



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Medicina

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



Tratamento Multidrogas da Doença de Chagas Experimental

Aluna: Adriana Alves de Sá

Orientador: Prof. Dr. Antônio R. L. C. Teixeira

Brasília – DF

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Adriana Alves de Sá

**Tratamento Multidrogas da
Doença de Chagas Experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre

Este trabalho foi realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: CNPq/ CAPES

Brasília, 2008

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha querida mãe Oroídes, pelo incentivo continuado na minha carreira, sempre atenta aos momentos difíceis que resolveu sozinha. Reconheço e agradeço o amor recebido.

Parte importante deste trabalho é dedicada ao Alfredo pela força, carinho e colaboração emprestados.

À Professora Ana Maria Castro, que com muita paciência e dedicação colaborou na organização e redação desse trabalho.

Poucas coisas no mundo são mais poderosas que um impulso positivo - um sorriso. Um mundo de otimismo e esperança, um 'você consegue' quando as coisas estão difíceis.

Richard De Vos

Agradecimentos

Primeiramente ao Professor Teixeira pela chance de aprender um pouco mais sobre o conhecimento científico, alimentando o sonho de construir o bem comum pelos que sofrem sem alívio.

Aos colegas e especialmente aos amigos do LMPDC: Ana Carolina com seu estilo certinho e inteligente. Ana de Cássia dedicada e batalhadora. Alessandro, músico-baterista, curioso pela ciência, que ajudou ao longo das etapas e no preparo de figuras gráficas. Clever sempre interessado pelo trabalho. Eduardo que fez análises estatísticas, sem dispensar o chimarrão. Dra. Liana Lauria-Pires, pelo carinho e atenção. Flávia Liara, que colaborou afetuosamente. Fernanda, estagiária muito querida. Mariana que sempre saía de sua sala para me ajudar em alguma análise experimental. Perla que me acompanha desde o segundo grau e colega de trabalho na área de saúde. Marol, meiga, doce e de bom coração. Meire, mesmo distante, sabe que torce por mim. Nadjar, pela inteligência, bondade e colaboração nesse trabalho, explicando-me os porquês de cada reação. Roze, que ajudou nos testes sorológicos.

Aos estagiários Hevelly e Luiz, que ajudaram na reta final do projeto, Carlos Magno que colaborou na administração de medicamentos aos camundongos. Ciro e Ronaldo que prepararam soluções, interessados

pela ciência. Osmar que ajudou a extrair DNA e Liana, mesmo passando rapidinho pelo LMPDC deixou seu carinho.

Aos funcionários do LMPC: Miguel, Eliete, Geraldo, Peter e Márcia, e a turma do biotério, Adriana Xavier, Adriana Melo, Marcelo, Rafael e seu Dedé que muito contribuíram ao cuidar dos camundongos e na coleta de materiais.

Agradeço ao meu Pai, que me acompanhou nesta empreitada. A Madrinha Vicentina, aos primos Nandinha, Luna, Douglas e aos meus familiares.

Aos amigos

Dr. Flávio Sena, Dyone France, Carolzinha Menezes, Bela Alvarenga, Belinha Mejia, Renata Estrela, Dona Gabriela, Mercedes Berlin, Erik Neves, Felipe Tironi, Felipe Fassy, Priscilinha, Rosaly, Sofia, Carol Rocha, Brauslitede, Tiago Jaques, Itamar Correia, Marcelo Rosa, Soraia Qader, Carol Atala, Hugo Maschwitz, Lilito, Fabiano Marchioro, Gabriel Jaques, Any Shirley, Tininha, Richard Klin, Bruna Klin, Paulo Goku, Deb Amidami, Meryany, e a família Braga, pelas alegrias compartilhadas até aqui.

Muito Obrigada.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. - Trypanosoma cruzi	1
I.2. - Histórico - doença de Chagas	1
I.3. - Ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado	2
I.4. - Ciclo evolutivo no hospedeiro invertebrado	3
I.5. - Transmissão	5
I.5.1. - Transmissão vetorial	5
I.5.2. - Transmissão transfusional	5
I.5.3. - Transmissão congênita.....	6
I.5.4. - Transmissão oral	6
I.5.5. - Transplante de Órgãos	6
I.5.6. - Outras vias de transmissão	7
I.6. - Doença de Chagas - Fase Aguda	7
I.6.1. - Forma subaguda.....	7
I.6.2. - Fase Crônica - Forma Indeterminada.....	8
I.6.3. - Fase Crônica	8
I.6.3.1. - Cardiopatias	8
I.6.3.2. - Forma digestiva.....	8
I.7. - Diagnóstico	9
I.8. - Tratamento etiológico da doença de Chagas	10
I.8.1. - Nifurtimox	10
I.8.2. - Benzonidazol	11
I.8.3. - Outros fármacos testados para o tratamento específico da doença de Chagas.....	12
I.8.3.1. - Alopurinol.....	12
I.8.3.2. - Megazol (CL 64'855).....	12
I.8.3.3 - Ofloxacina	13
I.8.3.4 - Inibidores da síntese de ergosterol.....	13
I.8.3.4.1. - Cetoconazol e Itraconazol.....	13
I.8.3.4.2. - Posaconazol.....	14
I.8.3.5. - Inibidor de Cruzipaína	14

I.8.3.6. - Inibidor de Catepsina B	15
I.9 - Critérios de cura	15
I.10. - Laboratório LMPDC.....	16
I.10.1. - Tratamento multidrogas da doença de chagas	18
II. JUSTIFICATIVA.....	19
III.1. - Objetivo Geral	22
III.2. - Objetivos Específicos	22
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
IV.1. - Projeto piloto	23
IV.1.1 - Fluxograma	23
IV. 2. - Estoque Berenice de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
IV. 3. - Desenho experimental	24
IV. 4. - Infecção dos camundongos com <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
IV. 5. - Pesagens dos camundongos	24
IV.6. - Administração das drogas	25
IV. 7. - Grupos experimentais:	25
IV. 8. - Diagnóstico Parasitológico.....	26
IV. 8.1. - Curvas de parasitemia.....	26
IV. 8.2. - Curvas de peso e sobrevida	29
IV.8.2.1. - Análise parasitológica e sorológica das fases I e II do tratamento multidroga da doença de Chagas experimental.....	29
IV. 8.2.3 - Hemocultura	29
IV. 9. - Diagnóstico Imunológico	29
IV. 9.1 - ELISA.....	29
IV.10. - Diagnóstico Molecular.....	30
IV.10.1. - Obtenção do material experimental	30
IV.10.2. - Extração de DNA genômico dos camundongos.....	31
IV.10.3. - Extração do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
IV.10.4. - Quantificação do DNA	32
IV.10.5. - Eletroforese	32
IV.10.6. - Reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando primers de β -actina	32

IV.10.7. - Amplificação de seqüências de kDNA e nDNA de <i>T. cruzi</i>	33
IV.10.8 - Southern blot	35
IV.10.9. - Marcação de fragmentos de DNA	35
IV.10.11. - Purificação das sondas radiomarcadas.....	35
IV.10.12 - Hibridização	36
IV.11. - Análise Estatística.....	36
V- RESULTADOS	36
V.1. - Avaliação da concentração e toxicidade das drogas utilizadas.....	36
V.2. - Avaliação pré-clínica.....	37
V.3. - Curvas de parasitemia	38
V.4 - Curvas de peso e sobrevivência durante o tratamento dos grupos estudados.....	38
V-5.1. – Hemocultura	41
V.5.2. - REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)	42
V.5.3. - REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA - ELISA	45
VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	46
VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
VIII. BIBLIOGRAFIA	50

FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>trypanosoma cruzi</i> no triatomíneo.....	4
Figura 2: Ciclo silvestre.....	4
Figura 3: Esquema utilizado do tratamento multidrogas da doença de chagas experimental.....	28
Figura 4: Camundongo BALB/c, apresentando cardiomegalia.....	38
Figura 5: Curvas de parasitemia.....	39
Figura 6: Curvas de sobrevivência de camundongos na fase aguda.....	40
Figura 7: Curvas de sobrevivência de camundongos na fase crônica.....	41
Figura 8: Produtos específicos de ndna.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doses terapêuticas utilizadas no tratamento multidrogas da doença de chagas experimental.	26
Tabela 2. Presença de cardiopatia nos grupos experimentais.....	37
Tabela 3. Resultados de hemoculturas.....	42
Tabela 4. Análise parasitológica por pcr.	44
Tabela 5. Análise comparativa entre as técnicas.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem
μCi – Micro Cintilografia
μg – Micrograma
μL - Microlitros
APP – Pirimidina
AZT - Zidovudina
BAA – Beta actina anti-sense
BAS - Beta actina sense
BNZ - Benznidazol
BR – Branco
Ca²⁺ - Cálcio
Cam – Camundongo
CIPRO – Ciprofloxacina
cm – Centímetro
CN – Controle Negativo
CO₂ – Monóxido de Carbono
CP – Controle Positivo
cpm– Cintilografia por Minuto
dATP - 2' deoxiadenosina 5' trifosfato
DCH – Doença de Chagas Crônica
dCTP - 2' deoxicitosina 5' trifosfato
dGTP - 2' deoxiguanosina 5' trifosfato
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – Dimetilsufóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Mistura de 2' deoxinucleosídeos 5' trifosfato
dTTP - 2' deoxitimidina 5' trifosfato
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetra-acético
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUA- Estados Unidos da América
G1 – Primeira Geração

G2 – Segunda Geração
h- Hora
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HCl - Ácido clorídrico
HEMO - Hemocultura
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HPP – Alopurinol
IFI – Imunofluorescência Indireta
IgG - Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IU – Unidade por mililitro
kb – kilobase
KCL – Cloreto de Potássio
kDNA – DNA de Cinetoplastídeos
LINE-1 – Longas Seqüências Repetitivas
LIT - Liver Infusion Triptose
LMPDC – Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas
mg- Micrograma
mg- Miligrama
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min - Minuto
mL - Mililitros
mM – Milimolar
mm³- Milímetro cúbico
N₂ - Nitrogênio
NACL – Cloreto de Sódio
NEG – Negativo
ng - Nanograma
NR - Não Realizado
°C - Graus Centígrados
ORF – Fase de leitura aberta
pb - Pares de bases
PBS – Phosphate Buffer Solution

PCR – Reação de polimerização em cadeia
PEG – Polietileno glicol
pH - Potencial de hidrogênio
pmol - Picomol
POS – Positivo
psTAILPCR- Primer Specific Thermal Asymmetric Interlaced – PCR
PVC - Poli -cloreto de vinila
PZQ – Praziquantel
rpm – Rotações por minuto
rRNA - Ácido ribonucléico ribossômico
SFB – Soro Fetal Bovino
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC- Sistema Nervoso Central
SSC – Cloreto de Sódio + Citrato de Sódio
SSPE – Cloreto de Sódio + Fosfato de Sódio + EDTA (Ácido etilenodiaminotetra-
acético)
TAE – Tris Hidroximetil Amino Metano + Ácido Acético Glacial
Taq - *Thermus aquaticus*
TC - *Trypanosoma cruzi*
TE - Tris- Hidroximetil Amino Metano + EDTA (Ácido Etilenodiaminotetra-acético)
TGH - Transferência Gênica Horizontal
TGV - Transferência Gênica Vertical
TM – Marca comercializada
TRIS- HCL – Hidroximetil Amino Metano – Ácido Clorídrico
U – Unidade
UV – Intensidade de Radiação
V – Volts
WHO – Organização Mundial da Saúde
 α – Alfa
A – Grupo sem infecção
B – Grupo infectado sem tratamento
C – Grupo infetado e tratado com benzonidazol
D– Grupo infectado e tratado com zidovudina

E – Grupo infectado e tratado com ciprofloxacina

F – Grupo infectado e tratado com praziquantel

G – Grupo infectado e tratado com benzonidazol e zidovudina

H – Grupo infectado e tratado com benzonidazol e ciprofloxacina

I – Grupo infectado e tratado com benzonidazol e praziquantel

J – Grupo infectado e tratado com benzonidazol, ciprofloxacina e zidovudina

K – Grupo infectado e tratado com benzonidazol, ciprofloxacina e praziquantel

L – Grupo infectado e tratado com zidovudina, ciprofloxacina e praziquantel

M – Grupo infectado e tratado com benzonidazol, zidovudina e praziquantel

N – Grupo infectado e tratado com benzonidazol, zidovudina, praziquantel e ciprofloxacina.

Tto – Tratamento

Dpt – Dias depois do tratamento

Dpi – Dias pós-infecção

RESUMO

O tratamento das infecções pelo *Trypanosoma cruzi* tem sido alvo de muitas investigações porque a busca da cura da doença de Chaga tem alta relevância social. Este trabalho teve como objetivo geral avaliar diferentes esquemas terapêuticos na doença de Chagas experimental. Seus objetivos específicos visaram a comparar aspectos clínicos, parasitológicos e sobrevivência nos grupos experimentais e controles, para avaliação do efeito de diferentes esquemas terapêuticos de tratamento e doses dos fármacos utilizados. Esses parâmetros foram usados como critério de avaliação dos esquemas de tratamento com drogas inibidoras de vias metabólicas, envolvidas em divisão e diferenciação celulares, que poderiam impedir a integração do kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro. Grupos de 20 camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi* do estoque Berenice, pesando 20 a 25 g, de ambos os sexos, foram tratados com benzonidazol, nas fases aguda e crônica da infecção. Formaram-se novos grupos também com 20 animais, que receberam benzonidazol, associados com uma, duas ou três drogas. As drogas utilizadas foram praziquantel (inibidor de proteína-quinase), ciprofloxacina (inibidor de topoisomerase) e zidovudina (inibidor da transcriptase reversa). Foi previamente demonstrado que essas drogas inibem a integração do kDNA no genoma de célula hospedeira de mamífero in vitro. De acordo com os parâmetros de avaliação, apenas o grupo de animais tratados na fase crônica da infecção com benzonidazol associado à ciprofloxacina durante 30 dias teve a parasitemia negativada, com decréscimo significativo dos títulos de anticorpos e ausência de amplificação de seqüências de kDNA. O achado sugeriu que o tratamento eliminou a infecção e preveniu as mutações no genoma do hospedeiro. Nos demais grupos experimentais os resultados foram similares àqueles obtidos nos grupos tratados apenas com benzonidazol, pois, não houve negatificação das parasitemias e o kDNA podia ser encontrado no genoma dos camundongos testados. Assim somente a associação de benzonidazol com ciprofloxacina na concentração ótima testada, sugeriu a eliminação da infecção, e o kDNA não integrou no genoma dos camundongos. Nos demais grupos experimentais analisados os resultados obtidos, sugerem que as drogas administradas não eliminaram as infecções pelo *T. cruzi*.

ABSTRACT

The treatment of the *T. cruzi* infections has been sought by many investigators because the cure of Chagas disease has high social and economic importance. This work aimed at the use of various therapeutic formulations to treat the experimental Chagas disease in mice. Specifically, it was aimed at the clinical, parasitological and survival aspects related to the *T. cruzi* infections in experimental and control groups of BALB/c mice. Secondly, this work aimed at to evaluate therapeutic protocols, using different pharmacological compounds. The parameters used to evaluate the therapeutic protocol were the elimination of the parasitic infections and abrogation of the integration of the *T. cruzi* kDNA minicircle sequences by the administration of inhibitors of metabolic pathways of cell growth and differentiation. Groups of 20 mice of both sexes, weighing 20 to 25 g, received the *T. cruzi* intraperitoneally and were treated in the acute and chronic phases of the infections. The experimental groups received benznidazole (0.86 mg/day) alone or in association with one, two or three different inhibitors. The inhibitors used were: praziquantel (inhibitor of protein-kinases, 0.93 mg/day), ciprofloxacin (inhibitor of Topoisomerase II, (1.2 mg/day), and zidovudine (inhibitor of reverse transcriptase, 1.2 mg/day). In a previous study, it was shown that these inhibitors prevent the integration of kDNA minicircle sequences into the host mammalian cell *in vitro*. The drugs were administered by gavage of mice for a period of 15, 30 or 60 days. Following the parameters set for evaluating the effects of each therapeutic regime, only a group of chronically infected mice treated with benznidazole and ciprofloxacin for 30 days eliminated the parasitemia, and showed consistent fall of the specific anti-*T. cruzi* antibody titers, and abrogated the integration of the kDNA into the mouse genome. This finding has suggested that this therapeutic regime was indeed efficient because it abrogated the infection, the specific antibody titers and the kDNA integrations. However, when half-dose benznidazol and ciprofloxacin were used the mice the infections sere set free. Also in all the other experimental groups the results obtained indicated therapeutic failure, because the results were similar to those obtained with benznidazole alone: the parasitemias were patent and the kDNA was recovered from infected-treated animals. In summary, the administration of benznidazole combined with ciprofloxacin to *T. cruzi*-infected mice eliminated the infection and kDNA did not integrate into the mouse genome. In relationship to the remaining infected- and treated groups it was observed therapeutic regimes did not eliminate the infections.

