



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
ÁREAS DE CONCENTRAÇÃO: PARASITOLOGIA, IMUNOLOGIA E MICROBIOLOGIA

MÁRDEN ESTÊVÃO MATTOS JÚNIOR

**INFLUÊNCIA DO PARASITO E DO HOSPEDEIRO NO
POTENCIAL PATOGÊNICO DAS POPULAÇÕES DO *Trypanosoma
cruzi* I NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

UBERABA

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MÁRDEN ESTÊVÃO MATTOS JÚNIOR

**INFLUÊNCIA DO PARASITO E DO HOSPEDEIRO NO
POTENCIAL PATOGÊNICO DAS POPULAÇÕES DO *Trypanosoma
cruzi* I NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (área de concentração II: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob orientação da Prof^ª. Dra. Eliane Lages da Silva.

UBERABA

2010

M391i Mattos Júnior, Márden Estêvão

Influência do parasito e do hospedeiro no potencial patogênico de populações de *Trypanosoma cruzi* I na fase aguda da infecção experimental em camundongos / Márden Estêvão Mattos Júnior. - - 2010.

115 f. : tab. ; graf. ; fig.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2010.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliane Lages Silva

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Variabilidade genética. 3. Comportamento biológico. 4. Tropismo tecidual. I. Título. II. Silva, Eliane Lages.

MÁRDEN ESTÊVÃO MATTOS JÚNIOR

**INFLUÊNCIA DO PARASITO E DO HOSPEDEIRO NO
POTENCIAL PATOGÊNICO DAS POPULAÇÕES DO *Trypanosoma
cruzi* I NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (área de concentração II: Parasitologia, Imunologia e Microbiologia) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob orientação da Prof^ª. Dra. Eliane Lages da Silva.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Eliane Lages Silva – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Prof^ª. Dr^ª. Mônica Lucia Gomes
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^ª. Dr^ª. Marlene Cabrine dos Santos Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

UBERABA

2010

“... em cada época podemos viver uma vida interessante e útil. O indispensável é não desperdiçarmos a vida e podermos dizer: “Fiz o que pude”. Aqui está tudo quanto o mundo tem o direito de exigir de nós, é a única coisa que nos dará um pouco de felicidade.”

Marya Sklodowska Curie (1867-1934)

À Nídia Modesto Veludo, por sua irreverência insubstituível e pela maneira como enxergava a vida, nos fazendo refletir a todo o momento mesmo durante sua ausência, através dos recados deixados por debaixo da porta do inconsciente...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida;

À minha orientadora, professora Eliane Lages Silva, pela paciência e compreensão materna, essencial para o meu amadurecimento profissional;

Ao professor João Carlos Pinto Dias, pela dedicação à pesquisa médica fazendo-me acreditar na ciência;

Ao professor Luis Eduardo Ramirez, pela experiência e sabedoria doada em momentos importantes;

Ao professor Valdo José Dias da Silva, pelas aulas inesquecíveis de bom senso e seu amor à ciência que contagia a todos;

Aos meus pais (Márden Estêvão Mattos e Lídia Maria Costa Mattos) que estiveram presente em todos os momentos, oferecendo-me sustentação para enfrentar os desafios;

Ao meu amigo Henrique, pelas manhãs, tardes e noites convertidas em pura solidariedade para com o nosso trabalho e à amizade;

À minha irmã Marianna e meu cunhado Alexandre, pela transmissão de boas e necessárias energias;

À Cláudia que esteve comigo em todos os momentos importantes da minha vida, transmitindo todo amor e toda cumplicidade possível de maneira insubstituível.

À Virgínia que sempre foi e sempre será importante na minha vida;

À Eliane que sempre esteve presente me auxiliando nos afazeres do dia a dia, tornando minha vida mais prática e alegre;

À Maria Alice, Teté, Giordano, Lívia, Neto, Tânia, Dona Nídia, Regina, Ricardo, pela constante torcida e consideração;

À vovó Fia e vovô Kid, pelo apoio incondicional, carinho, e AMOR eterno;

Ao vovô João pela constante intercessão e a vovó Maria, pela grandeza de sua impressionante maneira de amar e transmitir este sentimento que contagia a todos;

Aos meus queridos tios Marco e Fátima, Virgíneo e Eliane, Joaquim e Rosilene, Euclides Júnior e Rose e Adriano pelas opiniões sensatas e necessárias no meu desenvolvimento como pessoa;

Aos meus queridos primos João Germano, Marquinho, Euclides José, Charles, Júlia, Jordana, Luiza, que sempre estiveram presentes transmitindo boas e necessárias energias;

Aos meus amigos João Eduardo, Maickel, Fabrício, Brunno e Paulo, sempre presentes nos momentos de descontração, e nas discussões em prol do nosso desenvolvimento pessoal e profissional ao longo de nossas vidas;

Aos meus amigos Lucas Felipe, Sharon, Priscila, Kênio, Leonardo, Amanda, Gabriel, Sandra, Elaine, Lara e César pelas discussões tão importantes durante todo o curso;

Aos meus indispensáveis colegas que doaram um pouco do seu tempo em momentos de necessidade, sendo de grande importância na realização desta tese: Beth, Patrícia, Mariana, Cristiane, Ana Cláudia, Marlene, Luciano, Cida, Cidinha, Poliana e Daniela;

Aos professores, Wendel, André, David, Virmondes, Cláudio, Aldo e Adriana, por acrescentarem mais conhecimento ao meu desenvolvimento profissional e pelas dicas sempre tão importantes.

RESUMO

As populações do *Trypanosoma cruzi* (Tc) apresentam elevada variabilidade biológica e genética e são classificadas em seis grupos TcI a TcVI. Atualmente, os dados referentes à patogenicidade do TcI são conflitantes e podem decorrer do componente genético do hospedeiro e da propagação ao homem de populações de *T. cruzi* restritas ao ambiente silvestre. Contudo, a inserção de novos vetores no ambiente doméstico possibilita o contato do *T. cruzi* silvestre com novos hospedeiros, elevando a variabilidade genotípica, modificando seu potencial patogênico. O estudo do comportamento biológico foi realizado utilizando grupos de 15 camundongos Swiss, e duas linhagens isogênicas Balb/c e C57BL/6, machos, que foram infectados via intraperitoneal com 1×10^4 tripomastigotas para a avaliação da infectividade, virulência, parasitismo sanguíneo e tecidual, patogenicidade, tropismo e variabilidade genética pela LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer* - PCR). Utilizou-se quatro amostras de *T. cruzi* isoladas de triatomíneos em diferentes regiões brasileiras devidamente criopreservadas em cultura e posteriormente reativadas, sendo os isolados ALVANI, AQ1-7 e MUTUM classificados como TcI e o isolado PV como TcIV. Em relação ao estudo biológico, os isolados de TcI apresentaram parasitemia subpatente, e uma variação no potencial patogênico e na infectividade acompanhado de baixa virulência na fase aguda pela sobrevivência de 100% dos animais. Os isolados ALVANI e AQ1-7 foram considerados patogênicos, porém, com baixa infectividade, ao passo que, MUTUM e PV (TcIV) evidenciaram elevada infectividade e baixa patogenicidade. O tropismo tecidual apresentado pelos isolados de TcI foi predominantemente por musculatura estriada e lisa, no entanto, o isolado PV demonstrou tropismo pelo coração. Os resultados relacionados ao componente genético demonstraram a existência de uma ampla variabilidade genética entre populações sanguíneas e teciduais, ao passo que, as populações do inóculo, sangue e cultura demonstraram uma importante homogeneidade intra-específica relacionada aos quatro isolados de *T. cruzi*, não evidenciando diferenças entre as linhagens de camundongos. As diferenças entre os isolados de TcI podem ser atribuídas à existência de populações polares associada com a ausência ou capacidade de produzir lesões. Estes fatores podem explicar as controvérsias clínicas encontradas nas infecções humanas pelo TcI em diferentes regiões endêmicas.

ABSTRACT

The populations of *Trypanosoma cruzi* (Tc) show high biological and genetic variability and are classified into six groups TcI - TcVI. Currently, data concerning the pathogenicity of the TcI are conflicting and may be due to host genetic component and spread to humans in populations of *T. cruzi* restricted to a wild environment. However, the insertion of new vectors in the domestic environment enables contact *T. cruzi* wild with new hosts, increasing the genotypic variability by modifying their pathogenic potential. The study of biological behavior was conducted using groups of 15 Swiss, Balb/c and C57BL/6 male mice that were infected intraperitoneally with 1×10^4 trypomastigotes to evaluate the infectivity, virulence, blood and tissue parasitism, pathogenicity, tissue tropism and genetic variability of the LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer* - PCR). We used four samples of *T. cruzi* isolates from triatomines in different Brazilian regions properly cryopreserved in culture and subsequently reactivated; isolates ALVANI, AQ1-7 and MUTUM classified as TcI and PV isolated as TcIV. In relation to the biological study, the TcI isolates showed parasitemia subpatent, and a variation in the infectivity and pathogenic potential followed by a low virulence in the acute phase by a 100% survival of animals. The isolates ALVANI and AQ1-7 were considered pathogenic, but with low infectivity, whereas, MUTUM and PV (TcIV) showed the high infectivity and low pathogenicity. The tissue tropism presenting by isolates of TcI was smooth and striated muscle, however, the isolated PV showed tropism for the heart. The results related to the genetic component demonstrated the existence of a large genetic variability among populations of blood and tissue, while the populations of the inoculum, and blood culture showed a significant intra-specific homogeneity related to the four isolates of *T. cruzi*, showing no differences between strains of mice. Most of the tissues analyzed inter-specific manner was grouped according to isolate analyzed showing the maintenance of characteristics within each population. TcI strains differences could be attributed to the polar populations associated with and without the capacity to produce lesions. These facts may explain the clinical controversies found in TcI human infections in different endemic regions.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Histórico	17
1.2 Aspectos Gerais	17
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.3.1 Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.3.2 Características genótípicas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.4 A doença de Chagas	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Animais	28
4.2 Amostras de <i>T. cruzi</i> e infecção experimental	28
4.3 Avaliação parasitológica	29
4.4 Reisolamento do parasito pela hemocultura	30
4.5 Avaliação da intensidade do processo inflamatório e tropismo tecidual	31
4.5.1 Coleta de tecidos	31
4.5.2 Histopatologia	32
4.6 Extração do DNA em amostras de sangue, cultura e tecidos.....	32
4.6.1 Extração do DNA em amostras de sangue	32
4.6.2 Extração do DNA em amostras de culturas	33
4.6.3 Extração do DNA de tecidos	34
4.7 Detecção e caracterização genética do <i>T. cruzi</i> a partir da PCR	34
4.7.1 Amplificação específica do <i>T. cruzi</i>	34
4.7.2 LSSP-PCR (<i>Low Stringency Single Specific Primer - PCR</i>)	35

4.7.3 Análise filogenética da variabilidade intra e inter-específica	36
4.8 Análise estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Avaliação da parasitemia pelo exame a fresco (EF) e microhematócrito (MH)...	38
5.2 Avaliação da parasitemia pela hemocultura	40
5.3 Avaliação do parasitismo tecidual pela PCR específica.....	42
5.3.1 Distribuição do parasitismo tecidual total de acordo com os isolados e a linhagem de camundongo	42
5.3.2 Distribuição do parasitismo tecidual de cada isolado do <i>T. cruzi</i> de acordo com as linhagens de camundongos	43
5.3.3 Distribuição da positividade da PCR tecidual na musculatura estriada, lisa e coração	45
5.3.4 Análise da capacidade infectante do <i>T. cruzi</i> I para camundongos pela detecção do parasitismo tecidual e sanguíneo	47
5.4 Avaliação histopatológica pela hematoxilina e eosina.....	49
5.4.1 Análise descritiva da análise histopatológica entre as linhagens de camundongos	49
5.4.2 Análise do processo inflamatório e parasitismo tecidual pela histopatologia....	56
5.5 Avaliação da variabilidade do kDNA dos isolados de <i>T. cruzi</i> I (ALVANI, MUTUM e AQ1-7) e <i>T. cruzi</i> IV (PV) pela técnica de LSSP-PCR	59
5.5.1 Perfis de LSSP-PCR dos inóculos	59
5.5.2 Análise comparativa entre as assinaturas gênicas dos isolados do <i>T. cruzi</i> em camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss	60
5.5.2.1 Amostras do isolado ALVANI	60
5.5.2.2 Amostras do isolado AQ1-7	62
5.5.2.3 Amostras do isolado MUTUM	64
5.5.2.4 Amostras do isolado PV	66
5.5.3 Variabilidade do kDNA das populações teciduais dos isolados do <i>T. cruzi</i> na linhagem Balb/c	68
5.5.4 Variabilidade do kDNA das populações teciduais dos isolados do <i>T. cruzi</i> na linhagem C57BL/6	70

