0±5,32	5,0±2,31	47,0±17,34	12,0±4,13	0,0	0,0
		P< 0,0001		*< 0,0001*		*< 0,0001*		*0,0007*		1,000	
19+32	Gamba cl1+IVV cl4	216,167	30,625	56,5±9,81	2,6±1,74	29,0±8,29	11,0±2,00	52,3±4,32	31,2±18,13	0,0	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*0,0004*		*0,0196*		***1,000***	
	OPS21 cl11+MAS cl1	5,437	4,375	56,5±9,81	0,5±0,50	29,0±8,29	2,5±2,5	52,3±4,32	8,0±2,00	16,7	0,0
		P = 0,264		*< 0,0001*		*< 0,0001*		*< 0,0001*		***0,998***	
	OPS21 cl11+IVV cl4	4,141	0,992	1,8±2,39	1,0±0,96	3,8±2,17	3,1±2,5	11,8±5,50	8,8±1,15	0,0	0,0
		P = 0,234		0,465		0,615		0,2202		***1,000***	
	Gamba cl1+MAS cl1	222,905	1,25	54,4±5,94	0,22±0,55	30,0±24,24	1,1±2,73	44,6±13,67	8,5±0,71	0,0	0,0
		P < 0,0001		*< 0,0001*		*< 0,0001*		*< 0,0001*		***0,998***	
39+32	Bug2148 cl1+IVV cl4	6,5	2,6	3,2±2,64	0,4±0,84	6,7±2,82	1,6±2,58	8,3±1,63	2,7±3,99	0,0	0,0
		P = 0,633		*0,032*		*0,008*		*0,008*		***1,000***	
	SO3 cl5+MAS cl1	1,25	0,625	0,3±0,51	0,2±0,43	1,7±2,58	1,2±2,16	ND	ND	0,0	0,0
		P = 1,000		***0,726***		***0,723***		-		***0,998***	
	SO3 cl5+IVV cl4	11,928	2,5	3,8±3,54	0,3±0,52	5,3±3,44	1,5±2,58	11,2±2,05	8,3±0,71	0,0	0,0
		P = 0,389		*0,0371*		***0,797***		*0,0084*		**1,000**	
	Bug2148 cl1+MAS cl1	8,188	6,625	1,8±1,8	2,3±2,36	4,2±2,04	5,0±0,5	11,8±1,80	10,8±1,71	0,0	0,0
		P = 1,000		***0,688***		***0,300***		***0,347***		***1,000***	