I. INTRODUÇÃO

I.1. - Trypanosoma cruzi

O agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase americana é o *Trypanosoma cruzi*. Este protozoário pertence à ordem Cinetoplastida, família Trypanosomatidae. Os membros dessa família apresentam de um a quatro flagelos e uma organela auto-replicável que contém DNA, o cinetoplasto, e podem ser encontrados em diferentes insetos hemípteros, animais silvestres e domésticos (Liu e Englund, 2007).

A mitocôndria do *T. cruzi* tem o cinetoplasto que retém material genético denominado kDNA, localizado abaixo do corpúsculo basal. O kDNA é formado por maxicírculos e minicírculos. Existem de 40 a 50 cópias de maxicírculos na mitocôndria, cada um com cerca de 40 kb, contendo genes que codificam as proteínas mitocondriais e proteínas do complexo respiratório (Klingbeil e Englund, 2004). E ainda na mitocôndria existem minicírculos que são moléculas de 1.4 kb que se encontram presentes como milhares de cópias concatenadas que codificam RNAs guias (gRNA) que auxiliam na editoração dos mRNAs dos maxicírculos mitocondriais (Junqueira e cols. 2005). Maxicírculos e minicírculos formam uma rede de kDNA que se divide automaticamente e inicia o processo de replicação celular.

I.2. - Histórico - doença de Chagas

Carlos Chagas em 1909 descreveu o ciclo completo do *T. cruzi*. Ao observar no sangue da menina Berenice de três anos de idade o parasito que circulava em seu sangue, descreveu o agente, antes havia encontrado o flagelado no intestino do inseto *Panstrongylus megistus*, identificando assim o inseto vetor e posteriormente descreveu os reservatórios domésticos a doença de Chagas.

Insetos da família Reduviidae (*Triatoma Infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus*) são os principais responsáveis pela transmissão vetorial do *T. cruzi* para o homem, e são também os responsáveis por manter o ciclo

silvestre. Estima-se que 18 milhões, sendo que em torno de 40% destes indivíduos irão desenvolver formas clínicas desta moléstia (WHO, 2002).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde e o Banco Mundial, são gastos mais de seis bilhões de dólares por ano no tratamento dessa doença (WHO, 2002), pois, essa enfermidade faz com que o indivíduo se torne debilitado e incapaz, sendo uma das principais causas da aposentadoria antecipada (Dias e cols. 1985; Lopes e Chapadeiro, 1986).

I.3. - Ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* em hospedeiros vertebrados inicia-se quando as formas tripomastigotas e epimastigotas eliminadas nas fezes do triatomíneo contaminam a pele (perfurada) ou mucosas do hospedeiro vertebrado (Lu H-G e cols. 1998).

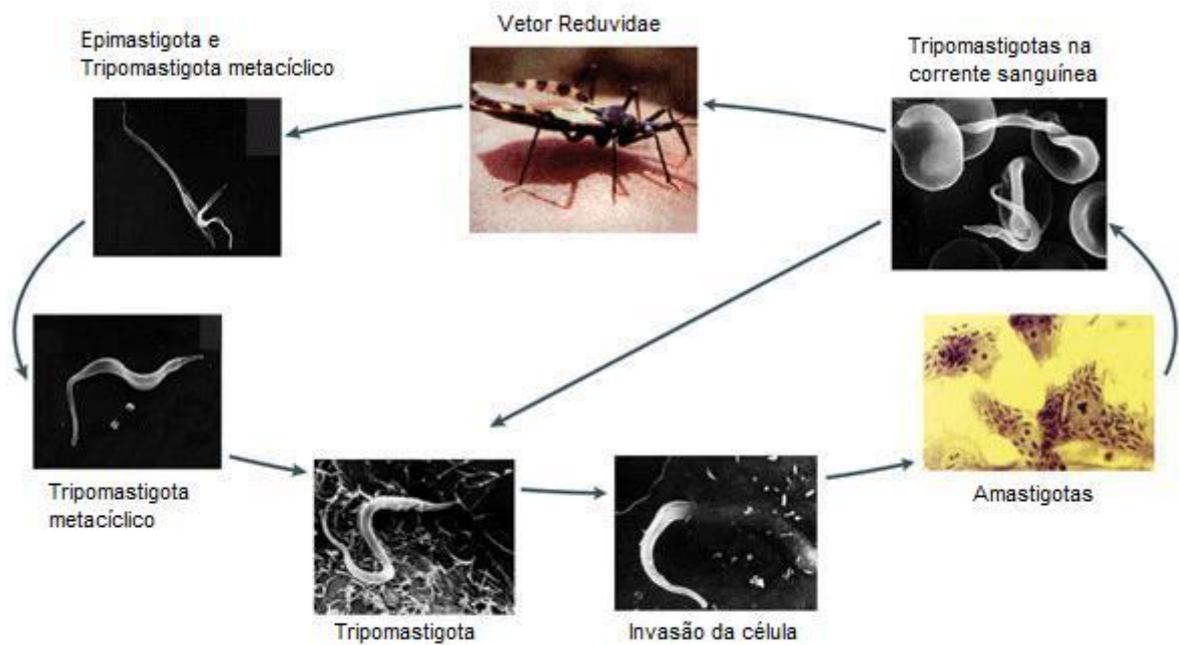
As formas tripomastigotas podem entrar em qualquer célula, com exceção de neurônios, iniciando o seu ciclo de replicação (Teixeira e cols. 2006). Sugere-se que nesse momento de interação ocorra o processo de adesão celular e ligação da membrana do parasita à superfície da célula hospedeira. As proteases hidrolíticas estariam participando desse processo. A interação de formas tripomastigotas com macrófagos resulta na fagocitose do parasita, ocasionando estresse metabólico com aumento do consumo de oxigênio e de glicose para produção de energia e fosforilação de proteínas tirosinas cinases do parasita da célula hospedeira. A inibição da fosforilação em macrófagos infectados pelas drogas estaurosporina e genisteína (Souza, 2000), preveniu a fagocitose.

Após a invasão da tripomastigota na célula hospedeira e dentro do vacúolo parasitóforo ocorre o processo de diferenciação para amastigota. Organelas do sistema endolisossomal do hospedeiro fundem-se com o vacúolo formando um grande fagolisossoma aonde a forma tripomastigota irá se transformar em amastigota, processo que resulta no seu arredondamento pela retração da mudança da estrutura do cinetoplasto em forma de bastão. Há fragmentação da membrana,

que posteriormente é desintegrada, liberando a forma arredondada do *T. cruzi* para o contato direto com o citoplasma hospedeiro. Após 24 horas ocorre o processo de multiplicação intracelular do parasito pela divisão binária. Geralmente no quinto dia de infecção, quando a célula hospedeira não suporta a carga parasitária, encontram-se em média 500 novas formas amastigotas. As amastigotas transformam-se em tripomastigotas, com alongamento do flagelo. Ocorrendo o rompimento da célula hospedeira, as tripomastigotas entram no espaço intercelular e no sangue, reiniciando o processo de infecção de novas células (Brener, 1965; Souza, 2000).

I.4. - Ciclo evolutivo no hospedeiro invertebrado

A hematofagia está inserida no ciclo de vida de vários insetos e representa um fator determinante do ciclo de vida, hábitos, distribuição geográfica e ecologia dos triatomíneos (Lent e Wygodzinsky, 1979). O ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado inicia-se após a alimentação de sangue de mamífero portador da infecção. As formas tripomastigotas ingeridas transformam-se em epimastigotas no seguimento anterior do tubo digestivo do triatomíneo. No intestino posterior, as epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicas. Essas são as formas infectantes eliminadas nas fezes do inseto que contaminam o hospedeiro vertebrado (Figura 1) (Andrade e Andrews, 2005). No ciclo silvestre, as infecções pelo *T. cruzi* são adquiridas durante a alimentação dos triatomíneos, ao ingerir as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória de hospedeiros vertebrados, como gambás, tatus e ratos (Figura 2) (Teixeira e cols. 2006). No ciclo domiciliar, os insetos domiciliados que infectam o homem voltam a adquirir o *T. cruzi* ao se alimentar de sangue humano.



Andrade e Andrews, 2005.

Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no triatomíneo.

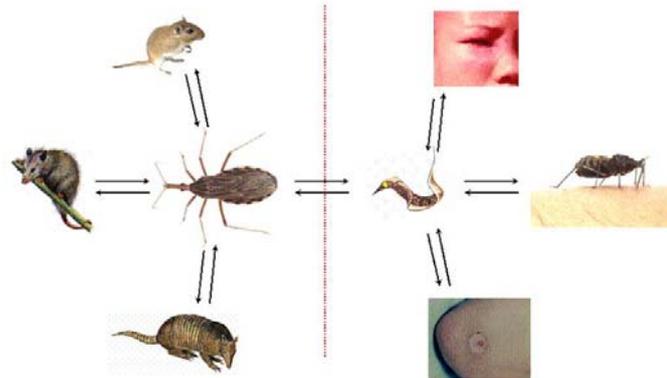


Figura 2: Ciclos silvestre (esquerda) e peri-domiciliar (direita) do *Trypanosoma cruzi* (Teixeira e cols, 2006).

I.5. - Transmissão

I.5.1. - Transmissão vetorial

A principal via de transmissão do *T. cruzi* ocorre através de insetos triatomíneos (Abad-Franch e Monteiro, 2005). Dentre as descritas mais de 120 espécies, já foram encontradas 40 espécies de triatomíneos infectadas com *T. cruzi*. A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre pela contaminação da pele ou de suas mucosas com as fezes eliminadas pelo inseto-vetor durante o repasto. As formas infectantes tripomastigotas metacíclicas penetram em células fagocíticas e dali se dissemina no corpo.

I.5.2. - Transmissão transfusional

Essa forma de transmissão é considerada a segunda principal via de transmissão na zona urbana, onde residem 70% da população das Américas (Bonametti e cols. 1998). Essa via de transmissão ganhou grande importância epidemiológica nas duas últimas décadas em função da migração de indivíduos infectados para os centros urbanos e da ineficiência no controle das transfusões nos bancos de sangue. Nos anos 80, esse perfil foi mudando com o controle de sangue e a qualidade do sistema de controle de vetores em áreas rurais (Dias, 1988; Schmunis, 1997; Wendel, 1997).

Porém muitos países ainda não contam com este controle, o que contribui para a ampla disseminação da doença além das áreas endêmicas. Nos Estados Unidos, por exemplo, verificou-se que doadores de sangue positivos para *T. cruzi* não estão concentrados apenas nos estados do sul e sudeste, onde se encontra a maioria dos imigrantes, mas, sim, espalhados por todo o país (Leiby e cols. 2002).

I.5.3. - Transmissão congênita

A transmissão congênita ou transplacentária é o terceiro mecanismo mais importante para a disseminação da doença de Chagas, constituindo sério problema de saúde pública (Schenone e cols, 1987). A infecção congênita pode causar aborto e nascimento prematuro, entre outros agravos. Geralmente o recém-nascido não apresenta sintomatologia e quando ocorrem em geral são manifestações digestivas, alterações oculares e neurológicas, como a paralisia cerebral (Coura, 2007). É importante ressaltar que, ao nascer, a criança deverá ser diagnosticada e tratada precocemente, pois nessa época ocorre uma melhor tolerância às drogas utilizadas. (Schumuñis e cols. 1995; Muñoz e cols. 1992).

I.5.4. - Transmissão oral

A transmissão oral tem papel importante na epidemiologia dessa doença. Em trabalho de revisão, Dias (2006) relata 10 episódios de contaminação humana pela ingestão do parasito, inclusive o surto ocorrido em Santa Catarina, em 2005, devido à ingestão de caldo de cana-de-açúcar contaminado. Outros casos citados sugerem a ingestão de açaí como via de transmissão em 10 municípios nos Estados do Amazonas, Amapá e Pará (Lewinsohn, 2005). Esse tipo de aquisição da infecção pela via oral tem sido observado persistentemente na região amazônica, totalizando assim 170 casos e 10 óbitos pela doença de Chagas aguda (Pinto e cols. 2004).

I.5.5. - Transplante de Órgãos

Não se tem muitos relatos da infecção adquirida pelo transplante de órgãos. Poucos estudos confirmaram esta via de transmissão do *T. cruzi* mediante transplantes de coração e rim. A doença é sintomática devido à imunodepressão pós-cirúrgica (Dias e Coura, 1997).

I.5.6. - Outras vias de transmissão

Transmissão acidental pode ocorrer em laboratório ou hospitais durante manipulação de material contaminado com a forma infectante, como por ex: cultura de triatomíneos, manipulação de sangue, urina e secreções infectados (Dias e Coura, 1997).

I.6. - Doença de Chagas - Fase Aguda

A fase aguda da doença de Chagas se estabelece nos primeiros meses de infecção (dois a quatro meses). O diagnóstico é baseado na presença do parasito em gota espessa ou esfregaços de sangue examinados ao microscópio (Laranja, 1953).

A infecção aguda pode ser sugerida pelos títulos detectáveis de Imunoglobulinas da classe M (IgM) e baixos títulos de IgG, (Dias e Coura, 1997; Storino e Barragán, 1994; Amato e cols. 1997).

A doença de Chagas aguda tem curta duração e elevada parasitemia. Pode se apresentar de forma aparente (sintomática) ou inaparente (assintomática). Os indivíduos da fase aguda geralmente apresentam quadro febril inespecífico, comum a todo processo infeccioso. Casos aparentes são comuns em crianças de dois anos, e apresentam morbidade elevada em negros (Dias e Coura, 1997).

I.6.1. - Forma subaguda

Ocorre quando o paciente tem a infecção aguda grave. O paciente apresenta miocardite muito intensa, evoluindo para a forma crônica cardíaca. Pode surgir cardiopatia e a morbidade é elevada. Essa forma é rara e apresenta menos de 1% dos casos já registrados (Laranja e cols. 1956; Dias, 1990).

I.6.2. - Fase Crônica - Forma Indeterminada

Definição de forma indeterminada baseia-se nos testes imunológicos positivos, à qual se associa a ausência de sintomatologia clínica. Essa forma clínica é a mais freqüente na população de áreas endêmicas (Laranja e cols. 1956; Macedo, 1997), dois terços dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* estão nessa fase. O prognóstico é bom e não altera a capacidade física em relação a indivíduos não chagásicos. O chagásico pode permanecer na forma indeterminada por toda sua vida (Dias, 1993).

I.6.3. - Fase Crônica

I.6.3.1. - Cardiopatias

Na fase crônica, a cardiopatia causa grande impacto médico e social, pela perda de produtividade, impedimento ao trabalho e custos com tratamentos e cirurgias. As manifestações clínicas estão associadas ao comprometimento do sistema nervoso periférico, como arritmias, anormalidades sensitivas, parestesias, fraqueza muscular entre outras (Ferreira e cols. 2003). A ecocardiografia pode mostrar o aumento do coração chagásico, geralmente em indivíduos que foram infectados há mais de 10 anos. A forma cardíaca leva a insuficiência de órgãos e tromboembolismo (Lauria-Pires e cols. 2000). Estudos clínicos-epidemiológicos mostraram que 57% das mortes estavam relacionadas à doença de Chagas crônica (DCH). Nesses estudos, 58% das mortes foram por insuficiência cardíaca e 37,5% morreram subitamente. Os restantes 4,5% das mortes estavam relacionadas com as formas digestivas da DCH. A evolução clínica de cardiomiopatias chagásicas pode ocorrer num período de sete meses a dois anos, até a morte do paciente (Prata, 2001).

I.6.3.2. - Forma digestiva

A esofagopatia ocorre no Brasil aproximadamente em 7 a 11% dos indivíduos chagásicos que residem em regiões endêmicas. A colopatia ocorre entre 1 a 7% dos

chagásicos. (Dias e Coura, 1997). A forma digestiva crônica afeta deglutição, ocorrendo regurgitação de alimentos ingeridos; esses sinais estão fortemente associados ao megaesôfago que pode se apresentar clinicamente em chagásicos entre os dois e 70 anos de idade. A maioria dos pacientes com megaesôfago tem entre 20 e 40 anos de idade (Boyce e Bakheet, 2005). O megaesôfago pode antecipar a doença no coração de vários pacientes. A manifestação clínica de disfagia, epigastralgia, soluços e salivação aumentada, resultam na dificuldade de alimentar-se.

Megacólon aparece um pouco mais tarde no curso da doença de Chagas em relação ao megaesôfago (Dantas e Mamede, 1996). Pacientes relatam constipação (retenção de fezes na ampola retal). A retenção do bolo fecal durante dias leva a dilatação e ao espessamento da parede do cólon, afetando a região sigmóide e o reto (Meneghelli e cols. 2005). A retenção do bolo fecal também dilata o intestino, causando dor e desconforto físico. As complicações ocasionadas pela retenção fecal podem gerar obstrução e ruptura da víscera (Adad e cols. 2002).

I.7. - Diagnóstico

O primeiro diagnóstico da doença de Chagas foi feito no dia 23 de abril de 1909, quando Carlos Chagas identificou, ao exame microscópico, formas do flagelado *T. cruzi* no sangue de uma jovem febricitante. Desde então, são utilizados diferentes testes parasitológicos e imunológicos para diagnóstico dessa infecção. Na fase aguda a pesquisa visa à identificação do protozoário no sangue periférico, pelo exame direto de gota de sangue ou pelo método de concentração de Strout, ou ainda pelo esfregaço do sangue em lâmina corada pelo Giemsa.