5.5.5 Variabilidade do kDNA das populações teciduais dos isolados do <i>T. cruzi</i> na linhagem Swiss	72
5.5.6 Análise comparativa da variabilidade do kDNA das populações de <i>T. cruzi</i> do inóculo, sangue, culturas e tecidos de cada isolado nas três linhagens de camundongos	74
5.5.6.1 Amostras do isolado ALVANI	74
5.5.6.2 Amostras do isolado AQ1-7	76
5.5.6.3 Amostras do isolado MUTUM	78
5.5.6.4 Amostras do isolado PV	80
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	94
8 REFERÊNCIAS	96
ANEXO	111

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Acompanhamento da parasitemia dos isolados de TcI pelo exame a fresco (EF) e microhematócrito (MH) durante 30 dias de infecção.....39
- Tabela 2:** Detecção do parasitismo sanguíneo e tecidual do isolado PV (TcIV) de acordo com a linhagem de camundongo.....39
- Tabela 3:** Reisolamento das populações de TcI pela hemocultura no 15º dia de infecção de acordo com a linhagem de camundongo.....39
- Tabela 4:** Reisolamento das populações de TcI pela hemocultura no 60º dia de infecção de acordo com a linhagem de camundongo.....39
- Tabela 5:** Percentual da positividade tecidual total dos isolados de *T. cruzi* nas linhagens de camundongos pela PCR de acordo com os isolados. (*) $p < 0,001$, (#) $p < 0,005$44
- Tabela 6:** Distribuição tecidual do *T. cruzi* avaliado pela amplificação do kDNA e HE no coração, musculatura lisa, musculatura estriada e fígado/baço de acordo com o isolado do parasito e a linhagem do animal.....46
- Tabela 7:** Análise comparativa dos diferentes métodos de detecção da capacidade infectante das diferentes populações de TcI para camundongos, independente da linhagem.....48
- Tabela 8:** Análise comparativa dos diferentes métodos de detecção da capacidade infectante dos três isolados de *T. cruzi* I de acordo com as linhagens de camundongos.....48
- Tabela 9:** Distribuição do parasitismo tecidual dos isolados de *T. cruzi* avaliada pela PCR e HE e sua relação com a intensidade do processo inflamatório.....58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Curva de parasitemia após infecção pelo isolado de TcIV (PV) durante 30 dias, pelos métodos de exame à fresco e microhematócrito.....41
- Figura 2:** Análise comparativa da área sobre a curva de parasitemia do isolado PV entre as linhagens de camundongos a partir do método de *Bezout* (regra dos trapézios). (*) $p < 0,05$41
- Figura 3:** Produtos da reação de PCR tecidual utilizando os iniciadores 121 e 122 após amplificação em gel poliacrilamida 6,0%. 3-coração/Balb/c, 4-JGE/Balb/c, 5-músculo/Balb/c, 6-fígado/Balb/c, 7-coração/C57BL/6, 8-JGD/C57BL/6, 9-músculo/C57BL/6, 10-bexiga/C57BL/6, 11-fígado/C57BL/6, 12-JGE/C57BL/6, 13-coração/Swiss, 14-JIC/Swiss, 15-músculo/Swiss, 16-bexiga/Swiss, 17-fígado/Swiss, 18-JGD/Swiss, 19-Diafragma/Swiss. (MM - marcador molecular/100pb; 1 e 2 - controles negativos, JGE: Junção gastroesofágica; JGD: Junção gastroduodenal; JIC: Junção ileocecal).....43
- Figura 4:** Análise comparativa do parasitismo tecidual total dos isolados do *T. cruzi* detectado pela PCR nos diferentes órgãos nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss. (*) $p < 0,001$44
- Figura 5:** Fotomicrografias histológicas da musculatura estriada esquelética (íleo psoas) coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens (Swiss, Balb/c e C57BL/6) infectados com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) dos isolados AQ1-7 (*Triatoma sordida* - BA) e ALVANI (*Panstrongylus megistus* - MG). **A, B e C:** Músculo estriado esquelético com parasitismo e miosite intensa e difusa. **B e C:** Músculo esquelético com destruição de fibras musculares. **D, E e F:** Presença de ninhos de amastigotas no tecido muscular entre células do infiltrado inflamatório. Esse perfil histopatológico foi detectado nas três linhagens de camundongos infectados com o isolado AQ1-7 e nos animais C57BL/6 infectados com o isolado ALVANI, nesse caso, com ausência de parasitismo (Setas: ninhos de amastigotas).....51
- Figura 6:** Fotomicrografias histológicas do músculo estriado cardíaco (miocárdio) coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens Swiss, Balb/c e C57BL/6, na fase aguda da infecção com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) dos isolados AQ1-7 (*Triatoma sordida* - BA) e ALVANI (*Panstrongylus megistus* - MG). **G e H:** Região ventricular demonstrando parasitismo e infiltrado inflamatório intenso (epicardite e miocardite). **I e J:** Região atrial demonstrando infiltrado inflamatório intenso e difuso (miocardite). **L e M:** Infiltrado inflamatório intenso e difuso seguido de parasitismo na região ventricular e atrial respectivamente. Esse comportamento foi semelhante nas três linhagens de camundongos infectadas com o isolado AQ1-7, e naqueles da linhagem Swiss infectados com o isolado ALVANI (Setas: ninhos de amastigotas).....52

Figura 7: Fotomicrografias histológicas da musculatura lisa da bexiga coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens Swiss, Balb/c e C57BL/6 na fase aguda da infecção com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) dos isolados AQ1-7 (*Triatoma sordida* - BA) e ALVANI (*Panstrongylus megistus* - MG). **N e O:** Infiltrado inflamatório intenso e difuso, caracterizando-se como miosite. **P e Q:** Infiltrado inflamatório intenso e difuso. **R e S:** Infiltrado inflamatório difuso com desorganização de fibras musculares e parasitismo. Esse perfil histopatológico foi semelhante nas três linhagens de camundongos infectados com o isolado ALVANI e naqueles da linhagem Swiss infectados com o isolado AQ1-7 (Seta: ninho de amastigotas).....53

Figura 8: Fotomicrografias histológicas da musculatura esquelética, miocárdio e porção gastrointestinal, coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens Swiss, Balb/c e C57BL/6 na fase aguda da infecção com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) do isolado MUTUM (*Panstrongylus megistus* - MG) **T1 e T2:** Processo inflamatório discreto e focal na musculatura esquelética com ausência de parasitismo, porém, observa-se a preservação da arquitetura tecidual em grande parte do tecido. **U1 e U2:** Preservação da arquitetura tecidual cardíaca (atrial e ventricular) pela ausência de processos inflamatórios e parasitismo. **V1 e V2:** Miosites discretas e focais na porção gastroduodenal sem parasitismo. Este perfil histopatológico foi semelhante nas três linhagens de camundongos, sendo que, a linhagem Balb/c apresentou miocardites (ventriculares e atriais) discretas e focais.....54

Figura 9: Fotomicrografias histológicas da musculatura esquelética, miocárdio e porção gastrointestinal, coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens Swiss, Balb/c e C57BL/6 na fase aguda da infecção com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) do isolado PV (Humano - RO). **X1 e X2:** Processos inflamatórios discretos e focais na musculatura esquelética com ausência de parasitos. **W1 e W2:** Miocardites moderadas e focais tanto no átrio quanto no ventrículo, sendo mais acentuada na união atrioventricular, seguido de parasitismo. **Z1 e Z2:** Miosites discretas e focais nas porções, gastroduodenal e íleo-cecal, com ausência de parasitos dispersos no tecido. Este perfil histopatológico foi observado nas três linhagens de camundongos, ao passo que, na linhagem C57BL/6 não se observou parasitismo (Seta: ninho de amastigotas).....55

Figura 10: Parasitismo tecidual total referente às três linhagens de camundongos após análise histopatológica qualitativa (n = 6).....57

Figura 11: Média de intensidade do processo inflamatório no coração, junções intestinais, bexiga e musculatura esquelética nas três linhagens de camundongos, sendo considerado ausente (0), discreto (1), discreto a moderado (1,5), moderado (2,0) e moderado a intenso (3) (n = 6) (Chapadeiro, 1967).....57

Figura 12: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* presentes nos inóculos de cada isolado após análise pelo LSSP-PCR.....59

- Figura 13:** Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *T. cruzi* do isolado ALVANI no inóculo, sangue e tecidos (coração, músculo esquelético e bexiga) nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss.....61
- Figura 14:** Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *T. cruzi* do isolado AQ1-7 no inóculo, sangue e tecidos (coração, músculo esquelético e bexiga) nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss.....63
- Figura 15:** Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *T. cruzi* do isolado MUTUM no inóculo, culturas (15° e 60° dia) e tecidos (coração, músculo esquelético e junções intestinais) nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss.....65
- Figura 16:** Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *T. cruzi* do isolado PV no inóculo, culturas (15° e 60° dia), sangue e tecidos (coração, músculo esquelético e junções intestinais) nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss.....67
- Figura 17:** Fenograma referente às populações de *T. cruzi* dos quatro isolados nos tecidos da linhagem Balb/c após análise pelo LSSP-PCR.....69
- Figura 18:** Fenograma referente às populações de *T. cruzi* dos quatro isolados nos tecidos da linhagem C57BL/6 após análise pelo LSSP-PCR.....71
- Figura 19:** Fenograma referente às populações de *T. cruzi* dos quatro isolados nos tecidos da linhagem Swiss após análise pelo LSSP-PCR.....73
- Figura 20:** Fenograma referente às populações de *T. cruzi* do isolado ALVANI no inóculo, sangue e tecidos nas três linhagens de camundongos separadamente após análise pelo LSSP-PCR.....75
- Figura 21:** Fenograma referente às populações de *T. cruzi* do isolado AQ1-7 no inóculo, sangue e tecidos nas três linhagens de camundongos separadamente após análise pelo LSSP-PCR.....77
- Figura 22:** Fenograma referente às populações de *T. cruzi* do isolado MUTUM no inóculo, culturas e tecidos nas três linhagens de camundongos separadamente após análise pelo LSSP-PCR.....79

Figura 23: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* do isolado PV no inóculo, sangue, culturas e tecidos nas três linhagens de camundongos separadamente após análise pelo LSSP-PCR.....81

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Em 1908, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, médico e pesquisador do Instituto de Manguinhos (Instituto Soroterápico Federal/1900-07) no Rio de Janeiro, atualmente Instituto Oswaldo Cruz, preparava-se para mais uma expedição destinada ao controle da Malária em Lassance - Minas Gerais, no entanto, em um estudo paralelo, deparou-se com um novo *Trypanosoma* (*T. minasense*) parasitando um sagui (*Happale penicillata* ou *Callithrix penicillata*). A partir deste achado e da colaboração involuntária de Cornélio Homem Cantarino Mota (chefe de engenharia das obras da ferrovia entre Corinto e Pirapora), que lhe mostrou um inseto hematófago denominado regionalmente como barbeiro ou chupança, Carlos Chagas iniciou as investigações naquela que, posteriormente, seria uma das mais importantes doenças endêmicas do interior do país. Nas fezes destes insetos (*Conorhinus megistus* ou *Panstrongylus megistus*), Chagas, descobriu outro flagelado com morfologia distinta ao encontrado anteriormente e o nomeou de *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909), atualmente *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao ilustre epidemiologista Oswaldo Gonçalves Cruz, seu amigo e mestre. Meses depois, no Instituto Oswaldo Cruz, desvendou o ciclo de vida do protozoário no vetor, em pequenos mamíferos e, ao retornar a região de Lassance, detectou os primeiros casos da doença em humanos, que foi denominada por Miguel Couto, o então presidente da Academia Brasileira de Medicina, como “doença de Chagas” (Dias & Coura, 2008).

A descrição da doença de Chagas foi uma das maiores descobertas científicas uma vez que um mesmo pesquisador identificou o agente etiológico (*T. cruzi*), seu ciclo evolutivo, o inseto transmissor, o reservatório silvestre do *T. cruzi* (sagui e tatu galinha) e, ainda, as fases aguda e crônica da doença e suas manifestações clínicas.