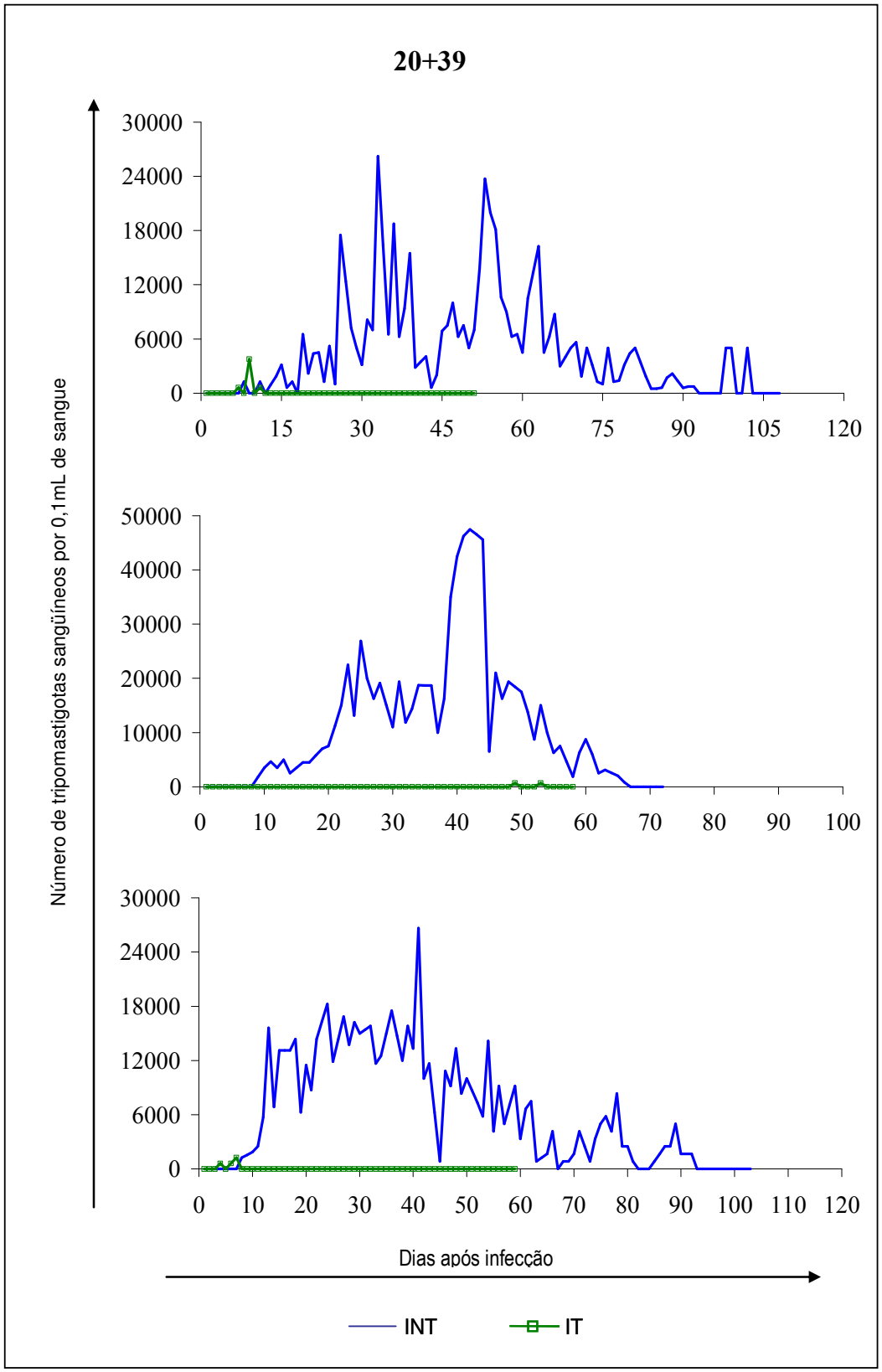
INT: Animais infectados não tratodos. IT: Animais infectados tratados. PAR: número de tripomastigotas sanguíneos registrado durante o período de avaliação. PP: período patente expresso em dias. PMP: pico máximo de parasitemia expresso em número de tripomastigotas por 0,1mL de sangue. DPMP: dia do pico máximo de parasitemia. Mor: mortalidade cumulativa expressa em percentagem. P = nível de probabilidade de significância (em negrito significa que não houve diferença significativa entre os grupos INT e IT. Dados com valor zero foram convertidos a escala logarítima para comparação.