Os anticorpos IgM anti-*T. cruzi* identificados pela imunofluorescência indica a presença do *T. cruzi* no corpo do chagásico e a presença do parasito pode ser confirmada pela hemocultura enriquecida com o meio LIT (Liver infusion tryptose). As hemoculturas levam até 120 dias para mostrar o parasito no exame microscópico. O parasito também pode ser recuperado pela inoculação do sangue do paciente em animais. Amplificação de DNA do parasito pela reação em cadeia da polimerase

(PCR), também tem sido utilizada no diagnóstico da infecção. Os resultados dos testes imunológicos e de PCR devem ser analisados cuidadosamente. Ou seja, o exame positivo sugere a infecção, mas existem muitas causas geradoras de resultados falsos (Vexenat e cols. 1993; Gadelha e cols. 2003). Esses testes são considerados positivos quando houver concordância entre resultados sorológicos e de PCR (WHO, 2002).

I.8. - Tratamento etiológico da doença de Chagas

Após a descoberta do *T. cruzi* por Carlos Chagas (1909), vários medicamentos tripanocidas têm sido experimentados. No quesito tratamento, foram usados experimentalmente drogas como atoxil, fucsina, mercúrio. (Mayer e Rocha Lima, 1912, 1914) e todas elas foram ineficazes. Stein (1933) teve uma das iniciativas mais promissoras da época ao utilizar derivados de bismuto, usadas para espasmos gástrico, que foram testadas em modelo animal (camundongos), obtendo bons resultados.

I.8.1. - Nifurtimox

Após a segunda guerra, novas drogas foram testadas para a doença de Chagas, mas que infelizmente não obtiveram bons resultados. Em 1970 surgiram dois fármacos, testados de maneira empírica, que demonstraram redução da parasitemia e da letalidade. Em 1972, o laboratório Bayer anunciava o nifurtimox: 1,1-dióxido de tetraidro-3-metil-4[(5-nitrofurfurilideno)amino]-2H-1,4-tiazina (Bock e cols. 1972). Sugeriram que o seu mecanismo de ação ocorria através de radicais livres, como ânions, superóxido e peróxido de hidrogênio que são liberados pela droga (DoCampo e Stoppani, 1979; Stoppani, 1999). Essa droga foi retirada do mercado, devido a sua alta toxicidade.

I.8.2. - Benzonidazol

O Benzonidazol, N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, tem atividade anti-tripanosossoma. Esse fármaco é utilizado para o tratamento de Chagas, pois tem potente atividade tripanocida em testes *in vitro* e *in vivo*, contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* (Grünberg e cols. 1968). Posteriormente, Polak e Richle (1978) descreveram o mecanismo de ação deste fármaco, na diminuição da síntese de proteínas, redução da incorporação de timidina em DNA e na redução de incorporação dos precursores de RNA. Trabalhos complementares demonstraram que os efeitos deletérios ocasionados pelos benzonidazol são semelhantes àqueles causados pelo nifurtimox: radicais livres liberados pela droga ligam-se ao DNA do *T. cruzi*, interferindo na biossíntese dessa macromolécula (Diaz e cols. 1988).

O benzonidazol é absorvido pela via digestiva, atingindo pico máximo 3-4 horas após ingestão. O tempo de eliminação plasmática é em torno de 12 horas, em sua sob a forma de metabólitos não conjugados hidrossolúveis eliminados na urina. A dose diária tolerada via oral em adultos é cerca de 5 a 7 mg/kg de peso corporal, dura de 30 a 60 dias consecutivos. Em infecção aguda, o tratamento estende-se por até 90 dias. Em crianças, a dose pode ultrapassar 10 mg/kg/dia, devido à sua maior tolerância a droga (Cançado, 1985). O benzonidazol tem muitos efeitos colaterais: náuseas, vômitos, confusão mental, convulsões, dermatites por hipersensibilidade, depressão da medula óssea e reação tipo doença do soro. Os sintomas clínicos manifestam-se por erupção cutânea, eritema, prurido, febre, dores generalizadas e sensação de mal-estar. O benzonidazol também tem alta toxicidade, relacionada à mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade (Cançado JR, 1981; Bock e cols.1972). Há relatos sugerindo que a droga causa azoospermia e esterilidade.

O benzonidazol é composto nitroderivado que sofre redução enzimática e forma radicais livres que se ligam a macromoléculas de proteínas e DNA. Esses radicais não atuam somente no parasito, mas também em qualquer célula mamífera. Ou seja, o grupo nitro tem ação indutora de mutagenicidade, cancerogenicidade e esterilidade. Cabe salientar que esses compostos são potentes supressores das respostas imunes nos mamíferos (Revisado por Lauria-Pires e Castro, 2006).

I.8.3. - Outros fármacos testados para o tratamento específico da doença de Chagas

Após o lançamento do benzonidazol no mercado, a indústria farmacêutica deixou de lado o interesse em pesquisar novos fármacos. Alguns pesquisadores buscam novas drogas visando erradicar o parasito e minimizar os efeitos tóxicos que são comumente relacionados ao uso do benzonidazol.

I.8.3.1. - Alopurinol

O alopurinol é um análogo da hipoxantina, que diminui a produção de ácido úrico, podendo atuar contra as formas epimastigotas do *T. cruzi* em meio de cultivo acelular. Ávila e Ávila (1983) observaram significativa supressão do parasitismo em camundongos infectados com *T. cruzi*. O *T. cruzi*, converte o alopurinol (HPP) em 4-aminopirazol [3,4-*d*] pirimidina (APP) que tem até 15% mais eficácia contra epimastigostas (Ávila e cols. 1983).

Lauria e cols. (1988) trataram seis pacientes na fase aguda, com doses de 20-30 mg/kg/dia durante 60 dias e verificaram que não houve supressão da parasitemia. Estudo conjunto feito no Brasil, Argentina e Bolívia mostraram 92% de positividade de xenodiagnósticos após tratamento com 900 mg de alopurinol por 60 dias (Brener, 2000).

I.8.3.2. - Megazol (CL 64'855)

Esse derivado nitroimidazol [2-amino-5(1-metil-5-nitro-2-imidazol)-1,3,4,-tiadiazol] tem amplo espectro contra bactérias e parasitos tais como: *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania donovani* e outros. Camundongos infectados pelo *T. cruzi* e tratados com o megazol, tiveram altos níveis de cura parasitológica. A droga foi retirada do mercado, devido ao seu potencial mutagênico, impedindo o uso em humanos (Filard, 1982).

I.8.3.3 - Ofloxacina

Ofloxacina é uma fluoroquinolona derivada do ácido nalidixico usada para o tratamento de infecções bacterianas, que atua inibindo a enzima bacteriana DNA topoisomera II (girase de DNA). A ofloxacina age sobre a enzima e sua inativação impede a duplicação do DNA, interrompendo assim a multiplicação bacteriana. Em experiências realizadas por Gonzales-Perdomo e cols. (1990) verificou-se que essa classe de fluoroquinolonas bloqueou a diferenciação de amastigotas em cultura de tecido. Porém quando a droga foi administrada em camundongos infectados não houve cura parasitológica.

I.8.3.4 - Inibidores da síntese de ergosterol

O ergosterol é um componente presente na membrana celular de fungos, com funções semelhantes à do colesterol em animais. Nos protistas, o ergosterol tem a função de fluidificar as membranas celulares.

I.8.3.4.1. - Cetoconazol e Itraconazol

Inibidores da síntese de ergosterol foram pesquisados repetidas vezes e tiveram resultados contraditórios. McCabe (1983) relatou que o cetoconazol tem ação protetora contra o *T. cruzi* e o mesmo autor, em 1988, demonstrou a falha do cetoconazol no tratamento da infecção crônica em camundongos. Além do cetoconazol e itraconazol, outros azóis também teriam induzido profundas alterações no protozoário. Urbina e cols. (1991) testaram as drogas lovastatina e cetoconazol em camundongos infectados com *T. cruzi*. Os resultados sugeriram a eliminação dos parasitas no sangue circulante. Na mesma linha, Urbina e cols. (1993) reportaram que a associação de cetoconazol com lovastatina e terbinafina era potente antiproliferativo contra o *T. cruzi*. Com base nos achados de Urbina, Brener e cols. (1993) resolveram reproduzir os resultados em camundongos infectados com o *T. cruzi*. Porém o tratamento com cetoconazol e lovastatina foi ineficaz. Ademais, oito pacientes chagásicos crônicos foram submetidos ao mesmo esquema terapêutico

durante 51 a 96 dias, com doses 3,1 a 8,7 mg/kg e tiveram acompanhamento por 5 a 60 meses, tiveram hemoculturas positivas em seis casos e nos dois outros a infecção não alterou os títulos de anticorpos específicos, demonstrando assim que houve falha terapêutica.

O derivado triazólico (bistriazol) ativo contra fungos e protozoários inibidores da síntese de ergosterol foram testados por Urbina e cols. (1991). Foram anotados os efeitos antiproliferativos e o mecanismo de ação da ICI 195,739, sobre formas epimastigotas e amastigotas do *T. cruzi*. Esses resultados foram comparados com aqueles obtidos com o composto DO870 que é um enantiômero com ação fungicida e com atividade sobre o *T. cruzi in vitro* e *in vivo*. Animais tratados com 15 a 20 mg/kg do DO870 demonstraram através dos testes de hemocultura, xenodiagnóstico e PCR um percentual de cura de 80 a 90% (Urbina e cols. 1993, 1996; Larardi, 1991)

I.8.3.4.2. - Posaconazol

Molina e cols. (2000) sugeriram que 20 mg/kg/dia do SCH 56592 foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência dos animais infectados com *T. cruzi*, comparativamente ao tratamento com 100 mg/kg/dia de benzonidazol, aumentando a sobrevivência dos animais infectados. O triazol teria produzido cura parasitológica em 50 a 60% dos animais, contrastando com o benzonidazol que não apresentou cura em nenhum grupo tratado, ou seja, o SCH 56592 mostrou potente ação tripanocida.

I.8.3.5. - Inibidor de Cruzipaína

Encontrada abundantemente no *T. cruzi*, essa enzima tem diversas isoformas. Com ampla especificidade catalítica, hidrolisa inúmeras proteínas (Raimond e cols. 1991). Sua ação característica enzimática lisossomal está relacionada ao processo de nutrição do parasito por meio de hidrólise de proteínas e peptídeos. Sua atividade promove desenvolvimento do parasito e da célula hospedeira (Scharfstein e cols. 2000).

Epimastigotas tratadas com cisteíno-proteases mostram acúmulo de cruzipaina nos compartimentos vesiculares, gerando anormalidades no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (Engel e cols. 1998). Este interrompe o tráfego de proteínas, resultando na morte do parasito após 48 h de tratamento. O tratamento da infecção pelo *T. cruzi* em murinos, reduziu a parasitemia e diminuiu a infiltração linfocitária da lesão miocárdica. Os inibidores de cisteíno-proteases teriam promovido cura no estágio crônico da doença, após tratamento por 21 dias (Engel e cols. 1998).

I.8.3.6. - Inibidor de Catepsina B

Catepsina B, sintetizada como pré-pró-enzima, é uma cisteíno-protease que se expressa nas três formas do parasito. Sugere-se que ela esteja ligada à nutrição e diferenciação do parasito (Nóbrega, 2001). No trabalho de Fernandes e cols. (2005) notou-se que pacientes chagásicos apresentavam elevados níveis de anticorpos contra a catepsina B. Ainda não existem relatos sobre a utilização de inibidores de catepsina B para a doença de Chagas experimental.

I.9 - Critérios de cura

São três os objetivos do tratamento dos indivíduos chagásicos: a) erradicar o parasito; b) prevenir o aparecimento ou agravamento de lesões em órgãos alvos; e c) interferir na cadeia epidemiológica de transmissão da infecção. Sendo amplos os objetivos, conseqüentemente, a avaliação da eficácia terapêutica tem grande importância.

A definição apresentada pelo consenso de 2005 definiu cura quando há negatificação dos testes parasitológicos e sorológicos. Assim o chagásico que tiver exames parasitológicos, hemocultura, xenodiagnóstico, PCR, e testes sorológicos persistentemente negativos devem estar curados da infecção ativa.

O diagnóstico da doença de Chagas pode ser realizado pelas técnicas: 1) Xenodiagnóstico, que consiste em colocar triatomíneos livres de infecção em contato

com a pessoa que esteja com suspeita de ter a infecção, em alguns centros para minimizar as reações alérgicas e resistência do paciente ao xeno natural, foi desenvolvido o xenodiagnóstico artificial, onde o sangue do paciente é coletado com anticoagulante, e mantido em condições para que as ninfas de triatomíneos façam o respasto sanguíneo (Santos e cols. 1995). As excretas do triatomíneo são examinadas ao microscópio em busca do parasito (Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda, 2003). 2) Hemoculturas, onde amostra de sangue coletadas do paciente supostamente infectado é adicionada em tubos contendo meio de cultivo Agar-sangue-LIT (Liver Infusion Tryptose). As culturas foram analisadas mensalmente ao microscópio. Resultados negativos não significam cura parasitológica, já que podem resultar de períodos de aparasitemia, parasitemia escassa ou esporádica. O exame parasitológico é pouco sensível para detecção de infecções crípticas.

3) Diagnósticos sorológicos são mais sensíveis e são provas indiretas da presença do parasito. Os testes mais utilizados para a detecção de anticorpos específicos contra antígenos do protozoário são a hemaglutinação indireta, reação de imunofluorescência indireta e ELISA. Existe um consenso para se qualificar o indivíduo como portador da infecção, confirmada pelo menos por duas reações positivas em amostras de diferentes soros (WHO, 2002).

4) Reação de polimerização em cadeia (PCR). Essa técnica deveria resolver os casos discordantes com e diferentes testes sorológicos. Entretanto, a PCR com alta sensibilidade requer cuidado quanto à interpretação dos resultados positivos (Teixeira e cols. 2006).

I.10. - Laboratório LMPDC

Há quase vinte anos o LMPDC investiga os mecanismos envolvidos no aparecimento das lesões do coração e do tubo digestivo do paciente chagásico crônico. Pesquisas realizadas neste laboratório sugerem que reações auto-imunes estariam associadas a integrações do kDNA do *T. cruzi* no hospedeiro:

Teixeira e cols. (1991) observaram que o DNA de *T. cruzi* se ligava ao DNA de macrófagos peritoneais de camundongos infectados pelo parasito, sugerindo assim um rearranjo transxenogene. Mais adiante, usando técnicas moleculares, apresentaram evidências sugerindo que os minicírculos do kDNA se integravam no DNA nuclear de macrófago humano em cultura (Teixeira e cols. 1994).

Arganãraz (1996) demonstrou a integração horizontal do minicírculo de kDNA ligado covalentemente a elemento retrotransponível do macrófago humano, pelas técnicas *Southern blot*, PCR, clonagem e seqüenciamento do DNA exógeno, utilizando *primers* específicos do kDNA e do DNA do hospedeiro.

Simões-Barbosa e cols. (1999) observaram que as mutações no genoma de macrófagos transfectados com o kDNA eram transferidas para suas progênes após três anos de passagens sucessivas em culturas. As modificações do perfil da banda de kDNA identificadas através do *Southern blot*, sugerem a ocorrência da mobilização do kDNA integrado no genoma da célula. Essa transposição dos minicírculos integrados no genoma de macrófago sugere a possibilidade de alterações genotípicas, podendo-se manifestar fenotipicamente.

Em outro estudo, Simões-Barbosa e cols. (2006) observaram população de macrófagos infectados com *T. cruzi* e mostraram que o gene p15 estava modificado no macrófago após três anos de replicação. Este achado mostrou uma patologia molecular decorrente da mutação do kDNA, silenciando o gene p15.

Análise de transferência horizontal em modelo animal demonstrou a transferência de seqüências de minicírculos de kDNA para o genoma hospedeiro de mamíferos, aves e pacientes chagásicos (Nitz e cols., 2001; Nitz e cols., 2004). A herança vertical das mutações de kDNA para as progênes de coelhos e galinhas foram encontradas em cópias de retrotransposons LINE-1 e as análises em bancos de dados das seqüências de DNA híbrido na região de justaposição sugeriu a possibilidade de formação de pseudogenes ou novos genes, pois foram identificadas novas fases de leitura aberta (ORFs).

Gomes e cols.(2006) utilizando *Gallus gallus* como modelo experimental investigou a transferência vertical do kDNA integrado. A inoculação de ovo fértil com

formas tripomastigotas produziu infecção no embrião até o oitavo dia. A partir de então a infecção no nascimento do pinto já era refratária ao protozoário, porém retinha o kDNA do *T. cruzi* integrado no seu genoma. Gomes observou a integração do kDNA mitocondrial no genoma da galinha em três gerações. A herança do kDNA foi associada com as mutações de kDNA e com a sintomatologia clínica de insuficiência cardíaca. Nesse estudo, verificou-se que o sítio de integração do kDNA no genoma da galinha é o retrotransposon CR-1 (equivalente a LINE-1 de mamífero) do cromossomo 4.