1.2 ASPECTOS GERAIS

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana caracteriza-se como uma antropozoonose, e a partir de estudos geológicos, estima-se que há aproximadamente 15 mil anos iniciaram-se os primeiros focos endêmicos da doença pela colonização humana

no continente americano, apesar da pré-existência do agente etiológico *T. cruzi* (*Kinetoplastida, Trypanosomatidae*) a 150 milhões de anos (Briones *et al.*, 1999). Atualmente existem 8 milhões de indivíduos infectados em áreas endêmicas estendendo-se desde o sul da Argentina ao sul dos Estados Unidos, causando 14 mil óbitos anuais (WHO, 2007) e estima-se que 100 milhões estejam expostos à infecção em todo o continente (Weekly, 2007).

Os aspectos epidemiológicos atuais demonstram claramente o declínio da transmissão vetorial, atribuído aos programas de combate ao vetor e à urbanização. A certificação da Organização Pan-Americana de Saúde (Opas), em 2006, incluiu o Brasil como livre da transmissão pelo *Triatoma infestans*, assim como o Chile e Uruguai (WHO, 2007). Contudo, existem cerca de 130 espécies de triatomíneos com potencial para dar continuidade ao ciclo evolutivo da doença, das quais 52 descritas no Brasil (Coura & Dias, 2009), além de 100 espécies de reservatórios silvestres (marsupiais, morcegos, roedores, xenartros, lagomorphos, carnívoros, primatas) e domésticos (cães, gatos, ratos domésticos, camundongos, caprinos, suínos) susceptíveis à infecção natural pelo *T. cruzi* (Devera *et al.*, 2003; Coura & Dias, 2009). Pássaros, répteis e peixes não são infectados devido à síntese fisiológica de “lisinas” que destroem o parasito *T. cruzi* (Coura & Dias, 2009).

Em humanos, além do contágio através do contato com as fezes do triatomíneo contaminadas, pode haver infecções por transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos, transmissão congênita e, mais raramente, por ingestão de alimentos contaminados e acidentes laboratoriais (Dias, 2000). Apesar do declínio da transmissão vetorial, a forma de contágio via oral tem se tornado um problema em algumas regiões, principalmente na Amazônia brasileira. Mais de 50% dos casos agudos da doença de Chagas na região Amazônica entre 1968 e 2000, são atribuídos a microepidemias devido a esse tipo de transmissão (Coura *et al.*, 2002).

1.3 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário uniflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e agente etiológico da doença de Chagas.

Uma característica desta ordem é a presença do cinetoplasto, uma organela intracelular rica em DNA, equivalente a uma única mitocôndria que diferencia-se das células eucarióticas com localização específica entre as formas evolutivas do *T. cruzi*. A

mitocôndria do *T. cruzi* possui maior quantidade de material genético extracelular que qualquer outra mitocôndria eucariótica correspondendo a 15% do DNA total do parasito (Lukes *et al.*, 2002) sendo constituída de dois tipos de moléculas circulares e enoveladas, os maxicírculos e os minicírculos (kDNA).

Os maxicírculos possuem uma região conservada e uma variável, e funções semelhantes às do DNA mitocondrial de células eucariotas, codificando subunidades de enzimas como citocromo b, c e ATPsintase e genes que necessitam de modificação pós-transcricional por edição do RNA mensageiro (mRNA), codificando tanto o RNA ribossômico quanto proteínas necessárias para o desenvolvimento biológico e genético do parasito (Myler, 1993).

Os minicírculos estão envolvidos na formação de pequenos RNAs guias que fazem o controle da especificidade no processo de edição dos mRNA formados a partir dos maxicírculos, contribuindo para o enorme conteúdo e heterogeneidade no DNA mitocondrial do parasito, representando 95% das moléculas componentes sendo a maior parte do componente genético do kDNA com cerca de 5 a 10 mil minicírculos (Campbell *et al.*, 2003).

Os primeiros marcadores utilizados para a caracterização do *T. cruzi* foram a partir de análises eletroforéticas de isoenzimas, denominadas zimodemas ou MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), classificando o *T. cruzi* em zimodemas Z1, Z2 e Z3 (Miles, 1978).

O desenvolvimento de marcadores moleculares, tais como, a obtenção de esquizodemas a partir de perfis de restrição do kDNA, detecção de polimorfismo pelas técnicas de impressões digitais de DNA, LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer - PCR*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), cariotipagem e a variabilidade observada nos perfis de microssatélites, genes de rDNA, mini-exon e mitocondriais (Morel *et al.*, 1980; Sloof *et al.*, 1983; Sturm *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1991; Murthy *et al.*, 1992; Souto & Zingales, 1993; Vago *et al.*, 1996; Freitas *et al.*, 2006), permitiu estabelecer a variabilidade genotípica do *T. cruzi*, revelando características biológicas relacionadas à sua evolução genética evidenciando a importância desse tipo de estudo para a investigação do processo evolutivo e epidemiológico da doença de Chagas.

A hipótese sobre a evolução clonal proposta para o *T. cruzi* revela que populações com características genéticas e bioquímicas idênticas, possam vir a apresentar associações clínicas e epidemiológicas importantes (Tibayrenc & Ayala,

1991), porém, estudos demonstram que uma relação entre as formas clínicas dos pacientes chagásicos e os isolados de *T. cruzi* ainda não pode ser totalmente estabelecida (Lages-Silva *et al.*, 2001 e 2006).

Em áreas endêmicas os diversos contatos entre o parasito, vetores e os hospedeiros vertebrados propiciam o aparecimento de populações policlonais do *T. cruzi*. A multiclonalidade inerente ao *T. cruzi* pode interferir no potencial patogênico, na virulência e dificultar a classificação genotípica destas populações as quais podem ser selecionadas por fatores como a distribuição geográfica, exposição ao sistema imune e pelo *background* genético do hospedeiro (Bertoli *et al.*, 2006).

Dados na literatura divergem em relação à patogenicidade do *T. cruzi* entre as populações isoladas de ambientes silvestres e domésticos, sendo que alguns estudos relatam uma maior patogenicidade para isolados do ciclo doméstico (Fernandes *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2005; Lages-Silva *et al.*, 2006). A predominância do *T. cruzi* I, considerado silvestre, tem sido relatada em infecções agudas em humanos na Colômbia, México e Venezuela sendo nesse último associada a casos graves de miocardite aguda (Añes *et al.*, 2004; Mejía-Jaramillo *et al.*, 2009).

1.3.1 CICLO EVOLUTIVO DO *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* inicia seu ciclo biológico após o repasto sanguíneo pelo hospedeiro invertebrado que ingere as formas tripomastigotas circulantes que se transformam em formas multiplicativas epimastigotas e na região da ampola retal iniciam o processo de metaciclogênese.

Todo este processo culmina com o aparecimento das formas tripomastigotas metacíclicas, que parece ser ativado por interações hidrofóbicas entre o flagelo do parasito e a cutícula superficial do epitélio intestinal posterior do triatomíneo (Bonaldo *et al.*, 1988).

A metaciclogênese está relacionada a fatores ambientais que favorecem o surgimento de variações genotípicas que promovem mudanças na expressão gênica e, consequentemente, na síntese de proteínas e na morfologia do parasito. Fatores como saliva, enzimas digestivas, alterações de osmolaridade, pH e temperatura do compartimento intestinal, induzem a variações morfológicas no parasito. São observadas mais de 18 formas no hospedeiro invertebrado e estas alterações que também são influenciadas pelo próprio vetor, servem como parâmetro para se imaginar

que na relação parasito-hospedeiro possa haver indução de diferentes padrões na expressão gênica do *T. cruzi* (Kollien & Schaub, 2000).

O triatomíneo, no momento da hematofagia, ingere grande quantidade de sangue e simultaneamente realiza o processo de diurese liberando vários parasitos junto às excretas. A contaminação de mamíferos pode ocorrer após o contato com formas tripomastigotas metacíclicas depositadas na superfície lesada pela probóscida do vetor no momento da picada, ou por contato com mucosas.

1.3.2 CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DO *Trypanosoma cruzi*

Análises no cariótipo sugerem que o *T. cruzi* seja diplóide e que seu genoma está distribuído entre 20 e 40 pares de cromossomos homólogos, que geralmente diferem em tamanho. Pedroso *et al.* (2003) observaram distâncias filogenéticas entre os grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e híbridos baseados nos dados de variação do tamanho dos cromossomos e ainda demonstraram que o tamanho do genoma das cepas pertencentes ao *T. cruzi* I foi menor que o do *T. cruzi* II. Seu genoma foi sequenciado recentemente utilizando a cepa híbrida CL-Brener (El-Sayed *et al.*, 2005) estimando-se que possua entre 106,4-110,7Mb em média.

O parasito exhibe uma extensa diversidade genética e foi dividido anteriormente em duas linhagens genotípicas, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Isolados de TcI foram caracterizados e inseridos no zimodema Z1 (grupo 2 por 24S α rDNA e mini-exon) apresentando baixa parasitemia em humanos chagásicos, já os isolados de TcII, foram inseridos no zimodema Z2 (grupo 1 por 24S α rDNA e mini-exon) e causam infecções com alta parasitemia em áreas endêmicas clássicas (Zingales *et al.*, 1999; Pena *et al.*, 2009).

Entretanto, alguns isolados de *T. cruzi*, após a caracterização molecular, não foram agrupados nas duas linhagens consideradas puras, portanto, isolados indeterminados e de comportamento híbrido que possuíam características genotípicas tanto do grupo 1 quanto do grupo 2 pelo rDNA, foram inseridos no zimodema Z3 (Souto *et al.*, 1996; Stolf *et al.*, 2003).

Brisse *et al.* (2000b, 2001) através de análises de isoenzimas e RAPD, identificaram a subdivisão do taxon *T. cruzi* em seis linhagens ou DTU (*Discrete Typing Units*) I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe, sendo o DTU I correspondente à linhagem *T. cruzi* I e o DTU IIb correspondente à linhagem *T. cruzi* II. As sublinhagens IIb, IId, IIe

relacionam com ambientes domésticos, ao passo que, as sublinhagens IIa e IIc se relacionam com o ambiente silvestre (Brisse *et al.*, 2000b; Tibayrenc, 2003), sendo que a sublinhagem IIa está envolvida no aumento de casos agudos da doença de Chagas na Amazônia Brasileira, através da transmissão enzoótica, pela presença contínua de humanos no ambiente silvestre (Lewis *et al.*, 2009). De acordo com Freitas *et al.*, (2006), alguns isolados poderiam se agrupar tanto no grupo TcI quanto no TcII, determinando-os como populações híbridas (IIa, IId e IIe), e outros inconclusivos pertencentes ao zimodema 3.

Estudos recentes por Freitas *et al.* (2006), analisaram isolados de *T. cruzi* observando simultaneamente os perfis de amplificação de cinco *locos* de microssatélites do domínio divergente D7 do gene 24S α do rDNA e do gene mitocondrial (COII - subunidade II da enzima citocromo oxidase), e propuseram a existência de uma terceira linhagem principal do *T. cruzi*, denominada de *T. cruzi* III.

Recentemente, Zingales *et al.* (2009) estabeleceram uma nova nomenclatura referente à classificação do *T. cruzi*, recomendando-se a divisão das populações do *T. cruzi* em 6 DTU denominadas *T. cruzi* I, II, III, IV, V e VI, sendo as duas primeiras linhagens puras e as demais, híbridas, correspondentes aos DTU I, IIb, IIc, IIa, IId e IIe respectivamente (Brisse *et al.*, 2000a, 2001).

O ciclo do *T. cruzi* alterna-se entre hospedeiros invertebrados e vertebrados, no entanto, apenas o vetor invertebrado realiza a transmissão horizontal indireta em hospedeiros vertebrados. De acordo com a distribuição geográfica e a preferência dos insetos vetores por condições ambientais a eles favoráveis, definem-se dois ciclos, um silvestre e um doméstico/peri-doméstico.

O ciclo doméstico, representado por populações de *T. cruzi* II e as demais caracterizadas como híbridas (TcIV, TcV e TcVI), possuem maior variabilidade genética e maior patogenicidade, tendo o homem e animais do convívio humano como reservatórios (Tibayrenc, 2003; Zingales *et al.*, 2009). Isolados inseridos no *T. cruzi* III não são considerados causadores da doença de Chagas em humanos (Zingales *et al.*, 2009).