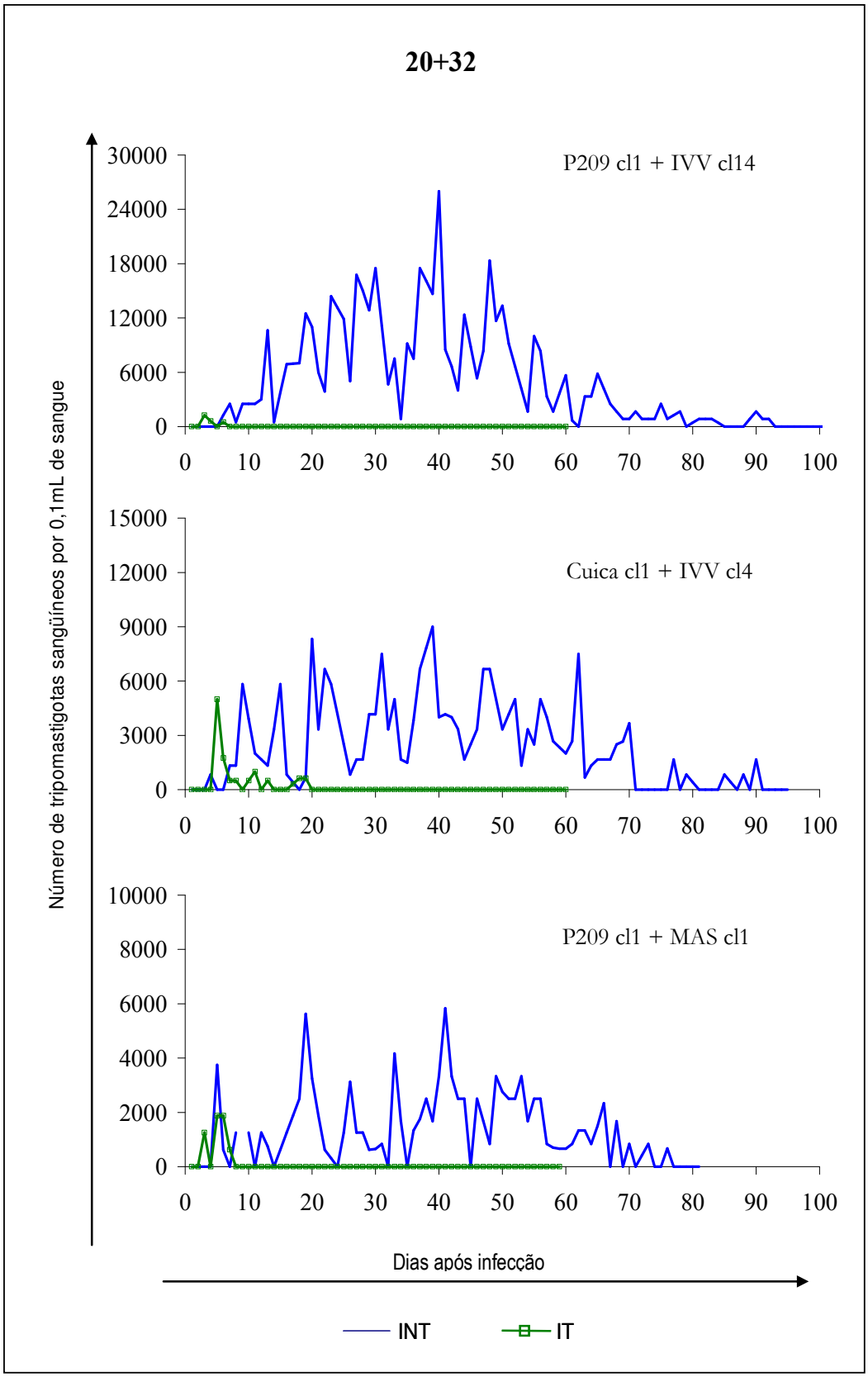
Anexo II. Perfis de curvas de parasitemia média obtidos em monoinfecções por clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais.