Recentemente Hecht (2008) analisou a transferência horizontal de kDNA (TGH) do *T. cruzi* para o genoma humano, em grupo de 123 indivíduos com sorologia positiva para Tripanossomíase americana. Utilizando o método de *psTAIL-PCR* e *primers* específicos de kDNA e de LINE-1 humano, foi possível amplificar seqüências quimeras de DNA nas amostras de sangue dos descendentes G1 e G2. As integrações de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* no genoma do hospedeiro foram identificadas, principalmente em LINE-1 e em diversos cromossomos. Os resultados obtidos demonstraram TGH em todos os chagásicos com a infecção ativa. A transferência vertical (TGV) dessas mutações foi encontrada em 45% das progênes G1 e G2.

Complementando o trabalho de Hecht (2008), Araujo (2008), demonstrou a transferência vertical de seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* mediante células germinativas de chagásicos e suas progênes G1 e G2.

I.10.1. - Tratamento multidrogas da doença de chagas

Uma linha de pesquisa desenvolvida no LMPDC visa à utilização de drogas tripanocidas associadas às drogas inibidoras de vias metabólicas de divisão e diferenciação celular. Este estudo tem como finalidade padronizar um tratamento visando a eliminar o parasita e inibir a integração do kDNA no genoma da célula hospedeira.

A tese de doutorado realizada por Rosa (2005) teve como objetivo testar o tratamento multidrogas em células mantidas em cultura de tecido. A autora estudou a cascata de tradução de sinais e demais vias bioquímicas que se associavam com a integração do kDNA durante o processo de diferenciação e divisão celular, utilizando inibidores específicos de cada uma das vias metabólicas, a fim de bloquear a integração do kDNA no genoma da célula hospedeira. Os achados de Rosa (2005) mostraram que o tratamento com os inibidores de topoisomerase II que corta a fita dupla de DNA durante a divisão do parasita inibe a integração do kDNA no macrófago murino. O esquema usado por Rosa é essencial na compreensão da inibição da integração do kDNA no genoma da célula murina. Usou também inibidores de vias de fosforilação e inibidores da transcriptase reversa, que evitaram a transferência horizontal para a célula hospedeira. Esses achados são empregados aqui como referência dos esquemas de tratamento multidrogas que representam os nossos objetivos.

II. JUSTIFICATIVA

Diante dos resultados promissores de Rosa (2005), onde a autora utilizando drogas inibidoras de vias metabólicas específica -: cicloexamida, estaurosporina, genisteína, isoquinilina, ofloxacina, etoposide, mitomicina C, colchicina e zidovudina - demonstrou ser possível a inibição da integração de seqüências de minicírculos de kDNA no genoma de macrófagos em cultura de tecidos.

Baseado nos achados de Rosa, foi postulado a tentativa de se reproduzir tais achados no modelo animal utilizando inibidores das vias de tradução de sinais, como o zidovudina, ciprofloxacina e praziquantel associados ao tripanocida benzonidazol, visando a erradicação do parasito e prevenção da integração do kDNA no genoma murino.

As características fármacoquímicas das drogas escolhidas para o tratamento experimental multidrogas das infecções pelo *T. cruzi* são descritas a seguir:

Ciprofloxacina: 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-Quinolincarboxylic acid, pertencente ao grupo das quinolonas, tem como ação a inibição da DNA girase, uma enzima bacteriana. que tem papel vital no metabolismo

e na reprodução bacteriana. Ciprofloxacina é usada no tratamento de infecções complicadas por microrganismos resistentes tais como: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Branhamella*, *Legionella* e *Staphylococcus*.

Estudos prévios mostram que a ciprofloxacina tem atividade contra o *T. cruzi* (Bodley e Shapiro, 1995). Rosa (2004) demonstrou a ciprofloxacina inibe a integração do kDNA do *T. cruzi* em sítios específicos do genoma de macrófagos.

Praziquantel: é um composto sintético derivado de isoquinolina com denominação química de 4H-pirazinol 2,1-aisoquinolina-4-1, 2-(ciclohexil-carbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexaidro. É um anti-helmíntico antiparasitário de amplo espectro, contra numerosas espécies de cestódeos e trematódeos. É usado para tratar a esquistossomose (*Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*), cisticercose (*Taenia solium*) e fasciolíase (*Fasciola hepática*). O Praziquantel causa afluência de Ca^{2+} em receptores na superfície corporal de cestódeos e trematódeos. Isto conduz à despolarização da membrana e contração quase instantânea da musculatura, ocorrendo uma vacuolização rápida do tegumento sincicial e desintegração tegumental subsequente, resultando em expulsão mais fácil da área gastrointestinal ou morte do parasita. O praziquantel sofre importante biotransformação metabólica no fígado (fenômeno de primeira passagem hepática) e seus metabólitos inativos são eliminados por hidroxilação. Tem meia-vida plasmática de 1,5 h, sendo bem distribuído no SNC (neurocisticercose). A maior parte (90%) é eliminada através da urina em 24 h.

O uso do praziquantel no tratamento multidrogas que planejamos teve como finalidade a inibição da via PI3-k, a ação das proteínas serina /treonina quinase que está envolvida no processo de apoptose, proliferação celular, controle metabólico e no tráfego de vesículas, a fim de interromper o ciclo celular do *T. cruzi* na célula hospedeira (Feig, 1993; Medema e cols. 2000). Foi demonstrado que a via de sinalização por PI3 quinase está relacionada com a retenção do *T. cruzi* na célula hospedeira (Woolsey e cols. 2003; Andrade e Andrews, 2005)

Zidovudina 1-[(2R,4S,5S)-4-azido-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-5-methylpyrimidine-2,4-dione é um fármaco utilizado como antiviral, inibidor da transcriptase reversa. Indicado para os tratamentos da SIDA e da *jiroveci pneumonia*. Foi uma das primeiras drogas aprovadas para o tratamento da SIDA. Atualmente é usado no tratamento de infecções por HIV no Brasil em associação com outros medicamentos anti-retrovirais, sendo um medicamento de uso hospitalar. A zidovudina: é fosforilizada no interior da célula para monofosfato de zidovudina através da timidocinase celular; o monofosfato se converte em difosfato pela ação da dimetiltransferase celular e logo se converte em trifosfato através de outras enzimas celulares. O trifosfato de zidovudina compete como substrato com o trifosfato de timidina natural para se incorporar às cadeias do DNA viral, que se formam pela ação da transcriptase do retrovirus (DNA polimerase dependente de RNA). Uma vez incorporado, o trifosfato de zidovudina interrompe prematuramente o crescimento da cadeia de DNA, já que o grupo 3'-azida impede novas uniões fosfodiéster-5'-3' e, portanto, inibe a divisão do vírus. A afinidade da zidovudina com a transcriptase inversa do retrovirus é maior que com a DNA-polimerase humana e permite a inibição seletiva da replicação viral sem bloquear a replicação celular.

O zidovudina foi incluída no esquema com a finalidade de inibir a transcrição reversa de elementos retrotransponíveis LINE-1, evitando a transferência horizontal do kDNA para a célula hospedeira (Rosa, 2005).

Benzonidazol: (Rochagan, Roche®) é um medicamento usado para a quimioterapia específica da Doença de Chagas. Embora, seja o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença, é considerado pouco eficaz e não erradica a infecção na fase crônica da doença. Atua através do mecanismo de estresse redutivo, envolvendo modificação covalente de macromoléculas, como as de DNA, por intermediários nitroreduzores. Isso leva a perda da capacidade de multiplicação do parasito *T. cruzi*. Esse medicamento tem efeitos colaterais frequentes incluindo: anorexia, vômitos, e dermatite alérgica, provavelmente como consequência dos danos oxidativos ou redutivos no tecido do hospedeiro.

III. OBJETIVOS

III.1. - Objetivo Geral

Avaliar o tratamento multidrogas da doença de Chagas aguda e crônica experimental, utilizando os fármacos: Benzonidazol, ciprofloxacina, zidovudina e praziquantel com diferentes esquemas terapêuticos e diferentes tempos de tratamento.

III.2. - Objetivos Específicos

-Avaliar aspectos pré-clínicos, parasitológicos e de sobrevivência nos grupos experimentais e controles;

-Analisar o efeito do tratamento sobre diferentes esquemas, em relação ao tempo de tratamento e dose dos fármacos utilizados;

-Comparar os métodos parasitológicos e sorológicos, como critério de cura terapêutica no modelo animal;

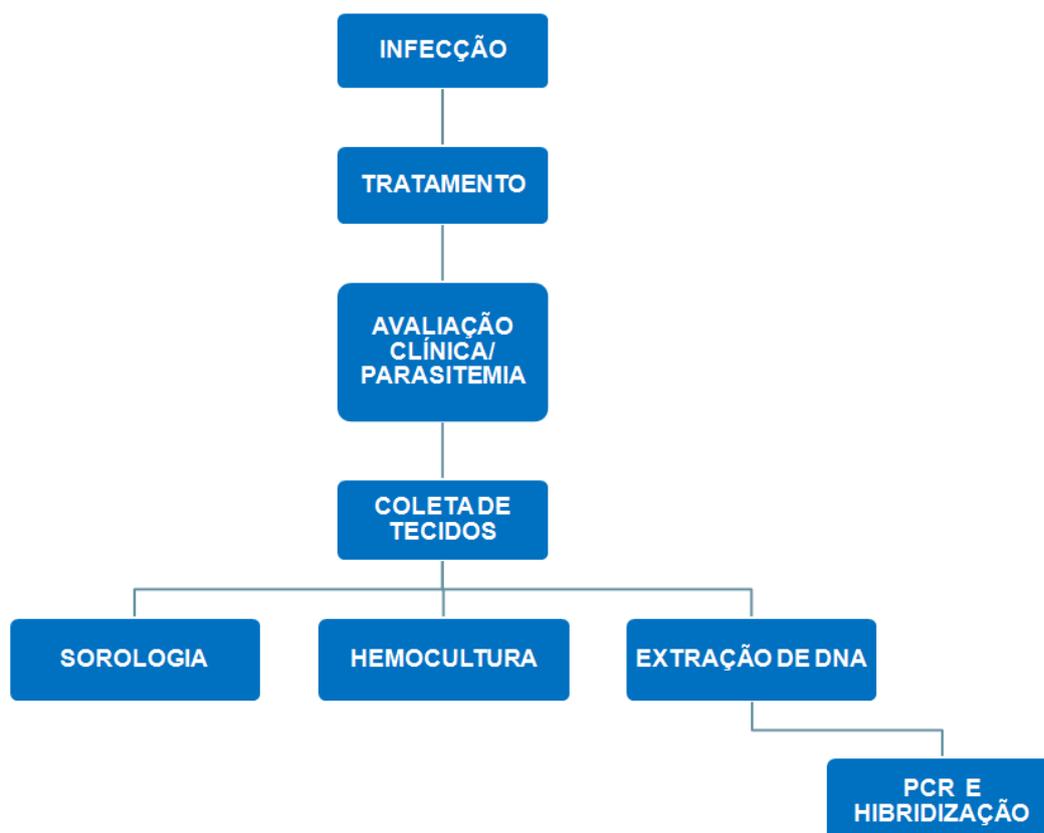
-Avaliar efeito de drogas inibidoras de vias metabólicas, na inibição da integração do kDNA no genoma do hospedeiro.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. - Projeto piloto

Em janeiro de 2006, foi realizado um piloto para padronização do inóculo e dosagem dos medicamentos utilizados. Foi padronizado o inóculo de 1.000/formas tripomastigotas por camundongo, para indução da fase crônica e 10.000/formas para fase aguda, inoculadas por via intraperitoneal.

IV.1.1 - Fluxograma



IV. 2. - Estoque Berenice de *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas foram colhidas de células cardíacas murinas da linhagem L6 cultivadas em DMEM, pH 7.2, suplementado com SFB (soro fetal bovino) a 10%, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 250 mM de L-glutamina, sob atmosfera de CO₂ a 5%, a 37 °C.

IV. 3. - Desenho experimental

Foram utilizados 1.200 camundongos BALB/c, isogênicos, de ambos os sexos, pesando 20 a 25 gramas, provenientes do biotério do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doenças de Chagas, Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília. Os animais de cada grupo experimental foram mantidos separados, em gaiolas de 20 camundongos, nas mesmas condições ambientais e dieta de ração comercial e água *ad libitum*.

IV. 4. - Infecção dos camundongos com *Trypanosoma cruzi*

Foram selecionados camundongos da linhagem BALB/c, infectados com 1×10^4 tripomastigotas para induzir a fase aguda e 1×10^3 , para induzir a fase crônica da doença experimental. Os tripomastigotas eram obtidos de cultivo de células musculares murinas da linhagem L6. As formas tripomastigotas colhidas no sobrenadante eram contadas e inoculadas pela via intraperitoneal.

IV. 5. - Pesagens dos camundongos

Ao serem selecionados os camundongos antes de serem infectados, eram pesados e todas as variações de massa, anotadas uma vez por semana durante todo o tratamento.

IV.6. - Administração das drogas

A medicação foi ministrada por via oral (gavagem) com seringa de 1 mL, adaptada a uma sonda uretral número 4, recortada na altura de 3 cm. Foram administradas diferentes associações e concentrações das drogas, sempre diluídas em água até o volume final de 300 µL/camundongo. O animal recebia a mistura uma vez por dia, de acordo com o tipo de tratamento proposto para cada grupo (15 dias, 30 ou 60 dias).

Antes de utilizar o tratamento multidrogas em camundongos infectados com *T. cruzi*, foi feita avaliação de toxicidade em grupos experimentais e controles: A) sem infecção; B) infecção sem tratamento; C) infecção e tratamento com benzonizadol; D) zidovudina; E) ciprofloxacina; F) praziquantel e L) associação de zidovudina mais ciprofloxacina e praziquantel, onde as drogas empregadas foram administradas por gavagem, como descrito acima, em cada camundongo infectado com o *T. cruzi*.

Peso, parasitemia e sobrevivência também foram avaliadas nesses grupos. As drogas foram estocadas à temperatura ambiente conforme orientação do fabricante. As apresentações farmacêuticas em comprimidos permitiram maceração e pesagens em balança antes de serem aliquotadas.

IV. 7. - Grupos experimentais:

Os animais foram divididos em grupos de acordo com a fase da infecção, o tipo de tratamento e a duração da administração das drogas, como seguem:

Fase I = Tratamento na fase aguda

Fase II = Tratamento na fase crônica

Cada fase foi subdividida em etapas. Em cada etapa, foram aplicados diferentes esquemas terapêuticos.

Etapa I, II, III e IV, camundongos na fase aguda, tratados a partir do 5º dia pós-infecção. **Etapa V e VI** camundongos na fase crônica, tiveram tratamento a partir do 60º dia pós-infecção.

Na tabela 1, detalhes do esquema terapêutico referente a cada etapa:

Tabela 1. Doses terapêuticas utilizadas nas seis etapas analisadas no tratamento multidrogas da doença de Chagas experimental.

ETAPA	Benzonidazol	Ciprofloxacina	Zidovudina	Praziquantel	Ínicio tto.	Tempo de tto.
I	43 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	46,5 mg/kg	5° dpi *	60 dias
II	20 mg/kg	17 mg/kg	30 mg/kg	24,95 mg/kg	5° dpi	60 dias
III	20 mg/kg	17 mg/kg	30 mg/kg	24,95 mg/kg	5° dpi	30 dias
IV	43 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	46,5 mg/kg	5° dpi	15 dias
V	43 mg/kg	60 mg/kg	60 mg/kg	46,5 mg/kg	60° dpi	30 dias
VI	20 mg/kg	17 mg/kg	30 mg/kg	24,95 mg/kg	60° dpi	60 dias

*dpi- dia pós-infecção

Grupos: A, Controle; B, Infectados e sem tratamento; C, Infectados e tratados com benzo; G, Infectados e tratados com benzo e azt; H, Infectados e tratados com benzo e cipro; I, Infectados e tratados com benzo e pzq; J, Infectados e tratados com benzo, cipro e azt; K, Infectados e tratados com benzo, cipro e pzq; M, Infectados e tratados com benzo, azt e pzq; N, Infectados e tratados com benzo, cipro, azt e pzq.

IV. 8. - Diagnóstico Parasitológico

IV. 8.1. - Curvas de parasitemia

As curvas parasitêmicas foram determinadas pela contagem do *T. cruzi* no sangue obtido da cauda do animal. Padronizou-se o período da manhã (Brener, 1962) para a contagem dos tripomastigotas do sangue, 48 a 72 horas depois da inoculação, e em seguida, em dias alternados durante os primeiros 30 dias de infecção. Em algumas ocasiões a observação estendeu-se até o 60° dia de infecção. Nesses experimentos, a contagem do número de parasitos em 5 mm³ de sangue foi feita em 50 campos microscópios de objetiva 400 X, de acordo com a técnica descrita por Brener (1962).

Em cada grupo experimental foram realizadas contagens em seis a oito animais e os resultados expressos pelas médias das contagens. Considerou-se como início do período patente, o primeiro dia em que os parasitos foram detectados no sangue.

Em cada etapa foram utilizados 10 grupos de 20 animais para cada esquema terapêutico. Houve diferenças em etapas cujos grupos tiveram concentração dos medicamentos e períodos de tratamento diferentes. A denominação dos grupos experimentais, explicitando os medicamentos utilizados e as posológicas empregadas, está indicada abaixo.