O ciclo silvestre, representado por populações denominadas de *T. cruzi* I, relaciona-se com espécies distintas de triatomíneos e pequenos animais, possuindo características mais homogêneas em relação ao componente genético e menor patogenicidade (Zingales *et al.*, 1999; Añes *et al.*, 2004). Herrera *et al.* (2007), subclassificaram a linhagem TcI em quatro haplótipos (a, b, c, d), baseando-se em

sequências de 56 nucleotídeos através da análise de microsátélites (posição 15-40), e posteriormente, análises filogenéticas associadas a regiões polimórficas do gene miniexon e constataram uma variabilidade intra-específica relacionada a polimorfismos de um nucleotídeo (SNP), que possivelmente, influencia processos pós-transcricionais no parasito, refletidos durante a tradução protéica (Falla *et al.*, 2009). Diante disso, determinaram características biológicas distintas entre os isolados de diferentes regiões, e observaram que o haplótipo Ia relaciona-se com vetores domiciliados e humanos, o haplótipo Ib, encontrado em infecções humanas, relaciona-se com vetores silvestres, o haplótipo Ic, não completamente caracterizado, possivelmente, insere-se no ciclo silvestre, e por fim, o haplótipo Id, parece estar inserido em ambientes silvestres relacionando-se com diferentes vetores e reservatórios como *R. prolixus* e *D. marsupialis* na Colômbia.

Estes achados revelaram a existência de constantes modificações genótípicas em populações de TcI na Colômbia, e estas modificações, possivelmente podem induzir mudanças no comportamento biológico do parasito, interferindo no potencial patogênico.

Estudos recentes demonstram que as diferentes populações podem circular em ambos ambientes (Fernandes *et al.*, 1998; Añes *et al.*, 2004), e que ambos, TcII e TcV, podem causar as formas cardíaca e digestiva (Zingales *et al.*, 2009).

O controle vetorial através do uso de inseticidas tem eliminado o *Triatoma infestans*, ocultando o ciclo doméstico e diminuindo a ação do *T. cruzi* II. No entanto, dados não publicados, realizados pelo nosso grupo têm evidenciado que outras espécies de vetores, como o *Panstrongylus megistus*, *Triatoma sordida* e *Triatoma brasiliensis*, participam ativamente dos ciclos silvestre e doméstico na região do Triângulo Mineiro, Bahia e Rio Grande do Norte respectivamente, observado também por Ramirez *et al.* (2002), que demonstrou a presença de *P. megistus* e *R. neglectus* na região do Triângulo Mineiro. Este fato, aliado ao contato mais intenso dos vetores e reservatórios silvestres com o ser humano sugerem que é possível introduzir cepas do *T. cruzi* I no ciclo doméstico da doença de Chagas. Estes isolados podem sofrer variações genótípicas em consequência a uma seleção natural devido ao contato com novos reservatórios, e possivelmente aumentando o potencial infectante e patogênico de populações isoladas de animais silvestres em relação às isoladas de humanos e triatomíneos (Bertoli *et al.*, 2006).

1.4 A DOENÇA DE CHAGAS

O mecanismo específico associado com o estabelecimento e a manutenção de diferentes formas clínicas na doença de Chagas é multifatorial, envolvendo ambos, parasito e hospedeiro (Dutra *et al.*, 2005). A razão pela qual a doença se desenvolve de forma grave em alguns indivíduos ou de maneira indeterminada, ainda não foi revelada.

Análises genótípicas em diferentes isolados de *T. cruzi* têm demonstrado que as populações são extremamente polimórficas (Tybayrenc *et al.*, 1993; Buscaglia & Di Noia, 2003). A presença de diferentes populações de parasitos tem sido correlacionada com as manifestações fisiopatológicas observadas nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas (Vago *et al.*, 2000), sugerindo que populações distintas geneticamente, exibem características próprias que determinam o tropismo tecidual e podem influenciar a evolução clínica da doença (Macedo *et al.*, 2004).

A doença humana apresenta muitas variáveis clínicas, e após a infecção, há uma pequena fase aguda caracterizada por uma elevada parasitemia e uma inflamação mononuclear focal devido à ruptura de células parasitadas, porém, com sintomatologia inespecífica dificultando o reconhecimento do contágio. A fase aguda inicia-se por volta do sexto dia após a infecção, sendo observada até dois meses (Miles, 2003). Nota-se a presença de sinais característicos como o sinal de Romanã e o chagoma de inoculação, normalmente observados como edemas localizados na face (região periorbital) e em outros locais onde a penetração do parasito possa ocorrer após o repasto sanguíneo.

Complicações neurológicas fatais e cardíacas na forma aguda, são observadas em apenas 5% dos casos (revisado por Macedo *et al.*, 2004), normalmente em crianças menores de dois anos de idade (Coura & de Castro, 2002).

A infecção evolui para uma fase crônica com escassa parasitemia e um curso clínico imprevisível, permanecendo entre 60% e 70% dos pacientes na forma indeterminada e com excelente prognóstico por toda vida, ou desenvolverem a forma sintomática com envolvimento cardiovascular e gastrointestinal em 25% a 30% dos casos (Prata, 2001), evoluindo para uma forma irreversível da doença com manifestações no miocárdio e no trato digestivo. A patologia cardíaca é caracterizada por uma miocardite crônica, iniciando-se por uma miocardite fibrosante focal e/ou difusa causada por ação direta do parasito, seus antígenos e a resposta inflamatória que frequentemente leva à cardiomegalia, falha cardíaca congestiva e arritmias podendo levar à insuficiência cardíaca e morte súbita (Tanowitz, 1992), tornando-se a primeira

causa de lesão cardíaca em adultos jovens economicamente ativos. A forma digestiva está presente em 6% a 10% dos casos nos quais ocorre dilatação do esôfago e do cólon (megaesôfago e megacólon respectivamente), decorrente de uma inflamação crônica e destruição progressiva principalmente dos neurônios parassimpáticos em sua maioria. A sintomatologia é caracterizada por disfagia e constipação severa, entretanto, 3% dos chagásicos poderão apresentar comprometimento do sistema nervoso periférico (Dias & Macedo, 2005).

Dados na literatura revelam que no infiltrado inflamatório de pacientes com forma cardíaca existe predomínio de células TCD8+ e reduzido número de células TCD4+ (Higuchi *et al.*, 1993a; Tostes *et al.*, 1994), esse dado associado com a diminuição do TCD4+ no sangue periférico de pacientes com formas avançadas de megaesôfago (Reis *et al.*, 1996) sugere que algum tipo de imunossupressão deve estar associada aos parasitismos sanguíneo e tecidual participando também na evolução das formas sintomáticas da doença de Chagas.

O tropismo tecidual parece ser determinado pelas subpopulações de linfócitos T presentes nos órgãos ou tecidos que possivelmente são organizados e ativados de maneira regional (Meis *et al.*, 2009). Experimentalmente, tem sido observado que o controle do parasitismo nos miócitos do coração é dependente de células TCD4+, e no fígado de células TCD4+ e TCD8+ (Russo *et al.*, 1996). Entretanto, regiões gênicas do MHC (Molécula de Histocompatibilidade) altamente polimórficas e relacionadas com diferentes processos imunológicos, podem estar envolvidas no tropismo tecidual em camundongos (Freitas *et al.*, 2009).

A constatação de que parasitos geneticamente distintos foram isolados em indivíduos que possuem a mesma forma clínica da doença, sugere que a resposta imune do hospedeiro pode representar um importante fator na determinação do destino da infecção (Vago *et al.*, 2000; Macedo *et al.*, 2004).

A causa desse aspecto clínico variável da doença não está bem esclarecida, porém, tem sido observada uma distribuição geográfica distinta entre populações de *T. cruzi*, sugerindo uma possível causa para esta ampla heterogeneidade de populações, juntamente com a resposta imune e o *background* genético do hospedeiro (Macedo *et al.*, 2002).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A variabilidade genética das populações de *T. cruzi* e o envolvimento com diferentes hospedeiros retratam a ampla diversidade epidemiológica que a doença de Chagas tem demonstrado durante toda sua evolução nos últimos 100 anos de pesquisas. Com o controle da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* no Cone Sul tem ocorrido uma diminuição progressiva de novos casos humanos da doença, contudo, não se pode descartar a possibilidade de domiciliação de novos vetores.

A divisão das populações do *T. cruzi* em seis DTU denominados TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI, demonstra a elevada heterogeneidade do parasito e abrem novas perspectivas no estudo da doença de Chagas. Porém, pouco se sabe sobre a influência desses genótipos na patogênese e evolução das diferentes formas clínicas da doença humana e experimental. O TcI e TcII são consideradas linhagens puras e são relacionadas principalmente com os ciclos silvestre e doméstico, respectivamente. O TcII tem sido considerado mais heterogêneo e patogênico para o homem que o TcI. Contudo, existem controvérsias associadas à patogenicidade das populações do TcI sendo apontadas diferenças regionais, ou seja, é mais patogênico nos países andinos e menos na Amazônia brasileira e alguns autores sugerem que exista menor variabilidade genética em suas subpopulações.

Dados recentes encontrados por nosso grupo evidenciaram uma elevada variabilidade genética do TcI e mostraram a importância do *P. megistus* como vetor de ação mútua em relação aos ciclos silvestre e doméstico na região do Triângulo Mineiro (dados não publicados). Desse modo, populações circulantes no meio silvestre poderão ser introduzidas no ciclo de transmissão doméstico onde predomina o TcII, gerando novos perfis genéticos do parasito infectando a população humana.

A exemplo do comportamento já evidenciado para o TcII, as diferenças na infectividade e patogenicidade do TcI podem estar associadas com a variabilidade biológica e genética do parasito e/ou à características genéticas e imunológicas do hospedeiro as quais poderiam induzir seleção natural nas populações do TcI, justificando a realização do estudo.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a virulência, tropismo, patogenicidade e os perfis genéticos de populações silvestres do *T. cruzi* isoladas de vetores invertebrados e humanos, em diferentes linhagens de camundongos na fase aguda da doença de Chagas experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o comportamento de isolados do *T. cruzi* I em três linhagens de camundongos (Swiss, Balb/c e C57BL/6) determinando as linhagens susceptíveis e resistentes na fase aguda da infecção experimental;
- II. Avaliar a influência das diferentes linhagens de camundongos (Swiss, Balb/c e C57BL/6) na virulência e patogenicidade de um mesmo isolado do *T. cruzi* I na fase aguda da infecção experimental;
- III. Correlacionar os perfis genéticos do kDNA das populações do *T. cruzi* I com o seu potencial infectante e patogênico na fase aguda da infecção experimental em diferentes linhagens de camundongos;
- IV. Comparar o comportamento biológico e genético das populações do *T. cruzi* I com um isolado silvestre da DTU TcIV;
- V. Avaliar a influência das características genéticas dos camundongos na possível seleção de populações do *T. cruzi* na fase aguda da infecção experimental;
- VI. Determinar o tropismo e alterações histopatológicas induzidas pelos diferentes isolados de *T. cruzi* nos diferentes modelos experimentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss, e duas linhagens isogênicas Balb/c e C57BL/6. A linhagem C57BL/6 possui um perfil imunológico oposto à linhagem Balb/c, sendo a primeira considerada resistente e a segunda sensível ao *T. cruzi*. O padrão de resposta desenvolvido pelos animais C57BL/6 possui um perfil Th1 com resposta imune celular resistente à infecção por parasitos intracelulares, enquanto a linhagem Balb/c possui um perfil Th2 gerando uma resposta humoral que os torna mais susceptíveis às infecções por estes microorganismos. Entretanto a linhagem Swiss, desenvolve uma resposta parecida com a humana sem um padrão pré-estabelecido geneticamente, e isso faz com que a resposta à infecção seja uma incógnita e muitas vezes dependente do parasito.

Para cada isolado selecionado foram infectados 15 animais de cada linhagem, pesando entre 18 e 25g e com aproximadamente quatro semanas de vida. Os animais foram cedidos pelo Biotério do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM e mantidos no mesmo sob as devidas condições.

O projeto foi submetido e aprovado (ANEXO A) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA de acordo com o protocolo nº 115.

4.2 AMOSTRAS DE *T. CRUZI* E INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Utilizamos quatro isolados de *T. cruzi* (ALVANI, AQ1-7, MUTUM E PV) criopreservados no banco de isolados e cepas do *T. cruzi* da Disciplina de Parasitologia da UFTM e previamente caracterizados por diferentes marcadores genéticos (domínio divergente D7 do gene 24S α rDNA, domínio de tamanho variável do gene 18S rDNA, espaçador não transcrito do gene do mini-exon) (Brisse *et al.*, 2001; Yeo *et al.*, 2005), e pelo marcador mitocondrial da subunidade II da enzima citocromo oxidase - COII (Freitas *et al.*, 2006).