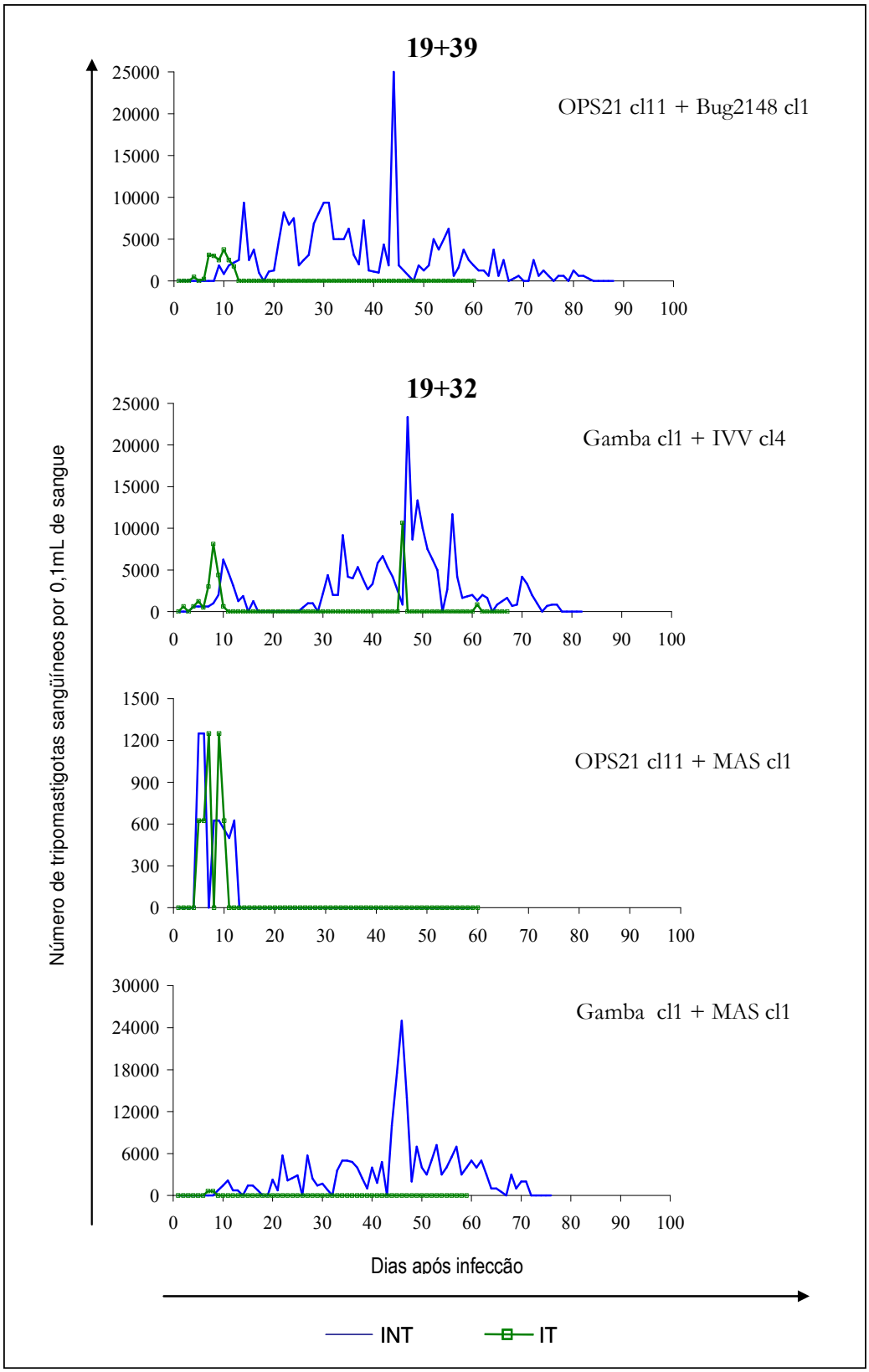
Anexo II (continuação). Perfis de curvas de parasitemia média obtidos em animais infectados com misturas de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais 20 e 19.