Grupo A: controle, não infectado

Grupo B: infectados com *T. cruzi* e não tratados

Grupo C: Infectados e tratados com benzonidazol.

Grupo D: Infectados e tratados com zidovudina

Grupo E: Infectados e tratados com ciprofloxacina

Grupo F: Infectados e tratados com praziquantel

Grupo G: Ibid, benzonidazol e zidovudina.

Grupo H: Ibid, benzonidazol e ciprofloxacina.

Grupo I: Ibid, benzonidazol e praziquantel.

Grupo J: Ibid, benzonidazol, ciprofloxacina e zidovudina.

Grupo K: Ibid, benzonidazol, ciprofloxacina e praziquantel

Grupo L: Ibid, zidovudina, ciprofloxacina e praziquantel

Grupo M: Ibid, benzonidazol, zidovudina e praziquantel.

Grupo N: Ibid, benzonidazol, ciprofloxacina, zidovudina e praziquantel.

Os esquemas terapêuticos utilizados em cada etapa estão apresentados na Tabela 1 e organograma (Figura 3)

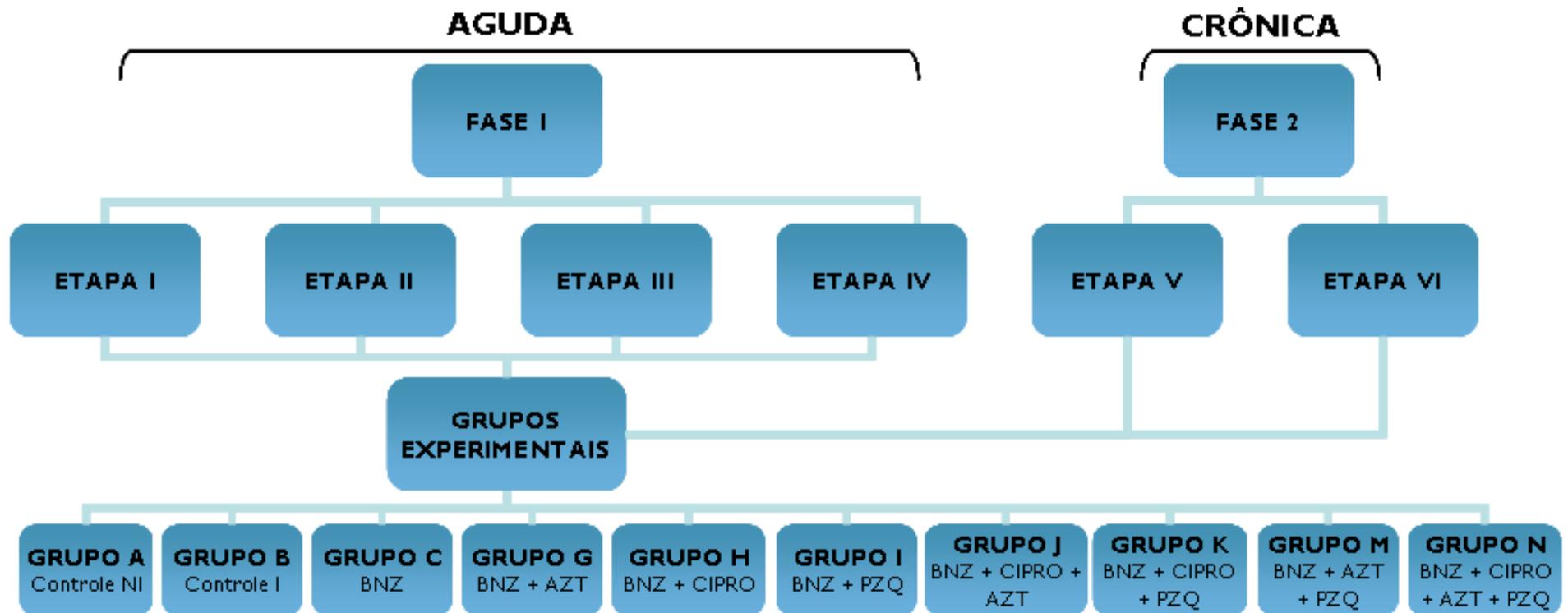


Figura 3. Esquema utilizado do tratamento multidrogas da doença de Chagas experimental. Foram analisadas amostras biológicas dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* nas fases aguda e crônica. Sendo quatro etapas da fase aguda e duas da crônica. Cada etapa foi constituída de 10 grupos com 20 camundongos. Cada grupo (A, B, C, G, H, I, J, K, M e N) representa diferentes associações de benzonidazol (BNZ), com zidovudina (AZT), ciprofloxacino (CIPRO) e praziquantel (PZQ), NI-não infectado; I infectado não tratado.

IV. 8.2. - Curvas de peso e sobrevida

Estas observações foram realizadas durante o período de tratamento. Assim, os grupos pertencentes à etapa IV foram avaliados por 15 dias, da III e V por 30 dias e das etapas I, II e VI, por 60 dias.

Registrou-se o número de mortes durante 30, 60 e 120 dias de infecção. A mortalidade foi indicada pela relação entre o número de animais mortos e o total de camundongos inoculados em cada grupo.

IV.8.2.1. - Análise parasitológica e sorológica das fases I e II do tratamento multidroga da doença de Chagas experimental

As etapas de tratamento foram concluídas de acordo com o esquema proposto. Os camundongos foram sacrificados com 30, 60 e 120 dias após o final do tratamento. Foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca, para hemocultura e sorologia. Os animais foram necropsiados e amostras de tecidos (coração, intestino delgado, músculo esquelético, baço) foram coletadas para extração de DNA e posterior análises histopatológicas.

IV. 8.2.3 - Hemocultura

A hemocultura foi realizada segundo a técnica descrita por Chiari e cols. (1989) com modificações devido ao pequeno volume de sangue coletado dos camundongos por punção cardíaca. Foram semeados em média 0,5 mL de sangue em meio LIT, enriquecido com àgar sangue.

IV. 9. - Diagnóstico Imunológico

IV. 9.1 - ELISA

Foi utilizado o teste de ELISA para confirmação imunológica da infecção. O antígeno solúvel de *T. cruzi* foi obtido por congelamento e descongelamento de

formas epimastigotas crescidas em meio LIT e utilizado na concentração de 0,2 µg para cada um dos 96 poços da placa (LIMBRO/USA), de acordo com a técnica descrita por Voller e cols. (1975).

As placas foram sensibilizadas com o antígeno diluído em tampão carbonato pH 9,6, a 4 °C, por 12 h. Após três lavagens com PBS-*Tween* a 0,05% (*Phosphate Buffered Saline* pH 7.0), os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-leite desnatado a 2 %, por 1 h. Após duas lavagens com PBS-*Tween* foram adicionados os soros diluídos 1//100 e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Seguiram-se mais três lavagens com PBS-*Tween* e foi então adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase, produzido em cabra (SIGMA/USA), por mais 2 h.

A revelação da placa foi feita mediante utilização de tampão citrato, pH 5.0, contendo H₂O₂ a 30 % e 20 µg do substrato OPD (SIGMA-USA). Após o aparecimento da coloração amarela, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4N. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de microplacas Synergy HT, (ByoSystems/USA), no comprimento de onda 490 nm. Foi considerada positiva a densidade óptica maior que 0.064 nm e negativa a leitura abaixo deste limite (*cut-off*).

IV.10. - Diagnóstico Molecular

IV.10.1. - Obtenção do material experimental

Os animais das etapas I a VI foram sacrificados aos 30, 60 e 120 dias após o final do tratamento. Amostras de sangue, coração, intestino delgado, músculo esquelético, baço foram coletadas. Uma parte do tecido foi emblocada em parafina, e aguarda análises histopatológicas. O restante dos tecidos foi estocado a -80° C em DMEM contendo 20% de DMSO (dimetilsulfóxido), com o objetivo de preservação do tecido para extração de DNA.

IV.10.2. - Extração de DNA genômico dos camundongos

Os tecidos foram processados de acordo com o método descrito por Sambrook e cols. (2001). Após a laceração dos tecidos com auxílio de tesoura e bisturi ou ainda trituradores de vidro com auxílio de pistilo, os tecidos foram adicionados em 2 mL de tampão de extração (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1M EDTA pH 8.0, 0,5% SDS,). Após 1 h de incubação a 37 °C, foi adicionado proteinase K em uma concentração final de 100 µg/mL e prosseguiu-se a incubação por mais 12 h. Os tecidos foram submetidos a duas extrações com igual volume de clorofane (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico; proporção 25: 24: 1) seguida de uma extração com igual volume de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico; proporção 24: 1), à temperatura ambiente agitando por inversão. As fases orgânicas e aquosas foram separadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 min. O DNA foi precipitado com 1: 10 (v/v) de acetato de sódio 3 M pH 4.7 e 2.5V de etanol absoluto gelado e, após 30 min de incubação a - 80 °C, foi sedimentado a 12000 rpm a 4 °C por 15 min. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado. Após secar todo o etanol foi ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 e RNase 200 µg/mL). O DNA foi analisado por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose 1 % e estocado a 4 °C.

IV.10.3. - Extração do DNA de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT e colhidas por centrifugação a 1.500 rpm por 15 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com PBS, ressuspenso em tampão de lise na concentração de 5×10^7 células por mL de solução, em tampão de lise e incubado por 1 hora a 37 °C. Após a incubação, foi adicionada proteinase K (100 µg/mL), seguida por incubação por mais 12 h a 37 °C. A partir desta etapa, foram realizados dois tratamentos com clorofane (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico; na proporção de 25: 24: 1) e uma com clorofil (Clorofórmio: Álcool Isoamílico; na proporção de 24: 1). O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e com 1:10 volumes de acetato de sódio 3 M, pH 4,7. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70%, gelado. Após secar todo o etanol, foi ressuspenso no tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH

8.0) e RNase 200 µg/mL. O DNA foi analisado e quantificado por espectrofotometria (Sambrook e Russel, 2001) e mediante visualização em agarose a 0,8%, após eletroforese em tampão TAE 1X (Tris base / Ácido acético glacial /EDTA 0.5 M pH 8.0). Alíquotas do DNA foram estocadas a 4 °C.

IV.10.4. - Quantificação do DNA

O método espectrofotométrico de quantificação de DNA é utilizado para determinar a concentração e pureza de ácidos nucleicos em uma solução.

As amostras de DNA genômico extraído dos tecidos dos camundongos foram analisadas para avaliação de sua qualidade e integridade e quantificadas em gel de agarose 0.8%, em tampão TAE 1X. Além disso, a quantificação do DNA também foi feita por meio de método espectrofotométrico, conforme descrito por Sambrook e Russel, (2001). Para a quantificação das amostras foi usado um espectrofotômetro, UV-1601 *Visible Spectrophotometer Shimadzu Corporation/USA*. O DNA foi analisado na absorvância UV entre 260 a 280 nm – Diluição de 1:100.

IV.10.5. - Eletroforese

A migração eletroforética do DNA em gel de agarose foi realizada em sistema de gel submerso em tampão TAE 1X. O gel, na concentração de 1,0 %, foi preparado em TAE 1X. As amostras e um padrão de massa molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen) foram aplicados em tampão de amostra para DNA (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%). O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70 a 110 V) com amperagem constante.

IV.10.6. - Reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando primers de β -actina

A qualidade das amostras de DNA foi avaliada mediante a amplificação do gene constitutivo da β -actina, utilizando para isso *primers* desenhados na região

descrita por Rossi e cols. (1994). Pares de *primers*: de β -actina foram usados para amplificação da seqüência molde; BAS de seqüência: 5' ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3'; BAA de seqüência: 5' CGT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'. As amplificações foram padronizadas nas seguintes condições: 100 ng de DNA de camundongo como molde e os reagentes do kit de PCR da INVITROGENTM; tampão de reação (50 mM de KCL, 20 Mm de Tris-HCL pH 8.4, 50 mM de MgCl₂), 10 mM de cada primer, 0.2 mM de dNTPs e 1 U/ μ l de Taq DNA polimerase. Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador modelo Mycycler da Bio- Rad.

Programa da β -actina:

	95°C / 5 min	
	95°C / 30 seg	
30 ciclos	{	60°C/ 30 seg
		72°C / 1 min
		72°C / 5 min
	4°C	

A presença de um produto de aproximadamente 800 pb indica a eficiência da reação de PCR. Dessa forma, as amostras foram utilizadas como molde nas reações de PCR seguintes.

IV.10.7. - Amplificação de seqüências de kDNA e nDNA de *T. cruzi*

Com a intenção de se amplificar o DNA nuclear (nDNA) e DNA mitocondrial (kDNA) do *T. cruzi* dos tecidos de camundongos foram utilizados os *primers* TcZ1/2 que amplificam uma região de microssatélite com repetições in tandem (Moser e cols. 1989) e um par de *primers* (S35/36) de kDNA que foram produzidos a partir de regiões conservadas dos minicírculos (Sturn e cols. 1989). As seqüências dos *primers* de kDNA utilizados foram: S35: 5'ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC 3'; S36: 5'GGT TCG ATT GGG GTT GGT G 3'. As seqüências dos *primers* que amplificam DNA nuclear são: TcZ1: 5'GAG CTC TTG CCC CAC ACG GGT GCT 3'; TcZ2: 5'CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC ACG 3'. As amplificações de seqüências de kDNA e DNA nuclear de *T. cruzi* foram realizadas em triplicata nas

seguintes condições: foram utilizadas 100 ng de DNA de camundongo como molde e os reagentes do kit de PCR da INVITROGEN™; tampão de reação (50 mM de KCL, 20 mM de Tris-HCL pH 8.4, 50mM de MgCl₂), 10 μM de cada *primer*, 0.2 mM de dNTPs e 1.5 U/μl de *Taq* DNA polimerase. Foram incluídos em todas as reações os devidos controles, negativo e positivo, que consistiram na utilização de DNA de tecidos de camundongo normal ou de 100 pg de DNA de *T. cruzi*. Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador modelo Mycycler da Bio- Rad.

Programa do TcZ:

30 ciclos { 95°C / 5 min
95°C / 30 seg
68°C / 30 seg
72°C / 1 min
72°C / 5 min
4°C

Programa do kDNA:

35 ciclos { 95°C / 5min
95°C / 30 Seg
60°C / 1 min
72°C / 1 min
72°C / 5 min
4°C

Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio. Depois estes produtos foram transferidos para uma membrana de nylon e hibridizados com sondas radiomarcadas específicas.

IV.10.8 - Southern blot

Após separação eletroforética, o DNA foi transferido para uma membrana de nylon Biodyne B (INVITROGEN™) através da técnica de transferência alcalina, segundo Sambrook e cols. (2001). A técnica consiste em utilizar uma solução desnaturante (NaOH 0.4 M) que, por capilaridade, transfere o DNA do gel de agarose para a membrana. Após a transferência, o DNA foi fixado pela secagem da membrana e esta foi guardada à temperatura ambiente até a sua utilização.

IV.10.9. - Marcação de fragmentos de DNA

Os produtos de PCR obtidos com 10 ng de DNA de *T. cruzi* nas reações de PCR que utilizaram os primers TcZ1/2 e S35/36 foram purificados e serviram como sonda no procedimento de marcação utilizando o Kit *Random Primer Labelling System* (INVITROGEN™). O procedimento de marcação consiste na inserção de [α -³²P] dATP na seqüência da fita de DNA molde sintetizada pela atividade polimerásica da enzima Klenow, mediante presença de *primers* hexaméricos aleatórios. A reação foi realizada como descreve o fabricante do Kit: 30 ng de DNA em um volume final de 25 μ l foram desnaturado a 100°C por 10 min, depois colocado no gelo. Foram adicionados 2 μ l de dCTP, 2 μ l de dGTP e 2 μ l de dTTP; 15 μ L de tampão, 3 μ l de [α -³²P] dATP (3000 μ Ci) e 1 μ l de *Klenow*. A reação procedeu durante incubação por 3 h a 25 °C e foi interrompida pela adição de 5 μ l de tampão de parada.

IV.10.11. - Purificação das sondas radiomarcadas

As sondas foram purificadas por cromatografia em coluna Sephadex G50 (Sambrook e cols. 2001) e a incorporação radioativa foram confirmadas através de cintilografia. As sondas foram usadas dentro dos limites de concentração de 1 a 2 x 10⁶ cpm/mL de solução de hibridização e as atividades específicas obtidas foram sempre >10⁸ cpm/ μ g de DNA.

IV.10.12 - Hibridização

As membranas foram pré-hibridizadas durante 4 h a 65 °C em solução contendo PEG 800 10 %, SSPE 1,5 % e SDS 7 %, de acordo com a sugestão do fabricante da membrana Byodine B (GIBCO-BRL™). As sondas desnaturadas foram adicionadas à solução e a hibridização procedeu por mais 12 h a 65 °C. As lavagens das membranas foram realizadas com graus crescentes de estringência, com o objetivo de remover a sonda que não se ligou fortemente à membrana. Foram feitas duas lavagens com SSC 2 X /0.1% SDS, a 65 °C, por 15 min. seguidas de duas lavagens com SSC 0.1X /0.1% SDS, a 65 °C, por 15 min. As membranas úmidas eram revestidas em filme plástico de PVC e expostas em um cassete metálico com filme (KODAK T-MAT™) sensível a raios X, e incubadas a - 80°C. A exposição variou de 12 h a sete dias e então os filmes foram revelados.