Os isolados AQ1-7, ALVANI e MUTUM foram caracterizados como pertencentes ao grupo TcI e o isolado PV ao grupo TcIV. Os isolados foram procedentes de vetores silvestres e de humanos: AQ1-7: *Triatoma sordida* - Água

Quente (BA); ALVANI: *Panstrongylus megistus* - Uberaba (MG); MUTUM: *Panstrongylus megistus* - Uberaba (MG) e PV: Humano - Porto Velho (RO).

Os isolados PV e MUTUM foram descongelados na forma epimastigota em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e cultivados em fase exponencial por aproximadamente 15 dias a 28°C, dobrando o volume do meio LIT a cada três dias até atingir a concentração de $1,0 \times 10^8$ células/mL. Posteriormente, foi induzida a metaciclogênese por meio de estresse nutricional, em meio *Triatomine Artificial Urine* incompleto (TAU) (Bonaldo *et al.*, 1988): as formas epimastigotas foram concentradas por 10min a 1372g em centrífuga refrigerada a 4°C (r: 100mm), desprezando o sobrenadante e adicionando ao pellet, 10mL do meio TAU incompleto, o qual permaneceu em estufa a 37°C por duas horas. Após esse período, 200µL da cultura anterior contendo o meio TAU incompleto e os parasitos na forma epimastigota foram adicionados à 10mL de TAU completo, dividindo este volume em duas garrafas de cultura, armazenando-as em estufa a 37°C. Acompanhou-se por quatro dias até ocorrer à multiplicação e a diferenciação dos parasitos em tripomastigotas.

Os tripomastigotas obtidos no meio de TAU foram utilizados para infecção de células MK2 mantidas em meio de cultura DEMEM/F12 (GIBCO®) a 37°C em estufa de CO₂. Após 15 dias de acompanhamento e o aumento gradativo do número de tripomastigotas, foi realizada a preparação do inóculo para a infecção de 45 animais para cada isolado, na concentração de $3,5 \times 10^5$ células/mL.

Os isolados AQ1-7 e ALVANI foram previamente criopreservados em cultura de células MK2 na forma tripomastigota e para infecção dos animais foram descongelados e utilizados para infectar células MK2 para posterior obtenção de formas tripomastigotas na concentração de $3,5 \times 10^5$ células/mL para a infecção dos animais.

Cada animal foi infectado por via intraperitoneal com 10.000 tripomastigotas em 0,2mL de solução, quantificados em câmara de Neubauer e diluídos com solução fisiológica 0,9% quando necessário.

4.3 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA

A determinação de tripomastigotas circulantes no sangue dos camundongos inoculados com *T. cruzi* foi realizada pelas técnicas do exame a fresco, microhematócrito, hemocultura e PCR.

A parasitemia foi realizada durante 30 dias por meio do microhematócrito e nos casos positivos, pelo exame a fresco e hemocultura. A hemocultura foi realizada para isolamento do parasito no 15^o e 60^o dia após a infecção e para confirmar a infecção dos isolados que não apresentassem parasitemia patente pelo microhematócrito. Realizou-se hemoculturas de todos os camundongos após o 15^o dia de infecção para os isolados ALVANI, AQ1-7 e de nove animais para os isolados MUTUM e PV. A PCR foi utilizada para demonstrar a infectividade nos animais a partir de amostras de sangue e tecido.

A quantificação do número de tripomastigotas circulantes no sangue dos animais inoculados com *T. cruzi* foi realizada pela técnica descrita por Brener (1962) que consiste em aspirar 5µL de sangue da cauda do camundongo infectado, colocá-lo em uma lâmina e cobri-la com lamínula 22 x 22mm. Posteriormente, contar os parasitos presentes em 50 campos utilizando microscópio com objetiva de 40x e expressar em número de parasitos em 0,1mL de sangue. O início da parasitemia foi monitorado pela técnica do microhematócrito através da colheita de 20µL de sangue pela cauda ou plexo retroorbital em tubos capilares heparinizados e centrifugados a 5376g em microcentrífuga (r: 48mm) durante 5min. A pesquisa de parasitos foi realizada na interface entre o plasma e o creme leucocitário com objetiva de 10x, óleo de imersão e pouca luz. Esta técnica foi utilizada até o aumento considerável de parasitos no sangue periférico dos camundongos possibilitando assim a quantificação pelo exame a fresco.

A parasitemia foi avaliada em intervalos de 1 a 2 dias, com início no 4^o e o término no 30^o dia de infecção. No caso em que se constatou parasitemia patente, a curva foi confeccionada utilizando a média das contagens de tripomastigotas sanguíneos/mL dos camundongos durante o período de realização.

Após o término de 30 dias de infecção e acompanhamento pela parasitemia, 3 animais de cada linhagem para cada isolado foram sacrificados para coleta de órgãos-tecidos para PCR.

4.4 REISOLAMENTO DO PARASITO PELA HEMOCULTURA

O isolamento dos parasitos foi realizado nos períodos de 15 e 60 dias após a infecção, através da hemocultura. O sangue de cada animal foi coletado por meio da punção do plexo retroorbital e adicionado a 5mL de meio de cultura LIT em tubos

Falcon estéreis de 15mL. A leitura das culturas foi realizada no 25° e 45° dia após o cultivo examinando alíquotas de 10µL da suspensão entre lâmina e lamínula (22 x 22mm) com objetiva de 40x em microscópio óptico. As culturas positivas e negativas foram adicionadas (v/v) a guanidina-EDTA (Guanidina-HCl 6M e EDTA dissódico 0,2M, pH 8,0) e armazenadas à -20°C para posterior extração de DNA e realização da PCR específica utilizando pools de amostras positivas e amostras positivas independentes, para averiguar possíveis diferenças na variabilidade genética após a realização da LSSP-PCR.

No 35° dia de infecção, colheu-se 150µL de sangue que foi acrescido (v/v) à 150µL de guanidina-EDTA (Guanidina-HCl 6M e EDTA dissódico 0,2M, pH 8,0) para posterior extração de DNA e caracterização genética pelo LSSP-PCR.

4.5 AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E TROPISMO TECIDUAL

4.5.1 COLETA DE TECIDOS

Após o 35° dia de infecção, três animais de cada linhagem foram anestesiados por inalação com éter etílico e submetidos à eutanásia no final da fase aguda. Os animais foram colocados individualmente na posição anatômica em decúbito dorsal sobre um tablado de madeira cirúrgico (35cm x 25cm), e após a fixação dos membros, foi realizada uma assepsia com álcool 70% por toda superfície ventral do camundongo. Munido de uma pinça “dente de rato” e um tesoura de ponta fina, realizou-se uma incisão vertical de 10cm no animal de forma que os órgãos ficassem expostos condicionando a retirada dos mesmos. O material cirúrgico utilizado (tesouras, pinças e bisturi) foi esterilizado antes do procedimento e as lâminas de bisturi substituídas a cada animal. Foram removidos fragmentos dos seguintes órgãos: coração, diafragma, junção ileocecal, junção gastrointestinal, junção gastroesofágica, fígado, baço, bexiga e músculo esquelético (Íleo psoas).

Os tecidos coletados foram repetitivamente lavados com solução fisiológica estéril 0,9% e subdivididos em duas partes: a primeira foi devidamente armazenada e estocada a -70°C para posterior detecção de parasitos pela PCR e caracterização genética e a outra, fixada em formol tamponado à 10% para a avaliação histopatológica.

A manipulação das amostras teciduais foi realizada com todos os cuidados necessários, evitando-se qualquer contaminação com DNA do *T. cruzi*.

4.5.2 HISTOPATOLOGIA

Após a fixação em formol tamponado a 10% por 36 horas, os fragmentos teciduais foram processados no Laboratório de Histologia da Disciplina de Parasitologia da UFTM. Foram realizados cortes anatômicos subsequentes em cada espécime para um melhor aproveitamento da superfície tecidual. Os tecidos foram separados e desidratados em etanol PA por 24h, diafanizados em xilol (P.A) e incluídos em parafina líquida. Após foram confeccionados cortes de 4µm de espessura em micrótomo de gilete os quais foram corados com hematoxilina e eosina (H.E) para análise do processo inflamatório e parasitismo tecidual.

4.6 EXTRAÇÃO DO DNA EM AMOSTRAS DE SANGUE, CULTURA E TECIDOS

4.6.1 EXTRAÇÃO DO DNA EM AMOSTRAS DE SANGUE

Para a extração do DNA de alíquotas de sangue mantidos (v/v) em guanidina-EDTA (Guanidina-HCl 6M e EDTA dissódico 0,2M, pH 8,0), as amostras foram fervidas em banho-maria a 100°C por 15min, para promover a linearização dos minicírculos e sua liberação da rede de kDNA (Britto *et al.*,1993) e estocadas à 4°C até a utilização.

De acordo com Gomes *et al.* (1998), alíquotas de 300µL do sangue previamente lisadas e fervidas, foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 1,5mL (Eppendorf, 5415C, USA) e tratadas com 150µL de fenol tamponado (Tris pH 8,0) e 150µL de clorofórmio. Essa mistura foi homogeneizada lentamente por 2min e centrifugada a 5376g por 5min. 300µL do sobrenadante foram retirados e transferidos para um novo tubo. Acrescentou-se 200µL de água milli-Q estéril ao sedimento do primeiro tubo, que foi novamente homogeneizado e centrifugado, acrescentando o sobrenadante ao tubo reservado. O tubo contendo o sobrenadante foi purificado com igual volume de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado do mesmo modo. A

precipitação do DNA presente na fase aquosa foi realizada utilizando-se dois volumes de etanol absoluto, 2μL de glicogênio ou 20μg/μL (*Boehringer Mannheim*, Alemanha) e 10% (v/v) de acetato de sódio (3M, pH 5,2). O tubo foi colocado em banho de gelo durante 15min. A mistura foi centrifugada a 9085g por 15min, o sobrenadante descartado e o DNA lavado com etanol 70% e novamente centrifugado a 9085g por 15min. Após a volatilização do etanol, o DNA foi diluído em 30μL de água milli-Q estéril e estocado a 4°C.

Para cada extração foi realizado um controle negativo contendo apenas os reagentes utilizados durante a extração do DNA.

4.6.2 EXTRAÇÃO DO DNA EM AMOSTRAS DE CULTURAS

Como descrito na extração de amostras de sangue, as amostras foram fervidas em banho-maria a 100°C por 15min, para promover a linearização dos minicírculos e sua liberação da rede de kDNA, armazenando-as à 4°C até a utilização.

Alíquotas de 300μL de amostras previamente fervidas foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5mL (*Eppendorf*, 5415C, USA) acrescentando 100μL de água Milli-Q estéril em cada amostra. Foram adicionados 400μl de uma mistura de fenol-clorofórmio (v/v) (clorofórmio-álcool-isoamílico 24:1) que foi homogeneizada durante 10min e posteriormente centrifugada a 5376g por 5min.

Foi coletado a fase aquosa com a pipeta de 100μL com o devido cuidado para não pipetar a fase inferior, transferindo o sobrenadante para outro tubo de 1,5mL. Foi adicionado igual volume de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) ao novo tubo e homogeneizou-se por 10min, centrifugando a 5376g por 5min. Foi aspirado lentamente o sobrenadante com pipeta de 100μL por três vezes (300μL) transferindo-o para outro tubo de 1,5mL e adicionando 10% ou 30μl de acetato de sódio (3M pH 5,2).

Foi acrescido o dobro do volume de etanol absoluto gelado, homogeneizando-o e imergindo-o em banho de gelo por 15min. Sem agitar, foram centrifugadas a 5376g por 15min, e posteriormente, decantou-se o conteúdo do tubo onde permaneceu secando em papel absorvente. Após a volatilização do etanol, foi adicionado 50μL de água Milli-Q estéril, lavando as paredes dos tubos e armazenando-as a 4°C durante 36hs até a completa solubilização do DNA.

Para cada extração foi realizado um controle negativo (contendo apenas os reagentes utilizados durante a extração do DNA).

4.6.3 EXTRAÇÃO DO DNA DE TECIDOS

A análise molecular tecidual foi realizada para determinar a presença do *T. cruzi* no tecido através da PCR específica, assim como, para a caracterização das populações do parasito pela LSSP-PCR. Os tecidos foram separados em pequenos fragmentos, lavados exaustivamente com solução fisiológica estéril e transferidos para recortes de 7 x 7cm de plástico transparente com espessura de 3mm, esterilizados com gases estéreis umedecidas em álcool 70% e radiação UV por 15min. Os tecidos foram picotados individualmente utilizando lâminas de bisturi e palitos de madeira estéreis, e transferidos para tubos eppendorf de 1,5mL.