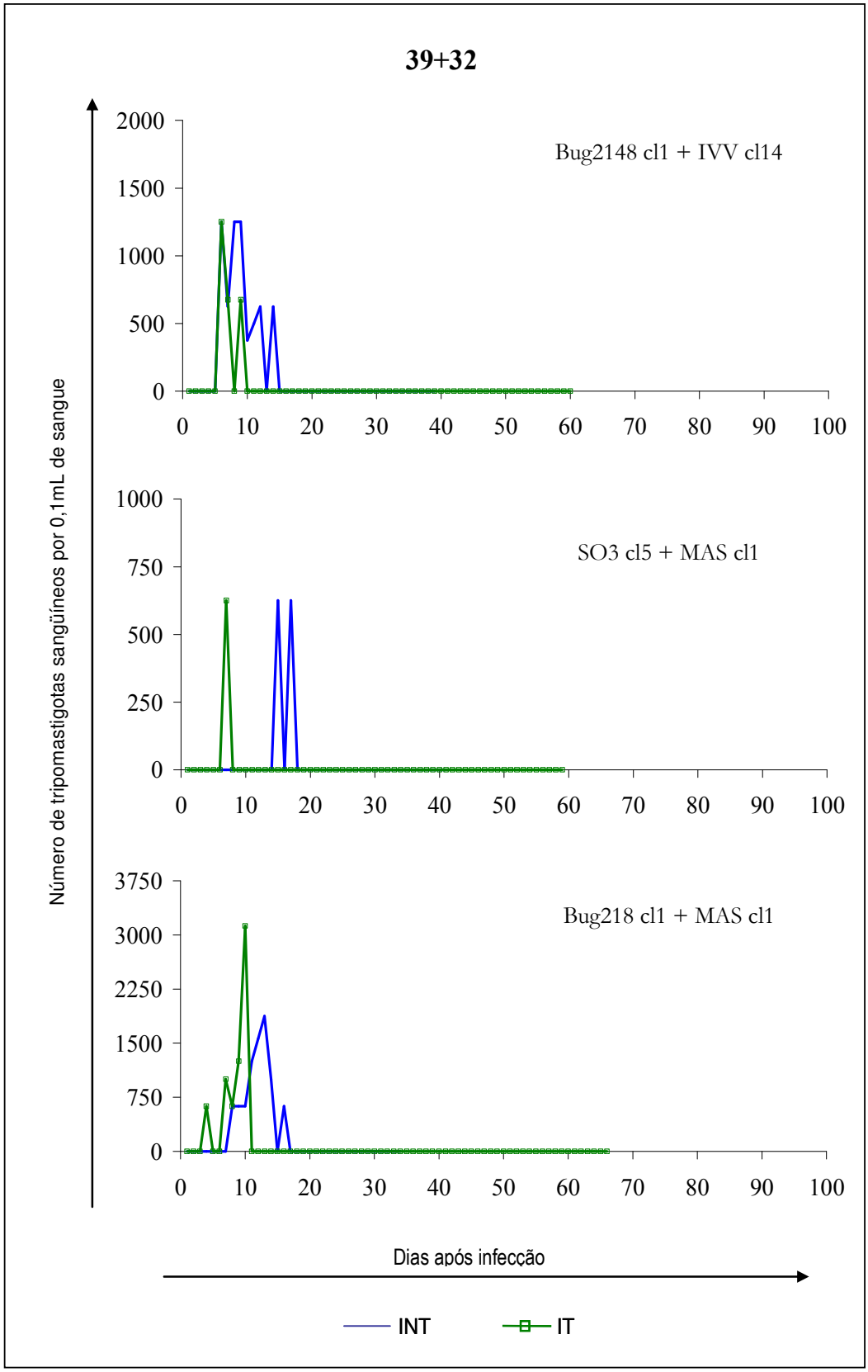
Anexo II (continuação). Perfis de curvas de parasitemia média obtidos em animais infectados com misturas de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais 20 e 39.



Anexo II (continuação). Perfis de curvas de parasitemia média obtidos em animais infectados com misturas de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais 20 e 32.



Anexo II (continuação). Perfis de curvas de parasitemia média obtidos em animais infectados com misturas de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais 19 e 39 e pertencentes aos genótipos 19 e 32.



Anexo II (continuação). Perfis de curvas de parasitemia média obtidos em animais infectados com misturas de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais 39 e 32.