IV.11. - Analise Estatística

Foram realizados testes estatísticos, visando a análise de variância entre os resultados obtidos das amostras pertencentes aos diferentes grupos e etapas.

Foi efetuado a ANAVA (one way ou IC – Intrinsecamente casualizado).

V- RESULTADOS

V.1. - Avaliação da concentração e toxicidade das drogas utilizadas

Foram avaliados nos grupos D - ziduvodina, E - ciprofloxacina e F- praziquantel a concentração ideal e toxicidade das drogas que seriam utilizadas no esquema multidrogas. Cada droga foi administrada em cada camundongo infectado agudamente com o *T. cruzi*. Foram observados efeitos adversos, como diarreia, perda de peso, atrofia musculares de membros posteriores e mortalidade. Após administração de drogas utilizadas na concentração proporcionais às utilizadas em humanos. As concentrações foram diminuídas, até a padronização da dose ideal que não mais provocou alteração clinicas.

V.2. - Avaliação pré-clínica

Os animais que utilizaram o esquema multidrogas, foram monitorados diariamente e as alterações como letargia, perda de pelo, ou aspecto arrepiado, foram anotadas. Ao final do período pós-tratamento, quando os animais foram necropsiados, o aspecto dos órgãos internos também foi observado. Achado de cardiopatia foi observado em alguns dos animais pertencentes às tapas IV, V e VI, como demonstrado na (Tabela 2 e na Figura 4).

Tabela 2. Presença de cardiopatia nos grupos experimentais.

Grupos	Etapa IV		Etapa V		Etapa VI	
	60 dpt*	120 dpt	60 dpt	120 dpt	60 dpt	120 dpt
B					X	X
C	X	X				
G			X			
H	X	X				
I	X	X				
J	X	X	X		X	
K					X	
M	X	X	X		X	
N				X		

*dpt: dias pós-tratamento

Grupos: B, Infectados e sem tratamento; C, Infectados e tratados com benzo; G, Infectados e tratados com benzo e azt; H, Infectados e tratados com benzo e cipro; I, Infectados e tratados com benzo e pzq; J, Infectados e tratados com benzo, cipro e azt; K, Infectados e tratados com benzo, cipro e pzq; M, Infectados e tratados com benzo, azt e pzq; N, Infectados e tratados com benzo, cipro, azt e pzq.

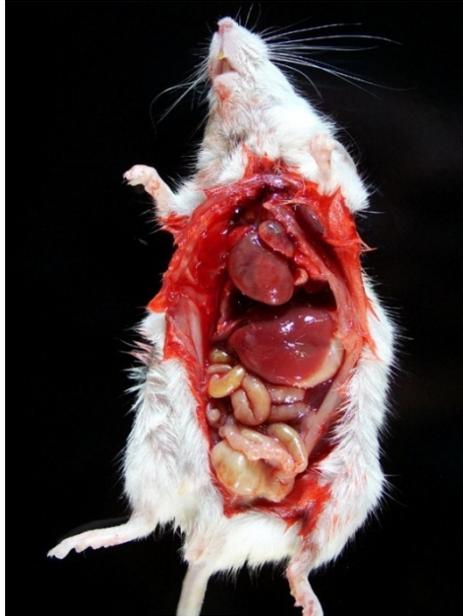


Figura 4: Camundongo BALB/c, inoculado com *T. cruzi* na fase crônica da doença apresentando cardiomegalia.

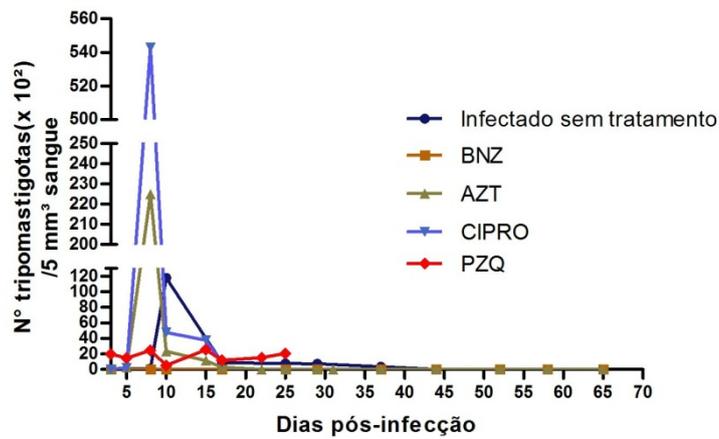
V.3. - Curvas de parasitemia

As curvas de parasitemia foram realizadas pelo método de Brener (1962), a partir do 5º dia pós-infecção, com grupos pertencentes à etapa I da fase aguda. Os testes estatísticos utilizados não tiveram sensibilidade para detectar diferenças significativas entre as amostras de camundongos tratados e o grupo de infectados e não tratados. Porém, os dados demonstram tendência à diminuição do número de parasitos circulantes nos grupos que receberam tratamento, como demonstrado na (Figura 5).

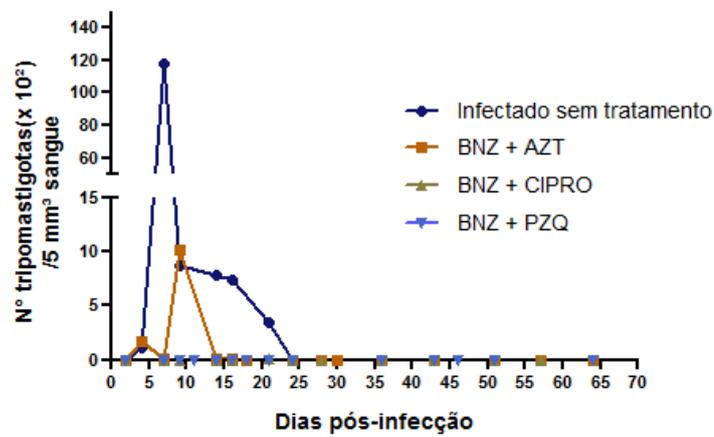
V.4 - Curvas de peso e sobrevivência durante o tratamento dos grupos estudados

A avaliação do peso apresentou pequenas variações nas diferentes etapas, como demonstrado nas (Figuras 6 e 7). Em alguns grupos, foi observado um ganho de peso esporádico, como o grupo N da etapa II, que se normalizou no 20º dia. As curvas de sobrevivência sugerem que os animais tratados apresentaram sobrevivência maior do que aqueles do grupo infectado e não-tratado, apesar dos testes estatísticos não detectarem significância ($p=0,36$).

Etapa I - Tratamento com 1 medicamento



Etapa I - Tratamento com 2 medicamentos



Etapa I - Tratamento com 3 e 4 medicamentos

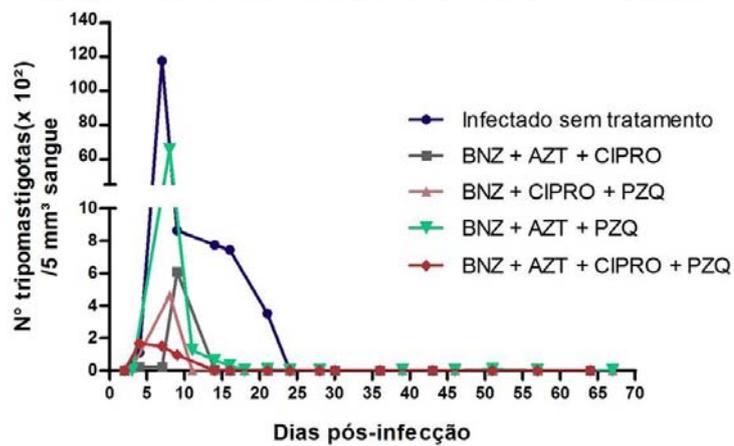


Figura 5: Curvas de parasitemia em camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas de *T. cruzi*, em diferentes grupos da fase aguda, tratados com 1 droga ou com associação de 2, 3 e 4 medicamentos, e no grupo controle.

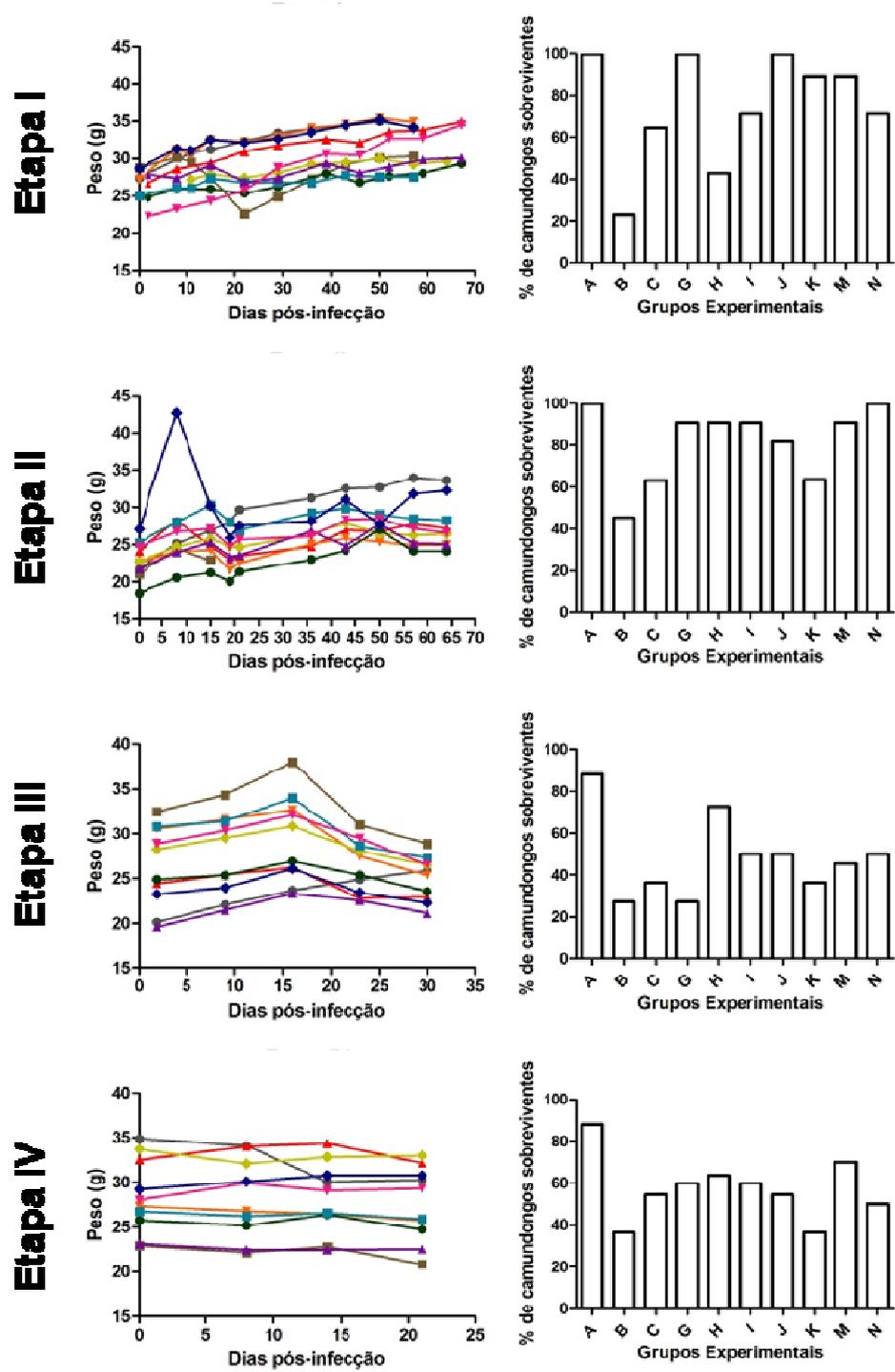


Figura 6: Curvas de sobrevivência de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas de *T. cruzi*, em diferentes grupos de camundongos submetidos a diferentes esquemas de tratamento multidrogas. Os gráficos com barras mostram sobrevivência dos animais dos diversos grupos, sem diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,36$).

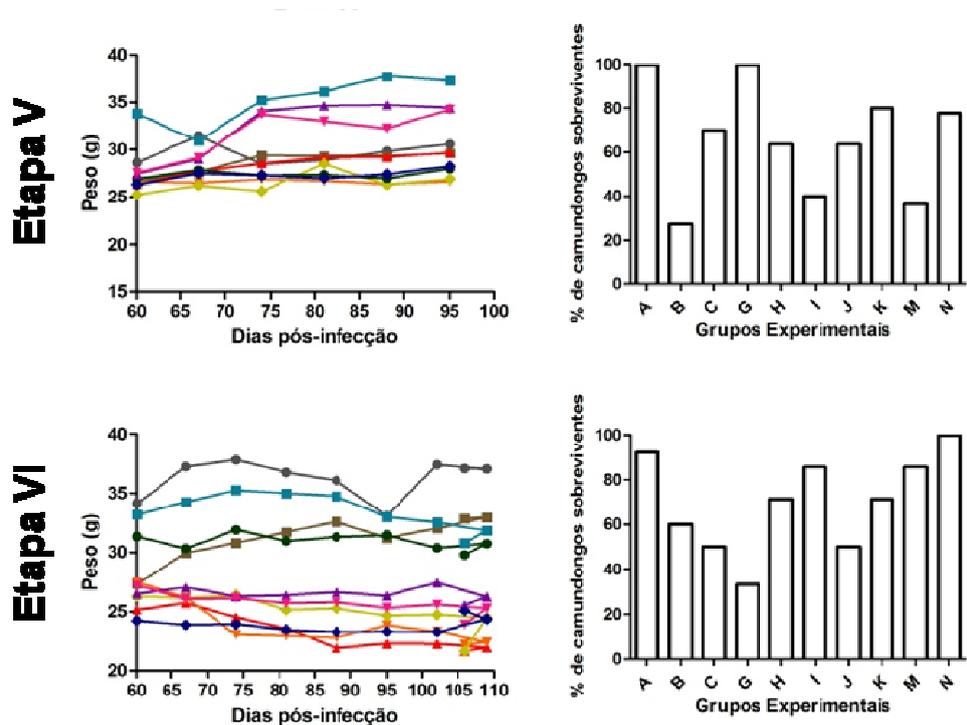


Figura 7. Curvas de sobrevivência de camundongos BALB/c, infectados com 10^3 formas de *T. cruzi*, em diferentes grupos de camundongos submetidos a diferentes esquemas de tratamento multidrogas. Os gráficos com barras mostram sobrevivência dos animais dos diversos grupos, sem diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,36$).

V-5.1. – Hemocultura

Foram realizados no mínimo quatro exames microscópicos do sobrenadante de cada hemocultura, com intervalos de 30 dias entre elas, durante um período de 120 dias. Os resultados estão apresentados na (Tabela 3), a seguir. Os dados apresentados referem-se aos resultados obtidos pela análise das hemoculturas de amostras de sangue de camundongos coletadas 30, 60 e 120 dias após o término do tratamento. Quando uma das hemoculturas exibia crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* o resultado foi considerado positivo (POS). Apenas quando as três amostras não mostravam a presença do parasito o resultado foi considerado negativo (NEG).

Tabela 3. Resultados de hemoculturas nas fases I e II do tratamento multidrogas da doença de Chagas experimental.

Etapas	Fase I				Fase II	
	I	II	III	IV	V	VI
Grupo A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Grupo B	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo C	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo G	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo H	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS
Grupo I	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo J	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo K	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo M	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo N	POS	POS	POS	POS	POS	POS

Grupos: A, Controle; B, Infectados e sem tratamento; C, Infectados e tratados com benzo; G, Infectados e tratados com benzo e azt; H, Infectados e tratados com benzo e cipro; I, Infectados e tratados com benzo e pzq; J: Infectados e tratados com benzo, cipro e azt; K: Infectados e tratados com benzo, cipro e pzq; M, Infectados e tratados com benzo, azt e pzq; N, Infectados e tratados com benzo, cipro, azt e pzq.

V.5.2. - REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)

As PCRs foram realizadas a partir de amostras de DNA extraídos de *pool* de tecidos, coletados 30, 60 e 120 dias após o término do tratamento dos camundongos. Para cada amostra foram realizadas três reações.

Todas as amostras dos grupos experimentais da fase I apresentaram bandas positivas de seqüência de DNA nuclear de *T. cruzi* nos tecidos coletados exceto, como era de se esperar, no controle sem infecção, grupo A. (Figura 8)

Nos grupos experimentais da fase II, apenas amostras de DNA de camundongos dos grupos H e J na etapa V não apresentaram amplificação para DNA nuclear de *T. cruzi*.