A extração de DNA foi realizada pelo método da lise alcalina, acrescentando NaOH (50mM) e 30µL de óleo mineral em cada tubo, levando-os ao vórtex e fervura em banho-maria por 15min. Logo, foram neutralizados com Tris-HCl (130mM, pH 8,0) com agitação em vórtex e centrifugação à 5376g por 20s. A fase intermediária observada em cada tubo após a centrifugação foi transferida para um eppendorf (0,5mL) e diluída 1:5 (40µL de água milli-Q estéril e 10µL de DNA) e armazenada à -20° C (Vago *et al.*, 2000).

Para cada extração foi realizado um controle negativo contendo apenas os reagentes utilizados durante a extração do DNA.

4.7 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO *T. CRUZI*

4.7.1 AMPLIFICAÇÃO ESPECÍFICA DO *T. CRUZI*

A amplificação de um fragmento de 330pb ocorre após a reação de PCR com os iniciadores 121 - 5' AAATAATGTACGGGGAGATGCATGA 3' e 122 - 5' GGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA 3', que corresponde ao produto amplificado referente à 21pb específicos da região constante e a sequência variável conseguinte dos minicírculos referente à rede de kDNA do *T. cruzi*, constituindo-se o alvo da reação.

A PCR para a amplificação específica do *T. cruzi* foi realizada num volume final de 20µL, contendo 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 3,5mM MgCl₂, 75mM KCl, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (INVITROGEN®), 10pmol de cada iniciador (121 e 122), 2µl de DNA e 30µL de óleo mineral (Gomes *et al.*,1998).

O programa de amplificação durante a reação no termociclador constitui-se de uma desnaturação inicial a 95°C por 5min, uma segunda desnaturação a 95°C por 1min durante 35 ciclos, a associação a 65°C por 1min e a extensão a 72°C por 1min, seguida de uma extensão final de 10min a 72°C. A revelação dos produtos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 6,0%, corados pelo nitrato de prata.

As amostras de culturas positivas foram selecionadas para posterior realização da técnica de LSSP-PCR para a análise filogenética comparativa e avaliação da variabilidade intra-específica e inter-específica do *T. cruzi* nas diferentes linhagens de camundongos.

4.7.2 LSSP-PCR (LOW STRINGENCY SINGLE SPECIFIC PRIMER - PCR)

Essa reação evidencia a sequência de nucleotídeos do DNA utilizado como molde a partir do produto da PCR específica que amplifica um fragmento de 330pb proveniente das porções variáveis do DNA presente nos minicírculos do *T. cruzi*, constituindo a “assinatura gênica” das populações do *T. cruzi* avaliadas, amplamente utilizada pelo bom desempenho em análises de variabilidade genética inter-específicas e intra-específicas de microorganismos podendo ser realizada diretamente não sendo necessário o isolamento da amostra.

A partir do produto da PCR específica, foi realizada uma reação de PCR com vários ciclos utilizando-se apenas um iniciador altamente concentrado, enzima Taq DNA polimerase e uma temperatura de associação muito baixa, representando uma reação com baixa estringência e passível de ligações do iniciador em mais de uma região onde ocorra a complementaridade, originando-se um perfil correspondente às sequências amplificadas. Esta conformação molecular representada no gel de poliacrilamida demonstra um padrão de múltiplas bandas, referentes à sequência inicial de nucleotídeos do DNA molde, revelando as “assinaturas gênicas” do kDNA de cada isolado antes e após a infecção experimental em camundongos.

A reação da PCR específica foi purificada em gel de agarose 1,5% (TBE 1X - 89mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8,0), preparado em água bidestilada estéril em presença de 0,5µg/mL de brometo de etídio. Logo, foi realizada a observação da banda de 330pb removendo-a com auxílio de um bisturi estéril em um transluminador ultravioleta (UV) de 260nm. O fragmento foi transferido para tubo de microcentrifuga de 1,5mL, aquecido em banho-maria, homogeneizado e diluído 1:5 ou 1:10 (dependendo da intensidade da banda) com água milli-Q estéril e utilizadas como DNA molde para as reações de LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer - PCR*) (Vago *et al.*, 1996 e 2000).

A reação de LSSP-PCR reamplificou as amostras de DNA purificado utilizando apenas um iniciador específico (correspondente ao iniciador 121 com 21pb) ou S35- (5'AAATAATGTACGGGGGAGATG 3'). O volume final da reação foi de 25µL contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 0,1% Triton X-100, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN®/Platinum, Madison,WI,USA) 45pmol do iniciador e 3µL de DNA (fragmento de 330pb purificado em agarose e diluído) cobertos com 30µL de óleo mineral para evitar a evaporação durante a ciclagem no termociclador.

A reação de amplificação tem a duração de 40 ciclos, iniciando-se pela desnaturação a 94°C (1min), uma etapa de associação a 30°C (1min) e a extensão a 72°C durante (7min) em um termociclador (MJ *Research* PTC-100). A etapa de revelação dos produtos da LSSP-PCR foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5%, corados pelo nitrato de prata.

4.7.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA DA VARIABILIDADE INTRA E INTER-ESPECÍFICA

Os perfis de bandas adquiridos após a reação de LSSP-PCR em gel de poliacrilamida 7,5% foram inseridos manualmente no formato “TIFF” e submetidos à análise computacional através do software Gel Compar II® para a construção de fenogramas.

O software utilizado realizou a divisão vertical do gel em níveis de mobilidade em que um nível é definido pela presença, de no mínimo, uma banda em qualquer uma das canaletas do gel e, a altura delas era normatizada de acordo com o peso molecular do respectivo gel inserido. De acordo com o número da canaleta e as posições das

diferentes bandas, foram calculadas as proporções de compartilhamento entre uma canaleta e outra.

O software também mediu a distância genética utilizando o método da Média Aritmética não Ponderada - UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Analysis*) para construção do fenograma intra e inter-específico.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o teste qui-quadrado (χ^2 de Pearson) para correlacionar a positividade tecidual após a reação de PCR entre as linhagens de camundongos e os isolados de *T. cruzi*.

Foi realizado o cálculo da área sobre a curva de parasitemia referente ao isolado PV, através do método de *Bezout* (regra dos trapézios) entre as linhagens de camundongos que utiliza a área dos trapézios formados durante a análise da curva fragmentada (Domingues, 1979). Em seguida, realizou-se a distribuição dos dados pela normalidade através do teste Shapiro-Wilk's ($N < 30$), finalizando a análise pelo teste paramétrico ANOVA para 3 ou mais amostras, comparando as linhagens de camundongos.

A histopatologia foi analisada pelo teste qui-quadrado (χ^2 de Pearson). Para o parasitismo tecidual correlacionou-se os isolados e a presença ou ausência de ninhos de amastigotas teciduais nas diferentes linhagens de camundongos. As diferenças significativas entre as linhagens de camundongos e os isolados de *T. cruzi* em relação à intensidade do processo inflamatório tecidual, foram observadas pelo teste Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn, a partir de um *score* numérico representativo da intensidade inflamatória tecidual, (0) ausente, (1) discreto, (1,5) discreto a moderado, (2) moderado, (3) moderado a intenso e 4 (intenso) (Chapadeiro, 1967). A intensidade do processo inflamatório foi testada pelo teste ANOVA para 3 amostras, analisando as diferenças entre os tecidos e os isolados de *T. cruzi*.

A variabilidade dos perfis genéticos de LSSP-PCR foi analisada por descrição das percentagens de similaridades entre os isolados (inóculos, amostras de sangue, tecidos e culturas) e linhagens de camundongos. A significância considerada foi de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o programa *Statistica for Windows*, versão 8.0 (StatSoft, Inc; EUA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA PELO EXAME A FRESCO (EF) E MICROHEMATÓCRITO (MH)

A parasitemia foi realizada em 7 camundongos de cada linhagem (Swiss, Balb/c, C57BL/6) a cada dois dias, durante 30 dias de infecção. O acompanhamento inicial foi realizado pelo MH e após sua positividade pelo EF.

Os isolados de TcI apresentaram durante a fase aguda, parasitemia subpatente nas três linhagens de camundongos, tanto pelo EF quanto pelo MH durante os 30 dias de acompanhamento. Apenas o isolado PV (TcIV), apresentou parasitemia patente nas três linhagens de camundongos com 100% de positividade no EF e no MH (Tabelas 1 e 2).

Na fase aguda da infecção, os camundongos infectados com o isolado PV (TcIV), apresentaram período pré-patente de quatro dias e elevada parasitemia detectada pelo exame a fresco durante os 30 dias de avaliação. Em todas as linhagens de camundongos foram observados três picos de parasitemia, um entre o 12^o e 15^o dia e os outros dois no 19^o e 25^o dia de infecção. O último pico no 24^o dia foi bem definido nas três linhagens estudadas, contudo na linhagem Swiss foi detectada parasitemia mais elevada ($6,7 \times 10^4$ tripomastigotas/mL) seguida pela Balb/c ($3,0 \times 10^4$ tripomastigotas/mL) e C57BL/6 ($2,8 \times 10^4$ tripomastigotas/mL) (Tabela 2) (Figura 1).

A análise comparativa do parasitismo sanguíneo do isolado PV avaliado pelo EF nos diferentes modelos animais foi realizada pelo método de *Bezout*, que fragmenta as curvas de parasitemia em trapézios calculando a área de acordo com os mesmos (Domingues, 1979). Desse modo, foi possível comparar a parasitemia total gerada em cada linhagem estudada evidenciando uma maior susceptibilidade à infecção da linhagem Swiss pelo isolado PV seguida pelo Balb/c ($p = 0,059$) e C57BL/6 ($p < 0,05$) (Figura 2).

A sobrevivência nas três linhagens de camundongos para os quatro isolados de *T. cruzi* durante 30 dias de infecção foi de 100%.

Tabela 1: Acompanhamento da parasitemia dos isolados de TcI pelo exame a fresco (EF) e microhematócrito (MH) durante 30 dias de infecção.

Linhagens de camundongos			
Isolados de TcI	Swiss (n = 7)	Balb/c (n = 7)	C57BL/6 (n = 7)
ALVANI	Neg	Neg	Neg
AQ1-7	Neg	Neg	Neg
MUTUM	Neg	Neg	Neg

Abreviaturas: Neg (negativo)

Tabela 2: Detecção do parasitismo sanguíneo e tecidual do isolado PV (TcIV) de acordo com a linhagem de camundongo.

Linhagens de camundongos					
		Swiss	Balb/c	C57BL/6	Total
Sangue	Pico/dia	6,7 x 10 ^{4*} /24 ^o	3,0 x 10 ^{4*} /14 ^o	2,8 x 10 ^{4*} /24 ^o	-
	EF	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (21/21)
	MH	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (7/7)	100% (21/21)
	HM FA	66,6% (2/3)	66,6% (2/3)	33,3% (1/3)	55,5% (5/9)
	HM FC	60,0% (3/5)	80,0% (4/5)	60,0% (3/5)	66,6% (10/15)
	PCR	-	-	-	66,6% (4/6)
Tecido	HE	16,6% (2/12)	0,0% (0/12)	8,3% (1/12)	8,3% (3/36)
	PCR	88,8% (16/18)	66,6% (12/18)	77,7% (14/18)	77,7% (42/54)

EF (exames a fresco); MH (microhematócrito); HM FA (hemocultura fase aguda 15^o dia); HM FC (hemocultura fase crônica 60^o dia); HE (hematoxilina - eosina); PCR (reação em cadeia da polimerase); (*) Parasitos/mL de sangue

Tabela 3: Reisolamento das populações de TcI pela hemocultura no 15^o dia de infecção de acordo com a linhagem de camundongo.

Linhagens de camundongos				
Isolados de TcI	Swiss	Balb/c	C57BL/6	Total
ALVANI	0% (0/15)	13,3% (2/15)	0% (0/15)	4,4% (2/45)
AQ1-7	6,6% (1/15)	13,3% (2/15)	6,6% (1/15)	8,8% (4/45)
MUTUM	55,5% (5/9)	55,5% (5/9)	88,8% (8/9)	66,6% (18/27)
Total	15,3% (6/39)	23,0% (9/39)	23,0% (9/39)	

Tabela 4: Reisolamento das populações de TcI pela hemocultura no 60^o dia de infecção de acordo com a linhagem de camundongo.