Anexo III. Publicações durante o período de doutoramento.

Artigos Referentes à tese de doutoramento

Martins HR, Silva RM, Valadares HM, Toledo MJO, Veloso, VM, Vitelli-Avela DM, Carneiro, CM, Machado-Coelho, GLL; Bahia, MT, Martins-Filho, AO, Macedo AM, Lana M (2007). Impact of dual infections on chemotherapeutic efficacy in BALB/c mice infected with major genotypes of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother. 51,** 3282-3289.

Martins HR; Figueiredo LM; Valemiel-Silva JC; Carneiro CM,; Machado-Coelho GLL, Bahia MT; Martins-Filho OA, Macedo AM; Lana M. Persistence of positive tissue-PCR in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological test in dual-infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. **Artigo aceito para publicação na revista J. Antimicrob. Chemother. em fevereiro de 2008 (DNk092).**

Artigos em Colaboração

Arantes JM, Pedrosa ML, Martins HR, Veloso VM, de Lana M, Bahia MT, Tafuri WL, Carneiro CM (2007). *Trypanosoma cruzi*: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. **Exp. Parasitol**. 117 Suppl (1), 43-50.

Vital WC, Carneiro CM, Martins HR ; Lana M, Veloso M, , Teixeira-Carvalho A, Bahia MT, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho AO, Tafuri WL, Reis AB. *Trypanosoma cruzi*: Isotype profiles of in immunoglobulins experimental dogs during the acute phase of infection with metacyclic or blood trypomastigotes. **Artigo submetido à revista Exp. Parasitol. em janeiro de 2008 (EP-07-265).**

Francisco AF, Vieira MD, Arantes JM, Pedrosa ML, Martins HR, Silva M, Veloso VM, Lana M, Bahia MT, Tafuri WL, Carneiro CM (2008). *Trypanosoma cruzi*: effect of Benzonidazole therapy combined with the iron chelator Desferrioxamine in mice. **Exp. Parasitol., artigo submetido em janeiro de 2008.**

Albajar PV, Lopes LA, Martins HR, Martins-Filho OA, Montoya RA, Dias JCP, Coura JR, Lana M. Clinical and laboratorial evaluation of chagasic patients from Berilo, Jequitinhonha Valley, MG, before and nine years after treatment with benznidazole. **Artigo em Preparação.**

Anexo IV. Outros artigos publicados

Toledo MJO, Bahia MT, Veloso VM, Carneior CM, Machado-Coelho, GLL, Alves CF, Martins HR, Cruz RE, Tafuri WL, Lana M. (2006). Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **J. Antimicrob. Chemother. 53 Suppl 6,** 1045-1053.

Martins HR, Toledo MJO, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GLL, Tafuri WL, Bahia MT, Valadares HM, Macedo A M, Lana M. *Trypanosoma cruzi* (2006). Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. **Exp. Parasitol 112** (**Suppl. 4),** 237-246. (Dissertação de Mestrado).

Anexo V. Resumos publicados em anais de Congresso durante o período de doutoramento.

Couto AC, Oliveira MAT, Figueiredo LM, Moreira-Silva LM, Arruda LCM, Do Bem VLA, Martins HM, Carneiro CM, Bahia MT, Lana M. Early definition of cuure controlo f experimental acute phase of Chagas' disease. *In:* XXXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2007. p.157-157. **Apresentação oral.** (Projeto de doutoramento).

Francisco AF, Arantes JM, Pedrosa ML, Vieira PMA, Martins HR, Silva M, Lana M, Bahia MT, Tafuri WL, Carneiro CM. Treatment with iron quelataor desferrioxamine in association with benznidazole on the evolution of the experimental infection by *Trypanosoma crusi. In:* XXXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2007. p.157-157. (Colaboração).