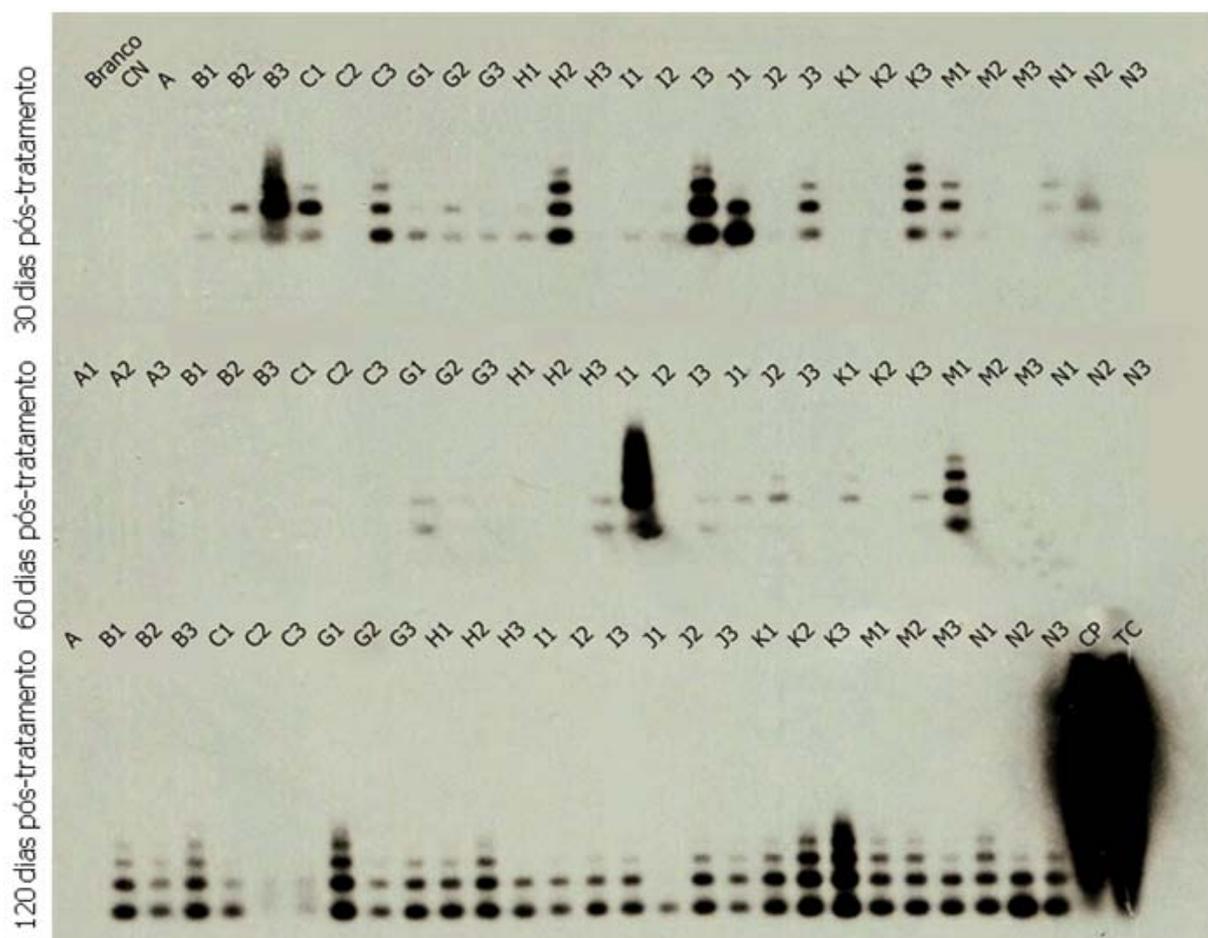


Figura 8: Produtos específicos de nDNA de amostras de tecidos de camundongos da etapa VI infectados com *T. cruzi* amplificados por PCR e hibridizados com sondas específicas TcZ1/2, BR-branco, CP-controle positivo; CN-controle negativo; Tc-controle positivo de cultura. Grupos A, Controle; B: Infectados e sem tratamento; C: Infectados e tratados com benzo; G: Infectados e tratados com benzo e azt; H, Infectados e tratados com benzo e cipro; I, Infectados e tratados com benzo e pzq; J, Infectados e tratados com benzo, cipro e azt; K, Infectados e tratados com benzo, cipro e pzq; M, Infectados e tratados com benzo, azt e pzq; N, Infectados e tratados com benzo, cipro, azt e pzq.

A amplificação específica de DNA nuclear de *T. cruzi* em apenas uma das amostras já era o critério utilizado para considerar o resultado final como positivo (POS). O resultado foi considerado negativo (NEG) quando todas as reações de PCR não amplificavam. (Tabela 4)

Tabela 4. Análise parasitológica por PCR das fases I e II do tratamento multidrogas da doença de Chagas experimental*.

Etapas	Fase I				Fase II	
	I	II	III	IV	V	VI
Grupo A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Grupo B	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo C	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo G	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo H	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
Grupo I	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo J	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
Grupo K	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo M	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Grupo N	POS	POS	POS	POS	POS	POS

Grupos: A, Controle; B, Infectados e sem tratamento; C, Infectados e tratados com benzo; G, Infectados e tratados com benzo e azt; H, Infectados e tratados com benzo e cipro; I, Infectados e tratados com benzo e pzq; J, Infectados e tratados com benzo, cipro e azt; K, Infectados e tratados com benzo, cipro e pzq; M, Infectados e tratados com benzo, azt e pzq; N, Infectados e tratados com benzo, cipro, azt e pzq.

*Amplificação específica de DNA nuclear de *T. cruzi* em apenas uma das amostras foi o critério utilizado para considerar o resultado final como positivo (POS). O resultado foi considerado negativo (NEG) quando todas as reações de PCR não amplificavam.

As reações de PCR, com *primers* específicos para kDNA só foram realizadas nas amostras onde houve discrepância entre os dados de hemocultura e PCR com *primers* nucleares (TcZ1/2), ou para os grupos onde todos os exames foram negativos com as técnicas parasitológicas utilizadas. Para cada reação foram

utilizadas amostras referentes a coletas de matérias nos tempos 30, 60 e 120 dias pós- término do tratamento, utilizando-se num total de nove animais por grupo.

V.5.3. - REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA - ELISA

As amostras de sangue coletadas antes da necrópsia dos animais foram divididas para hemocultura e sorologia, o soro separado por centrifugação e armazenados sob refrigeração. Os soros foram diluídos 1/100 e o conjugado anti-camundongo (*Sigma*-USA) utilizado na concentração de 1/5.000. Todas as amostras provenientes dos camundongos infectados se mostraram positivas, sendo que as amostras do grupo H da etapa V, com 30 dias e 60 dias foram positivas, e a de 120 dias estava com absorvância limítrofe, em relação ao *cut-off*, obtido para estas reações.

Em resumo, os resultados mostram que houve concordância, entre as técnicas parasitológicas que demonstram diretamente o parasito, com as técnicas que acusam o parasito indiretamente pela presença dos anticorpos específicos, e com as reações de PCR que, todas elas, foram negativas apenas no grupo H, tratado com benzonidazol e ciprofloxacina na concentração maior das drogas, que foram tratados pelo período de 30 dias

Os resultados referentes a este grupo estão representados na (Tabela 5) com acréscimo dos dados sorológicos que mostram queda nos títulos de anticorpos, sugerida pela diminuição das absorvâncias, visto que no teste ELISA o *cut-off* de D.O = 0,064 nm com desvio padrão $\pm 0,010$, separava o grupo controle dos grupos testes.

Tabela 5. Análise comparativa entre as técnicas de hemocultura, PCR e ELISA, do grupo H da etapa V, amostras obtidas de camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi*, tratados com associação de benzonidazol 43 mg/kg/dia e ciprofloxacina 60 mg/kg/dia, por 30 dias.

ETAPA V - GRUPO H			
Dias/final do tratamento	30	60	120
HEMO	NEG	NEG	NEG
PCR-TcZ	NEG	NEG	NEG
PCR-kDNA	NEG	NEG	NEG
ELISA	POS 0.123	POS 0.106	BD 0.071

NEG=negativo; POS= positivo; BD= *Bordeline*.

VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O tratamento etiológico da doença de Chagas tem sido alvo de muitas investigações, provavelmente porque a busca da cura desta doença seja um objetivo de alta relevância social (Lauria-Pires e cols. 2007). A literatura citada mostra um conjunto de observações sugerindo a possibilidade de o tratamento produzir benefícios para o paciente e melhora do prognóstico de sobrevivência. Porém, outros sugerem que foi impossível identificar benefícios oriundos do tratamento com a droga de escolha, ou seja, o benzonidazol. Ademais, diante dos efeitos colaterais da droga e das dificuldades relacionadas com os critérios para se avaliar a cura terapêutica, envolvendo métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares, talvez seja tarefa prioritária a sistematização dos procedimentos para avaliação do tratamento e cura das infecções pelo *T. cruzi*. A ausência de sistematização dos procedimentos, explicaria a ocorrência de vários relatos com diferentes conclusões. Existe apenas um ponto de consenso: ainda não temos a droga ideal ou o esquema terapêutico ideal para tratamento da doença de Chagas.

O conhecimento ainda limitado sobre a patogênese da doença crônica com as lesões características tem levado ao questionamento sobre a relevância do tratamento antiparasitário e de sua importância no manejo clínico da doença (Zhang e Tarleton, 1999; Lauria-Pires e Castro, 2007). Os estudos que implicaram autoimunidade como fator importante na patogênese da doença jamais excluiu a persistência do parasito no hospedeiro humano (Tarleton, 2003) e, portanto, seria de esperar que o tratamento efetivo da doença de Chagas possa trazer benefício, evitando recrudescimento dos mecanismos imunes de agressão ao miocárdio. Desde então, também existe consenso a respeito da necessidade de desenvolver esquemas terapêuticos verdadeiramente eficientes, capazes de eliminar o parasito, o que também ajudaria a interromper as reações auto-imunes que sustentam as lesões graves que se associam com a morte do chagásico (Urbina e Docampo, 2003).

Os camundongos quando foram tratados somente com o benzonidazol, houve supressão dos parasitos circulantes. Este resultado corrobora os de Bahia-Oliveira (2000) e de Viotti e cols. (1994), sugerindo que pacientes chagásicos crônicos tratados com benzonidazol não alcançaram cura parasitológica, mas tiveram redução significativa na ocorrência de alterações eletrocardiográficas e menor frequência de deterioração das condições clínicas.

Na maioria dos grupos de camundongos chagásicos que receberam esquemas diferentes de tratamento com coquetel de drogas, foi observada uma queda da parasitemia, os testes de PCR com *primers* de DNA nuclear foram positivos. Estes dados demonstraram a ineficácia terapêutica do esquema multidrogas utilizado. Apesar de não trabalharem com multidrogas, os trabalhos de Braga e cols. (2000); Lauria-Pires e cols. (2000); Urbina e Docampo, (2003), também demonstraram a ineficácia dos medicamentos nitroderivados tripanocidas, principalmente na atividade antiparasitária, reforçando a necessidade de novos protocolos.

Em contrapartida, no presente estudo, o grupo de camundongos tratados com benzonidazol e ciprofloxacina durante 30 dias teve negatização da parasitemia e da hemocultura. Ademais, os títulos de anticorpos decresceram e os testes de PCR com *primers* de DNA nuclear e kDNA, também foram todos negativos. Nós

achamos que estes dados são promissores, pois indicam a eficácia terapêutica e a inibição da integração de seqüência de minicírculos de kDNA. Esse dado precisa ser reavaliado, pois há possibilidade de esclarecer o efeito redutor da carga parasitária, na tentativa de definir tratamento com um coquetel de drogas, visando à cura da doença crônica.

Os resultados do grupo H, etapa V corrobora os resultados obtidos por Nitz (2004) e por Rosa (2005) que utilizaram drogas tripanocidas associadas às drogas inibidoras de vias metabólicas específicas impediriam a integração do kDNA no genoma da célula hospedeira *in vitro*. Os resultados obtidos neste grupo são promissores porque foi verificada eliminação da parasitemia e a não detecção de kDNA, em consequência da inibição da sua integração com os inibidores administrados. Porém, o objetivo de erradicar a parasitemia não foi obtido na maioria dos esquemas testados e, desde este ponto de vista, houve falha terapêutica em praticamente todos os esquemas testados, exceto no grupo H da fase II. Consideramos que a qualidade desses achados no grupo H podem estar correlacionados com a concentração ótima dos medicamentos utilizados (benzonidazol 43 mg/kg/dia = 0,86 mg/cam/dia; ciprofloxacina 60 mg/kg/dia = 1,20 mg/cam/dia), tratados diariamente por 30 dias, uma vez que, esses resultados não foram obtidos com concentração 50% inferior daquelas drogas, durante 60 dias, nos camundongos da etapa VI.

Por outro lado, verificamos falha terapêutica na maioria dos grupos estudados que receberam benzonidazol em associação com zidovudina e praziquantel, com ou sem ciprofloxacina. Nesses grupos não houve cura parasitológica, porém houve diminuição da parasitemia pela hemocultura em todos os grupos, e o prognóstico teria melhorado apesar de estatisticamente não ser significativo, sugerindo uma maior sobrevivência, quando comparado com os grupos controles infectados e não tratados. Esses resultados confirmam a necessidade de continuar nesta linha de pesquisa, com algumas possibilidades de avanço na quimioterapia específica da doença de Chagas: A) O tratamento poderia impedir a carga de mutações que se acumulam no decorrer das infecções crônicas, podendo agravar os mecanismos imunes de auto-agressão e doença. B) O caso do grupo H tratado com benzonidazol mais ciprofloxacina é promissor, pois, há possibilidade de otimizar as posologias e

tempo de administração das drogas visando aos resultados efetivos de cura parasitológica. C) Existem outros medicamentos potencialmente promissores que deverão ser testados, possibilitando abrogação completa das lesões e conseqüentemente da patogênese associada à destruição do coração chagásico.

Tecnicamente, o Ministério da Saúde, Agências de Fomento à Pesquisa e as Fundações de Apoio à Pesquisa, têm neste trabalho informação suficiente para definição de investimentos em novas modalidades de tratamento visando à cura do Mal de Chagas.

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aprofundar o conhecimento sobre o ciclo de vida do *T. cruzi* e seu mecanismo de diferenciação e replicação é uma das estratégias que se tem seguido com a finalidade de encontrar alvos para drogas úteis no tratamento da infecção. Além disso, procuram-se drogas que tenham efeitos colaterais reduzidos e que sejam de boa tolerância a fim de possibilitar o cumprimento do tratamento prescrito para o paciente chagásico. A utilização de drogas inibidoras de alvos associados com processos de interações parasito-hospedeiro, visando a interromper seu ciclo de vida e a patologia, é a meta que se procura alcançar. Entrementes, a pesquisa deve continuar em busca dessa droga ideal. Quando essa droga antiparasitária for obtida, então, será possível avaliar a importância de impedir as mutações de kDNA introduzidas no genoma do animal que teve a parasitemia erradicada, com objetivo de evitar a instalação de lesões que dependem de reações auto-imunes.

VIII. BIBLIOGRAFIA

ABAD-FRANCH F AND MONTEIRO FA. **Molecular research and the control of Chagas Disease Vectors.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, V 77(3): 437-454, 2005.

ADAD S J, ETCHEBEHERE R M, ARAÚJO J R, MADUREIRA A B, LIMA V G, SILVA AA, EDUARDO C. **Association of chagasic megacolon and cancer of the colon: case report and review of the literature.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35, p. 63-68, 2002.

AMATO NETO V, SHIKANAI YASUDA MA, AMATO WS. **Doença de Chagas aguda.** Em: DIAS, JCP AND COURA, JR (orgs). **Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 127-134, 1997.

ANDRADE LO AND ANDREWS NW. **The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention.** *Nature Reviews Microbiology*, 2005.

ARAÚJO PA. **Transferência vertical horizontal de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para células germinativas** *Dissertação*, Universidade de Brasília, 2008.

ARGAÑARAZ ER. **Integração de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em elemento L1 no genoma da célula hospedeira.** *Tese*, Universidade de Brasília, 1996.

ÁVILA JL, ÁVILA A, MUNOZ E, MONZON H. ***Trypanosoma cruzi*: 4 aminopyrazolo pyrimidine in the treatment of experimental Chagas' disease,** *Exp Parasitol*, 56:236-249, 1983.

BAHIA-OLIVEIRA LMG. **Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago.** *J. Infect Dis.* 182: 634-638, 2000.

BOCK M, HABERKORN A, HERLINGER H, MAYER KH, PETERSEN S. **The structure-activity relationship of 4-5' –nitrofufurylidene-amino-tetrahydro-4H-1,4-thiazine-1,1-dioxides active against *Trypanosoma cruzi*.** *Arzneim-Forsch.* V 22: 1564-1569, 1972.

BODLEY AL, SHAPIRO TA. **Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on *trypanosomes* and *Leishmania*.** *Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205-2185, USA.* 1995.

BONAMETTI AM, CASTELO-FILHO A, RAMOS ER, BALDY JLS, MATSUO T. ***Trypanosoma cruzi* infection in blood donor.** *Journal of public health.* V 0 32(6) : 566-571, 1998.

BOYCE HW, BAKHEET MR. **Sialorrhea: a review of a vexing, often unrecognized sign of oropharyngeal and esophageal disease.** *Journal of Clinical Gastroenterology.* V 39: 89-107, 2005.

BRAGA MS, LAURIA-PIRES L, ARGANARAZ ER, NASCIMENTO RJ, TEIXEIRA AR. **Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 42(3):157-61, 2000.