Linhagens de camundongos				
Isolados de TcI	Swiss	Balb/c	C57BL/6	Total
ALVANI	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/15)
AQ1-7	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/15)
MUTUM	60,0% (3/5)	20,0% (1/5)	40,0% (2/5)	40,0% (6/15)
Total	20,0% (3/15)	6,6% (1/15)	13,3% (2/15)	

5.2 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA PELA HEMOCULTURA

Diante do baixo parasitismo sanguíneo das populações de TcI a infectividade das mesmas foi avaliada por meio da hemocultura realizada no 15° e 60° dia de infecção. A infectividade foi expressa pelo percentual de camundongos positivos considerando-se baixa infectividade até 20%, média de 21-50% e acima de 50% elevada infectividade (Bertoli *et al.*, 2006). Em geral, as populações de TcI apresentaram baixa infectividade nas três linhagens de camundongos, sendo o potencial infectante cepa-dependente na fase aguda no 15° dia de infecção com MUTUM > AQ1-7 > ALVANI. O isolado ALVANI foi o menos infectante (0,0%, 13,3% e 0,0%) seguido de AQ1-7 (6,6%, 13,3% e 6,6%) e MUTUM (55,5%, 55,5% e 88,8%), respectivamente para Swiss, Balb/c e C57BL/6 (Tabela 3). A infectividade avaliada no 60° dia de infecção pela hemocultura revelou uma diminuição do potencial infectante para os isolados ALVANI e AQ1-7, que não apresentaram positividade na hemocultura, porém, para os isolados MUTUM (20,0%, 40,0% e 60,0%) e PV (80,0%, 60,0% e 60,0%) observou-se uma infectividade média e alta nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss, respectivamente (Tabelas 2 e 4). Na infecção pelo isolado MUTUM as três linhagens foram susceptíveis, contudo Balb/c e Swiss demonstraram maior resistência (55,5%), comparado à linhagem C57BL/6 (88,8%) no 15° dia, observado também no 60° dia onde a linhagem Balb/c apresentou-se mais resistente com 20,0% comparado a linhagem C57BL/6 com 40,0% (Tabelas 3 e 4).

Para o isolado PV (TcIV) foram realizadas hemoculturas em apenas três animais de cada linhagem no 15° dia, uma vez que, pelo EF e MH foi observado um elevado potencial infectante dessas populações. Nas linhagens Balb/c e Swiss a positividade da hemocultura (FA) foi de 66,6% e na linhagem C57BL/6 de 33,3%, já na FC foi observado 80,0% na linhagem Balb/c e 60,0% nas linhagens Swiss e C57BL/6. Esse dado sugere maior resistência nos animais C57BL/6 a esse isolado, o que pode ser confirmado pela menor parasitemia na hemocultura na FA, pelo pico tardio no 24° dia e pela análise da curva de parasitemia pelo método de *Bezout* na linhagem C57BL/6 ($p < 0,05$), e maior susceptibilidade da linhagem Swiss (Tabela 2) (Figura 2).

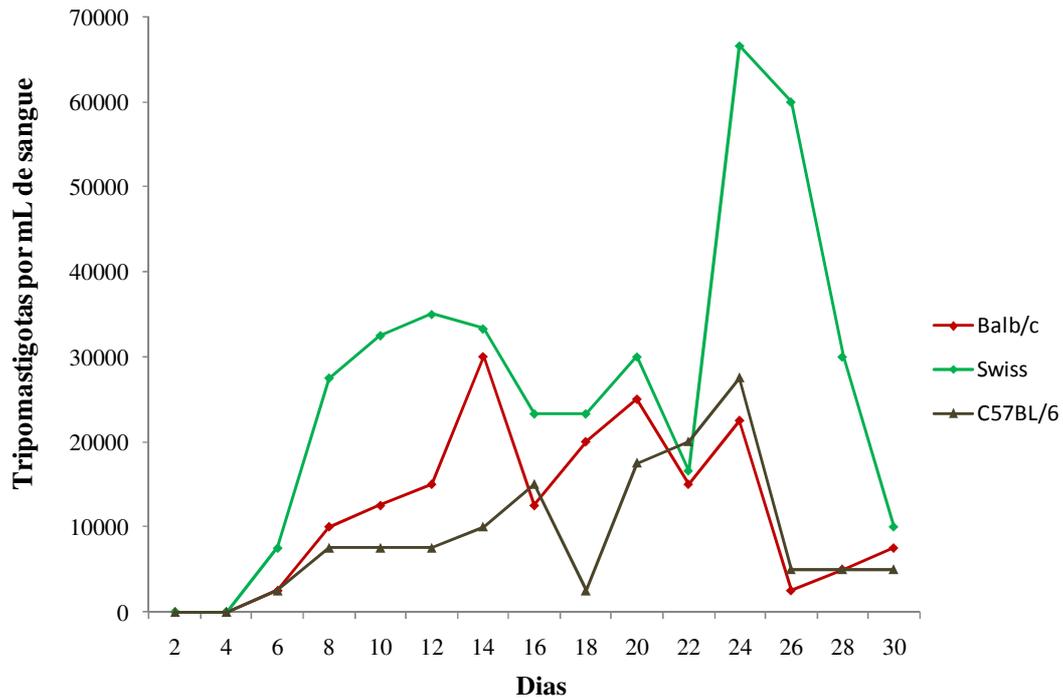


Figura 1: Curva de parasitemia após infecção pelo isolado de TcIV (PV) durante 30 dias, pelos métodos de exame à fresco e microhematócrito.

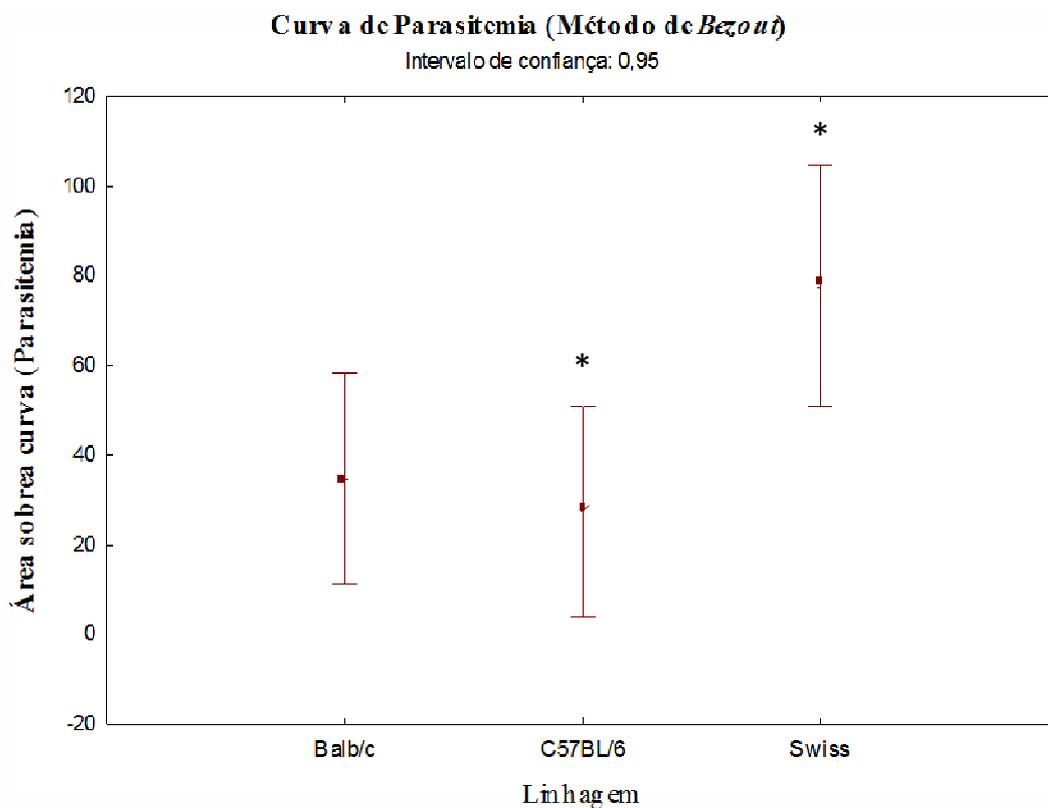


Figura 2: Análise comparativa da área sobre a curva de parasitemia do isolado PV entre as linhagens de camundongos a partir do método de *Bezout* (regra dos trapézios). (*) $p < 0,05$

5.3 AVALIAÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL PELA PCR ESPECÍFICA

5.3.1 DISTRIBUIÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL TOTAL DE ACORDO COM OS ISOLADOS E A LINHAGEM DE CAMUNDONGO

A análise do parasitismo tecidual total das populações do TcI para camundongos, independente da linhagem, demonstrou que 81,0% (175/216) dos tecidos de camundongos infectados com os três isolados de TcI amplificaram kDNA do parasito como evidenciado pela PCR específica com os iniciadores 121 e 122, demonstrando que estas populações apresentam elevado parasitismo tecidual.

A avaliação do parasitismo tecidual pela PCR no TcI nas diferentes linhagens de animais utilizadas e independente do isolado avaliado, demonstrou que as três linhagens apresentaram o kDNA do parasito em proporções semelhantes sem diferença estatística entre elas, sendo 84,7% \pm 23,8 (61/72) de tecidos com presença do kDNA em C57BL/6, 81,9% \pm 12,6 (59/72) em Balb/c e 76,4% \pm 11,2 (55/72) em Swiss (Tabela 5).

A positividade tecidual total verificada pela PCR em animais infectados com os diferentes isolados do TcI, independente da linhagem de camundongo demonstrou uma variabilidade no potencial infectante entre as populações do parasito. Nos animais infectados com o isolado ALVANI o kDNA do TcI foi detectado em 93,5% (76/81), seguido pelo isolado AQ1-7 com 85,1% (69/81) e MUTUM com 55,6% (30/54) de positividade (Tabela 5).

O parasitismo tecidual do isolado PV avaliado pela PCR nas diferentes linhagens de animais demonstrou que em 77,7% dos tecidos foram amplificados kDNA do *T. cruzi* (Tabela 2). A distribuição da positividade tecidual deste isolado de acordo com as linhagens de camundongos demonstrou a presença do kDNA do parasito em 66,6% (12/18) dos tecidos nos animais Balb/c, 77,7% (14/18) nos animais C57BL/6 e em 88,8% (16/18) nos animais Swiss, sem diferença estatística significativa entre eles (Tabela 2).

5.3.2 DISTRIBUIÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL DE CADA ISOLADO DO *T. CRUZI* DE ACORDO COM AS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS

A detecção do parasitismo tecidual de cada isolado por meio da PCR e eletroforese em gel em poliacrilamida 6,0% foi realizada em nove tecidos diferentes de três animais por linhagem (27 amostras) para os isolados ALVANI e AQ1-7, e dois animais por linhagem para os isolados MUTUM e PV (18 amostras), interpretando os resultados, a partir da visualização de banda respectiva em 330pb (Tabela 5) (Figura 3).

A positividade da PCR dos isolados de TcI foi maior na infecção por ALVANI seguido por AQ1-7 e MUTUM, sendo observada diferença estatística significativa nos animais da linhagem Balb/c (38,8%) infectados com o isolado MUTUM ($p < 0,001$) em relação aos demais (Tabela 5) (Figura 4).

O isolado ALVANI causou elevado parasitismo tecidual com 88,0% na linhagem Swiss, 92,5% na linhagem C57BL/6 e 100% na linhagem Balb/c, apesar do baixo parasitismo sanguíneo comprovado pela parasitemia subpatente e baixa positividade nas hemoculturas realizadas nos 15° e 60° dias. No isolado AQ1-7 também foi observado elevado parasitismo tecidual com 74,0% na linhagem Swiss, 88,8% na linhagem C57BL/6 e 92,5% na linhagem Balb/c. Nos animais infectados com MUTUM foi detectada menor positividade pela PCR apresentando 38,8%, 66,6% e 61,1% de tecidos positivos nas linhagens Balb/c, C57BL/6 e Swiss, respectivamente (Tabela 5).