Moreira-Silva R, Oliveira-Silva JC, Martins HM, Martins-Filho OA, Torres RM, Bahia MT, Valadares HMS, Macedo AM, Albajar-Vinãs P, Lana M. Cure ocntrol of *Trypanosoma cruzi* infected schoolchidren fom Berilo, Jetiquitinhonha Vallely, MG, Brazil, together with genetic characterization of previous isolated parasites from children and respective mothers. *In:* XXXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2007. p.157-157. (Colaboração).

Andrade VL, Martins HR, Moreira LF, Duz ALC, Bahia MT, Tafuri WL, Toledo MJO, Lana M, Carneiro CM. Evaluation of inflammation in the heart and skeletal muscles in dual-clonal *Trypanosoma cruzi* infections. *In:* XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2006. p. 55-55. (Colaboração)

Couto AC, Paula DAC, Silva JVCO, Martins HR, Toledo MJO, Carneiro CM, Bahia MT, Tafuri WL, Lana M. Efects of especific treatment on parasitological parameteres in BALB/c mice infected with *Trypanosoma cruzi* dual clonal infections. *In:* XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu 2006, p.40-40. (Projeto de doutoramento).

Figueiredo LM, Martins HR, Moreira-Silva R., Couto AC, Andrade VL, Carneiro CM, Bahia MT, Tafuri WL, Lana M. Evaluation of PCR positivity in tissue of mice with *Trypanosoma cruzi* infection from major genotypes. *In:* XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2006. p.41-41. (Projeto de doutoramento).

Moreira-Silva R, Cruz RE, Martins HR, Valadares HM, Carneiro CM, Bahia MT, Tafuri WL, Macedo AM, Lana M. Biological and molecular characterization of *Trypanosoma cruz*i in individual and dual infected dogs. *In:* XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2006. p. 49-49. (Colaboração)

Arantes JM, Francisco AF, Andrade VL, Martins HR, Silva M, Lana M, Bahia MT, Tafuri WL, Pedrosa ML, Carneiro CM. Iron chelator (Desferrioxamine) leads to lower parasitemia and mortality in mice infected with *Trypanosoma cruzi. In:* XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXXIII and Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2006. p.54-54. (Colaboração)

Andrade VL, Francisco AF, Vieira PMA, Martins HR, Lana M, Bahia MT, Tafuri WL, Pedrosa LM, Carneiro CM, Arantes JM. Incease of the relative wight and lymphactic alterations of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* with iron chelator. *In:* XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2006. p.183-183. (Colaboração)

Vital WC, Pinto LCL, Ker RG, Martins HR, Bahia MT, Lana M, Tafuri WL, Veloso VM, Carneiro CM, Carneiro CM, Reis AB. *Trypanosoma cruzi*: different immunoglobulins profiles in experimental infections in dogs. *In:* XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2006. p.185-185. (Colaboração).

Martins HR, Moreira-Silva R, Valadares HMS, Toledo MJO, Machado-Coelho GLL, Carneiro CM, Bahia MT, Martins-Filho AO, Macedo AM, Lana M. Impact of dual-clonal infections on treatment efficay in BALB/c mice infected with *Trypanosoma cruzi* major genotypes. *In:* XXXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease and XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Caxambu, 2006. p.202-202. (Projeto de doutoramento). **Esse trabalho recebeu o prêmio Zigman Brener como o melho trabalho apresentado como pôster em 2006.**

Valadares HMS, Martins HR, Galvão LMC, Lana M, Macedo AM. Chagas disease: study of five cases of congenital transmission using kDNA signature, microsatellites, mitochondrial COII typing and rDNA profiles. *In:* XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology and XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease. Caxambu, 2005. p.89-89. (Colaboração)

Moreira LF, Silva RM, Carneiro CM, Macedo AM, Martins HM, Lana M. Triagem de órgãos positivos na PCR em infecções mistas por clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais e sua caracterização por microssatélites. *In:* Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2005, Ouro Preto. (Colaboração).

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