BRENER Z, CANÇADO JR, GALVÃO LMC, LUIZ ZMP, FILARD LS, PEREIRA MÊS, SANTOS LMT, CANÇADO CB. **An experimental and clinical assay with Ketoconazole in the treatment of Chagas disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 88:149-153, 1993.

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

BRENER Z. **Terapêutica experimental na doença de Chagas.** *In: trypanosoma cruzi e doença de chagas.* Editora Guanabara Hoogan. p, 379-388, 2000.

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

CANÇADO JR. **Standardization of protocols for chemotherapy of Chagas disease.** (*Working paper for discussion*) *workshop on the s Standardization of protocols for chemotherapy of Chagas disease.* Washington:UNDP/WORD BANK/WHO. Special programme for Research and training in tropical Disease. V 22-26, 1981.

CANÇADO JR. **Tratamento específico da doença de Chagas.** Em: Cançado, JR e Chuster, M (eds). *Cardiopatía Chagásica.* Belo Horizonte, Fundação Carlos Chagas, 327-355, 1985.

CHAGAS C. **Nova tripanossomíase. Morfologia e ciclo de vida do *Schyzotrypanum cruzi*, agente de uma nova doença humana.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, p. 159-218, 1909.

CHIARI E, DIAS JC, LANA M, CHIARI CA. **Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease.** *Rev Soc Bras Med Trop. Jan-Mar;* 22(1):19-23. 1989

CHIARI E. **Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods,** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;94 Suppl 1:299-300, 1999.

COURA JR. **Chagas disease: what is known and what is needed a background article.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*,102, Suppl 1.1:113-22, 2007.

DANTAS RO, MAMEDE RCM. **Esophageal motility in patients with esophageal caustic injury.** *Am J Gastroenterol*, 91: 1157-1161, 1996

de Medicina Tropical 28: 367-373,1995.

DIAS JCP AND COURA JR. **Epidemiologia.** Em: Dias, JCP e Coura, JR. (Eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.* Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 33-66,1997.

DIAS JCP AND COURA JR. **Epidemiologia**. Em: Dias, JCP e Coura, JR. (Eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 453-468, 1997.

DIAS JCP, LOYOLA CCP, BRENER Z. **Doença de Chagas em Minas Gerais: Situação atual e perspectivas**. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. V 37:7-28, 1985.

DIAS JCP. **Doença de Chagas: Clínica e Terapêutica**. SUCAN/Ministério da Saúde. Brasília, 1-90, 1990.

DIAS JCP. **Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agentes de enfermidades transmitidas por alimentos**. *Rev Soc. Bras. Med. Trop*, V 39(4): 370-375, 2006.

DIAS JCP. **Reseña histórica de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y reflexiones sobre algunos aspectos políticos y sócio-económicos de La endemia em El contexto latino americano**. *Rev Feder Argent Cardiol*. V 29: 129-135, 1988.

DIAS JCP. **Situación actual de la enfermedad de Chagas em Iãs Américas**. Em: Madoery, R; Madoery, C; Câmera, ML (orgs). *Actualizaciones em la Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires, Congresso Nacional de Medicina, 1-29, 1993.

DIAZ DE TORANZO EG, CASTRO JÁ, FRANKE DE CAZZULO BM, CAZZULO JJ. **Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi***. *Experientia*, V 44: 880-881, 1988.

DOCAMPO R AND STOPPANI AOM. **Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi***. *Arch Biochem Biophys*, V 197: 317-321, 1979.

ENGEL JC, DOYLE PS, HSIEH I, MCKERROW JH. **Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection**. *J.Exp.Med.*, V 188: 725-734, 1998.

ENGEL JC, DOYLE PS, PALMER J, HSIEH I, BAINTON DF, MCKERROW JH. **Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultra structure and function in *Trypanosoma cruzi*.** *J. Cell Sci.*, V 111: 597-606, 1998.

FEIG LA. **The many roads that lead to RAS.** *Science*, V 260: 767-768, 1993.

FERNANDES L C, BASTOS I, LAURIA-PIRES L, ROSA AC, TEIXEIRA AR, GRELLIER P, SCHREVEL J, SANTANA JM. **Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigote-secreted oligopeptidase B.** *Microbes Infect.*, 7,p. 375-384, 2005.

FERREIRA RC, IANNI BM, ABEL LC, BUCK P, MADY C, KALIL J, CUNHA-NETO E. **Increased plasma levels of tumor necrosis factor alpha in asymptomatic “indeterminate” and Chagas disease cardiomyopathy patients.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, V 98: 407-411,2003.

FILARDI LS AND BRENER Z. **A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** *Ann Trop Med Parasitol*, 76: 293-297, 1982.

GADELHA AAM, VERÇOSA AFA, LORENA VMB, NAKAZAWA M, CARVALHO AB, SOUZA WZ, FERREIRA AGP, SILVA ED, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, GOMES YM. **Chagas’ disease diagnosis comparative analysis of recombinant ELISA and the haemagglutination test.** *Vox Sanguinis*. V 85: 165-170, 2003.

GOMES CC. **Lesões típicas da doença de Chagas em aves com genoma alterado por interações de seqüências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*.** Tese, Universidade de Brasília, 2006.

GONZALES-PERDOMO M, DECASTRO SL, MEIRELLES MNSL, GOLDENBERG S. ***Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II Inhibitors.** *Antimicrob Agents Chemother*, 34:1707-1714, 1990.

GRÜNBERG E, BESKIND G, CREELAND R. **Antiprotozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazol derivatives.** *Antimicrob Agents Chemother*, V 0: 513-519, 1968.

HECHT MM. **Transferência horizontal de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de chagásicos e herança vertical das mutações.** Tese, Universidade de Brasília, 2008.

JUNQUEIRA ACV, DEGRAVE W, BRANDÃO A. **Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations.** *Trends in Parasitology*. V 21(6): 270-272, 2005.

KLINGBEIL MM AND ENGLUND PT. **Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication.** *PNAS*, V 101(13): 4333-4334, 2004.

LARANJA FS, DIAS E, NÓBREGA MD, MIRANDA A. **Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic and Pathological Study.** *Circulation*, V 14:1035-1060, 1956.

LARANJA FS. **Aspectos clínicos da moléstia de Chagas.** *Rev Brasil Med*, V 10: 482-491, 1953.

LAURIA-PIRES L AND CASTRO CN. **Tratamento.** Em: *Doença de Chagas e Evolução*. 1ª Edição, Editora UnB, 167-180, 2007.

LAURIA-PIRES L, BRAGA MS, VEXENAT AC, NITZ N, SIMÕES-BARBOSA A, TINOCO DL, TEIXEIRA AR. **Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V 63: 111-118, 2000.

LAURIA-PIRES L, CASTRO CN, EMANUEL A, PRATA A. **Ineficácia do allopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas.** *Rev. Soc Bras Med Trop*, 21: 79, 1988.

LAZARD K, URBINA JÁ, DE SOUZA W. **Ultrastructural alterations induced by ICI 195, 739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against**

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. *Antimicrob. Agents Chemother*, 35: 736-740, 1991.

LEIBY DA, HERRON RM, READ EJ, LENES BA, STUMPF RJ. ***Trypanosoma cruzi*** in Los Angeles and Miami blood donors: impact of involving donors demographics on soroprevalence and implication for transfusion transmission. *Transfusion*. V 42: 549-555, 2002.

LENT H, WYGODZINSKY P. **Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease**. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, V 163: 125-520, 1979.

LEWINSOHN R. **Do caldo de cana ao suco de açaí (parte I)**. *J. UNICAMP*, V 283(2): 11-17, 2005.

LIU Y AND ENGLUND PT. **The dynamics of Kinetoplast DNA replication**. *Mol. Microbiol.* V 64: 676-690, 2007.

LOPES ER AND CHAPADEIRO E. **Doença de Chagas no triângulo Mineiro**. *Rev Goiania Med*, V 32:109-113, 1986.

LU H-G, ZHONG L, DE SOUZA W, BENCHIMOL M, MORENO SN, DOCAMPO R. **Ca⁺² content and expression of na acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi***. *Mol Cell Biol*, V 18, 1988.

MACEDO VO. **Forma indeterminada da doença de Chagas**. Em: Dias JCP, Coura JR (eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 135-152, 1997.

MAYER M, AND ROCHA LIMA H. **Zur Entwicklung von *Schizotrypanum cruzi* in Saengatieren**. *Arch Schisffs u Tropen Hyg* 16: 90-94, 1912.

MCCABE RE, ARAÚJO FG, REMINGTON JS. **Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model**. *Am J Trop Med Hyg*, 32:960-962, 1983.

MEDEMA R, H KOPS, GJP BOS JL, BURGERING BMT. **AFX-like forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27.** *Nature* 404, 783-787, 2000.

MENEGHELLI UG, PERIA FM, DAREZZO FM, ALMEIDA FH, RODRIGUES CM, APRILE LR, DANTAS RO. **Clinical, radiographic, and manometric evolution of esophageal involvement by Chagas' disease.** *Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.*

MOLINA J, MARTINS-FILHO O, BRENER Z, ROMANHA AJ, LOEBENBERG D, URBINA JA. **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.*; V 44(1): 150–155, 2000.

MOSER DR, KIRCHHOFF LV, DONELSON J. **Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol.* V 27: 1477-1482, 1989.

MS- Ministério da Saúde- www.saude.gov.br- Acesso em: julho de 2008.

MUÑOZ P, THIERMANN E, ATIAS A, SCH CA. **Enfermedad de Chagas congênita sintomática em recién nacidos y lactantes.** *Rev Chil Pediatr.* V 63: 196-202,1992.

NITZ N, GOMES C, ROSA AC, SOUZA-AULT MR, MORENO F, LAURIA-PIRES L, NASCIMENTO RJ, TEIXEIRA AR. **Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease.** *Cell.* V 118 (2): 174-186, 2004.

NITZ N. **Evidência de transferência horizontal de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para o genoma de coelhos chagásicos.** *Tese, Universidade de Brasília, 2001.*

NÓBREGA OT. **Vol. Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, 2001.**

PINTO AY, VALENTE AS, VALENTE VC. **Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement.** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. V 8: 454-460, 2004.

POLAK A AND RICHLE R. **Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole.** *An trop Med Parasitol*. V 72: 45-54, 1978.

PORTELA-LINDOSO AAB AND SHIKANAI-YASUDA MA. **Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction.** *Revista de Saúde Pública*. V 37 (1): 107-115, 2003.

PRATA A. **Clinical and epidemiological aspects of chagas disease.** *Lancet infectious Diseases*. V 1, 92-100, 2001.

RAIMONDI A, WERNSTEDT C, HELLMAN U, CAZZULO JJ. **Degradation of oxidized insulin A and B chains by the major cystine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes.** *Mol. Biochem. Parasitol*, V 49: 341-344, 1991.

ROSA AC. **Inibição da transferência de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para a célula hospedeira : aspectos básicos e aplicados da pesquisa.** Tese, Universidade de Brasília, 2005.

ROSSI G, ALBERTIN G, BELLONI A, ZANIN L, BIASOLO MA, PRAYER-GALETTI T, BADER M, NUSSODOFER GG, PALU G, PESSINA AC. **Gene expression, location, and characterization of endothelin A and B receptors in the human adrenal cortex.** *The Journal of Clinical Investigation*, 94(3): 1226-1234, 1994.

SAMBROOK J AND RUSSEL DW. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Nova Iorque, Editora Cold Spring Harbor, 3ª Edição, 2001.

SANTOS AH, SILVA IG, RASSI A. **Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial, em chagásicos crônicos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 28: 367-373, 1995

SCHARFSTEIN J, SCHMITZ V, MORANDI V, CAPELLA MM, LIMA AP, MORROT A, JULIANO L, MULLER-ESTERL W. **Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors.** *J.Exp. Med.* V 192:1289-1300, 2000.

SCHENONE H, IGLESIAS J, SCHENONE S, CONTRERAS MC. **Infección chagásica congênita de segunda geration.** *Bol Chil Parasitol*, V 42: 71-73, 1987.

SCHMUNIS G, BITTENCOURT AL, AZOGUE E, LORCA M, SARAZUA WM. **Transmissão congênita.** *Rev Soc Bras Med Trop*, V 27:57, 1994.

SCHMUNIS GA. **Tripanossomíase americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação.** Em: Dias, JCP e Coura, JR (Eds). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.** Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 11-28, 1997.

SIMÕES-BARBOSA A, ARGAÑARAZ ER, BARROS AM, ROSA AC, ALVES NP, LOUVANDINI P, D'SOUZA-AULT MR, NITZ N, STURM NR, NASCIMENTO RJ, TEIXEIRA AR. **Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (8): 833-43, 2006.

SIMÕES-BARBOSA A, BARROS AM, NITZ N, ARGAÑARAZ ER, TEIXEIRA AR. **Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 94 (1): 249-252, 1999.

SOUZA W. **O parasito e sua interação com os hospedeiros.** Em: *Trypanossoma cruzi* e doença de chagas. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 89-122, 2000.

STEIN L. **Chemoterapeutischen Versuche bei der Chagas Krankheit (*Schizotrypanum cruzi*).** *Zeitsch f Immunitasforsch.* V 80:1-15, 1993.

STOPPANI AO. **The chemotherapy of Chagas disease.** *Centro de Investigaciones Bioenergéticas*, Facultad de Medicina-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 59 Suppl 2:147-65, 1999.

STORINO R AND BARRAGÁN H. **Epidemiología.** Em: Storino, R and Milei, J (eds). *Enfermedad de Chagas.* Buenos Aires, Editora Mosby, 51-74, 1994.

STORINO R AND MILEI J. **Evolución natural longitudinales. Enfermedad de Chagas.** Buenos Aires, Editora Mosby, 593-604, 1994.

STURN NR, DEGRAVE W, MOREL C, SIMPSON L. **Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplastide minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease.** *Mol Biochem Parasitol.* V 33: 205-214, 1989.

TARLETON RL. **Chagas disease: a role for autoimmunity.** *Trends Parasitol.* 19: 447-451, 2003.

TEIXEIRA ARL, ARGANARAZ ER, FREITAS LH, LACAVA Z, SANTANA JM, LUNA H. **Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection.** *Mutat Rev.* V 305 (2): 197-209, 1994.

TEIXEIRA ARL, CÓRDOBA JC, SOUTO-MAYOR I, SOLÓRZANO E. **Chagas disease: Lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* V 43:146-158, 1991.

TEIXEIRA ARL, LACAVA Z, SANTANA JM, LUNA H. **Insertion of *Trypanosoma cruzi* DNA in the genome of mammal host cell through infection.** *Rev Soc Bras Med Trop.* V 24 (1): 55-58, 1991.

TEIXEIRA ARL, NASCIMENTO RJ, STURM NR. **Evolution and pathology in Chagas Disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz,* V 107: 463-491, 2006.

TEIXEIRA ARL, NASCIMENTO RJ, STURM NR. **Evolution and pathology in Chagas Disease.** Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* V 101 (5): 463-491, 2006.

TEIXEIRA ARL, SILVA R, CUNHA NETO E, SANTANA JM, RIZZO LV. **Malignant, non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi* - infected rabbits with nitroarenes.** *Journal of Comparative Pathology*. V 103: 37- 48, 1991.

URBINA JA AND DOCAMPO R. **Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances.** *Trends in Parasitol*. 19: 495-500, 2003

URBINA JÁ, LAZARD K, AGUIRRE T, PIRAS MM, PIRAS R. **Antiproliferative effects and mechanism of action of ICI 195, 739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *cruzi*.** *Antimicrob. Agents Chemother*, 35:730-735, 1991.

URBINA JÁ, LAZARD K, MARCHA E, VISBAL G, AGUIRRE T, PIRAS MM, PIRAS R, MALDONADO RA, PAYARES G, DE SOUZA W. **Mevimolin (Lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of Ketoconazole and Terbinafine against *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*)*cruzi* invitro and in vivo studies.** *Antimicrob. Agents Chemother*, 37:580-591, 1993.

URBINA JÁ, PAYARES G, MOLINA J, SANOJA C, LIENDO A, LAZARD K, PIRAS MM, PIRAS R, PEREZ N, WINCKER P, RYLEY JF. **Cure of short and long-term experimental Chagas' disease using DO870.** *Science*, 273: 969-971, 1996.

VEXENAT AC. **Diagnóstico sorológico diferencial de infecções causadas por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Viannia) brazilliensis*, *Leishmania chagasi* e outras doenças crônicas.** *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, 1993.

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

VOLLER A, DRAPER C, BIDWELL DE, BARTLETT A. **A microplate enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease.** *Lancet*, 1: 426-429, 1975.

WENDEL S. **Doença de Chagas transfusional**. Em: *Dias, JCP, Coura, JR (Eds) Clínica e terapêutica da doença de Chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 411-428, 1997.

WHO. **Control of Chagas Disease. Second report of a WHO expert committee**. *WHO Technical Report Series*, V 905, 2002.

WOOLSEY AM, SUNWOO L, PETERSEN CA, BRACHMANN SM, CANTLEY LC, BURLEIGH A. **Novel PI3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation**. *Journal of Cell Science* V 0: 1-116, 2003.

ZHANG L, AND TARLETON RL. **Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas disease**. *J. Infec. Dis.* 180: 480-486. 1999.

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](#)