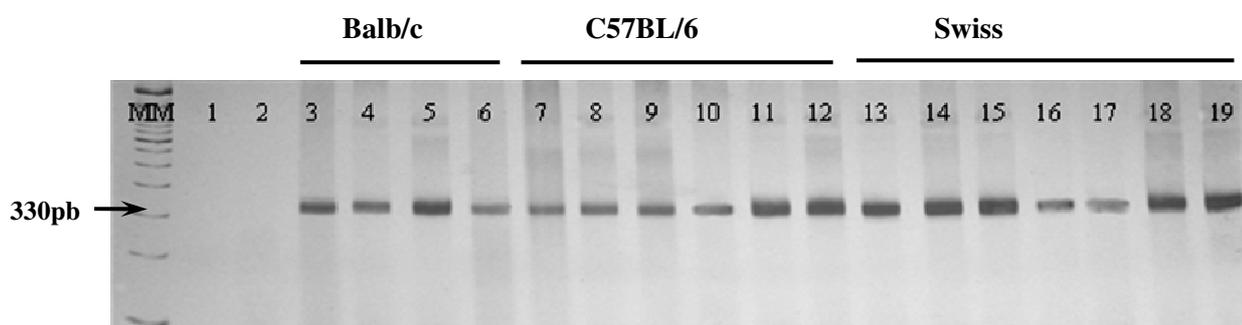


Figura 3: Produtos da reação de PCR tecidual utilizando os iniciadores 121 e 122 após amplificação em gel poliacrilamida 6,0%. 3-coração/Balb/c, 4-JGE/Balb/c, 5-músculo/Balb/c, 6-fígado/Balb/c, 7-coração/C57BL/6, 8-JGD/C57BL/6, 9-músculo/C57BL/6, 10-bexiga/C57BL/6, 11-fígado/C57BL/6, 12-JGE/C57BL/6, 13-coração/Swiss, 14-JIC/Swiss, 15-músculo/Swiss, 16-bexiga/Swiss, 17-fígado/Swiss, 18-JGD/Swiss, 19-Diafragma/Swiss. (MM - marcador molecular/100pb; 1 e 2 - controles negativos, JGE: Junção gastroesofágica; JGD: Junção gastroduodenal; JIC: Junção ileocecal)

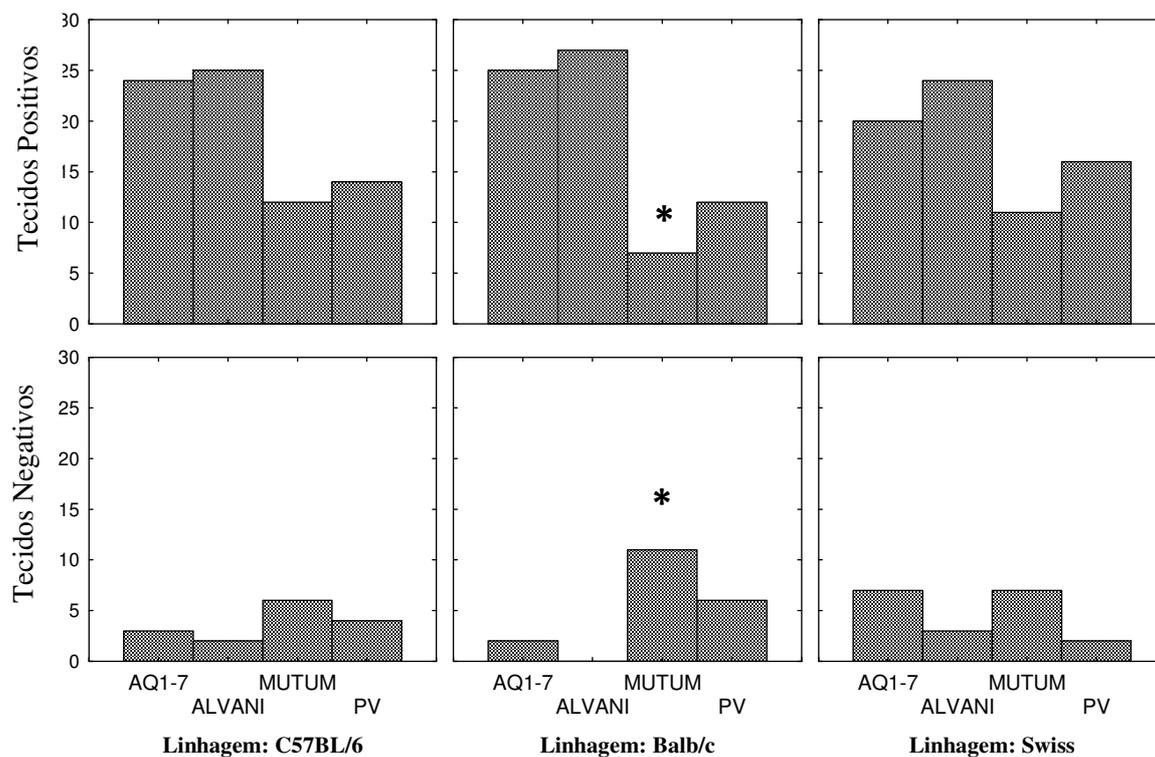


Figura 4: Análise comparativa do parasitismo tecidual total dos isolados do *T. cruzi* detectado pela PCR nos diferentes órgãos nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss. (*) $p < 0,001$

Tabela 5: Percentual da positividade tecidual total dos isolados de *T. cruzi* nas linhagens de camundongos pela PCR de acordo com os isolados. (*) $p < 0,001$, (#) $p < 0,005$

Linhagens	Isolados			
	ALVANI	AQ1-7	MUTUM	PV
Balb/c	100% (27/27)	92,5% (25/27)	38,8% (7/18)*	66,6% (12/18)
C57BL/6	92,5% (25/27)	88,8% (24/27)	66,6% (12/18)	77,7% (14/18)
Swiss	88,0% (24/27)	74,0% (20/27)	61,1% (11/18)	88,8% (16/18)
Total	93,8% (76/81)	85,1% (69/81)	55,5%# (30/54)	77,7% (42/54)

5.3.3 DISTRIBUIÇÃO DA POSITIVIDADE DA PCR TECIDUAL NA MUSCULATURA ESTRIADA, LISA E CORAÇÃO

A presença do kDNA dos diferentes isolados do TcI nos tecidos dos animais infectados foi realizada pelo percentual médio de positividade da PCR no coração, fígado, baço e nos tecidos constituídos por musculatura estriada (diafragma e músculo esquelético) e musculatura lisa (bexiga e junções esôfago-gástrica, gastro-duodenal e íleo-cecal), os quais foram analisados individualmente e agrupados para efeito comparativo.

A análise da distribuição tecidual dos isolados de *T. cruzi* I pela PCR foi realizado em quatro grupos de tecidos (coração, musculatura lisa, musculatura estriada e fígado/baço) no total de 24 camundongos, independente da linhagem, sendo também realizado uma análise comparativa com seis animais infectados pelo isolado PV. A presença do kDNA dos três isolados do TcI foi detectada em 81,0% (175/216) dos tecidos analisados e de 77,7% (42/54) nos tecidos dos animais infectados com PV (Tabela 6).

Foi observada uma variação na distribuição dos parasitos teciduais em relação ao isolado avaliado com elevada positividade, em ALVANI e AQ1-7, correspondendo a 93,8% (76/81) e 85,1% (69/81) de tecidos parasitados e apenas 55,5% (30/54) dos animais infectados com MUTUM ($p < 0,05$). A linhagem do animal infectado não influenciou na distribuição tecidual dos isolados ALVANI (100%, 92,6% e 88,8%) e AQ1-7 (92,6%, 88,8% e 74,0%), respectivamente, para Balb/c, C57BL/6 e Swiss, contudo nos animais infectados com o isolado MUTUM foi observado um menor parasitismo nos animais Balb/c (38,8%) ($p < 0,001$) não sendo encontrada diferença em C57BL/6 (66,6%) e Swiss (61,1%) (Tabelas 5 e 6).

A distribuição média do parasitismo do TcI nos 4 grupos de tecidos avaliados foi homogênea nos animais infectados com os isolados ALVANI (88,8% - 100%) e AQ1-7 (77,3% - 88,8%) e com maior variação no isolado MUTUM (33,3% - 66,6%) demonstrando menor parasitismo no fígado/baço (33,3%) (Tabela 6). Com relação ao TcIV a positividade da PCR variou de 66,6% a 100% com um comportamento semelhante ao observado no isolado MUTUM (TcI) evidenciado por um menor parasitismo em Balb/c (66,6%) (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição tecidual do *T. cruzi* avaliado pela amplificação do kDNA e HE no coração, musculatura lisa, musculatura estriada e fígado/baço de acordo com o isolado do parasito e a linhagem do animal.

Isolados	TcI						TcIV									
	ALVANI			AQI-7			MUTUM			PV						
	Balb/c	C57BL/6	Swiss	Total	Balb/c	C57BL/6	Swiss	Total	Balb/c	C57BL/6	Swiss	Total	Balb/c	C57BL/6	Swiss	Total
Coração	100% (3/3)	100% (3/3)	100% ¹ (3/3)	100% (9/9)	100% ² (3/3)	66,6% (2/3)	66,6% ² (2/3)	77,3% (7/9)	50,0% (1/2)	50,0% (1/2)	100% (2/2)	66,6% (4/6)	100% (2/2)	100% ³ (2/2)	100% ³ (2/2)	100% (6/6)
Musculatura Lisa	100% (12/12)	100% (12/12)	83,3% (10/12)	94,4% (34/36)	100% ² (12/12)	91,6% (11/12)	75,0% (9/12)	88,8% (32/36)	50,0% (4/8)	87,5% (7/8)	62,5% (5/8)	66,6% (16/24)	87,5% (7/8)	75,0% (6/8)	87,5% (7/8)	83,3% (20/24)
Musculatura Estriada	100% (6/6)	83,3% (5/6)	100% (6/6)	94,4% (17/18)	66,6% ² (4/6)	100% (6/6)	66,6% (4/6)	77,3% (14/18)	50,0% (2/4)	75,0% (3/4)	25,0% (1/4)	50,0% (6/12)	25,0% (1/4)	75,0% (3/4)	100% (4/4)	66,6% (8/12)
Fígado/Baço	100% ¹ (6/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	88,8% (16/18)	100% (6/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	88,8% (16/18)	0% (0/4)	25,0% (1/4)	75,0% (3/4)	33,3% (4/12)	50,0% (2/4)	75,0% (3/4)	75,0% (3/4)	66,6% (8/12)
Média Total	100% (27/27)	92,6% (25/27)	88,8% (24/27)	93,8% (76/81)	92,6% (25/27)	88,8% (24/27)	74,0% (20/27)	85,1% (69/81)	38,8% (7/18)	66,6% (12/18)	61,1% (11/18)	55,5% (30/54)	66,6% (12/18)	77,7% (14/18)	88,8% (16/18)	77,7% (42/54)

¹ HE no isolado ALVANI: Balb/c/Musculatura lisa - 25,0% (2/8) e Baço/fígado - 16,6% (1/6); Swiss/coração - 50,0% (1/2)

² HE no isolado AQI-7: Balb/c/coração - 100% (2/2), músculo liso - 25,0% (2/8) e músculo estriado - 16,6% (1/6); Swiss/coração - 50,0% (1/2) e músculo estriado 16,6% (1/6); C57BL/6/coração - 100% (2/2) e músculo estriado - 33,3% (2/6)

³ HE no isolado PV: Swiss/coração - 100% (2/2), C57BL/6/coração - 50,0% (1/2)

5.3.4 ANÁLISE DA CAPACIDADE INFECTANTE DO *T. cruzi* I PARA CAMUNDONGOS PELA DETECÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL E SANGUÍNEO

A capacidade infectante das populações de TcI para o modelo murino avaliada pelo parasitismo sanguíneo e tecidual no total dos animais independente dos isolados demonstrou que essas populações são mais detectadas nos tecidos que no sangue. A PCR tecidual foi a técnica mais sensível evidenciando o parasito em 81,0% (175/216) das amostras analisadas, seguida pela PCR no sangue com 44,4% (8/18). Logo a hemocultura, com 20,5% (24/117) das amostras positivas seguido pela HE que permitiu a visualização do parasito em apenas 13,8% (15/108), não sendo detectado nenhum animal infectado pelo EF e/ou MH (Tabela 7).

A linhagem do animal não influenciou na presença do parasito no sangue periférico como demonstrado pela hemocultura e EF e/ou MH, o mesmo sendo observado em relação à PCR tecidual. Contudo, foi observada uma maior susceptibilidade à infecção na linhagem Balb/c (22,2%) seguido por C57BL/6 (11,1%) e Swiss (8,3%) pela HE (Tabela 8).

A influência das diferentes populações de TcI na capacidade infectante do parasito para camundongos também foi avaliada pelo parasitismo sanguíneo e tecidual. A avaliação da parasiteia mostrou que a positividade da hemocultura foi cepa-dependente sendo detectado uma elevada positividade no isolado MUTUM (66,7%), seguida pelo isolado AQ1-7 (8,9%) e ALVANI com 4,4%. Isso também ocorreu com a PCR do sangue que evidenciou 16,6% (1/6) das amostras com presença do kDNA do isolado ALVANI, 33,3% (2/6) do isolado AQ1-7 e 83,3% (5/6) do isolado MUTUM. Esse comportamento não foi evidenciado pelo EF e/ou MH os quais não foram capazes de detectar o parasito na corrente sanguínea dos animais. Esse mesmo comportamento ocorreu quando observamos o parasitismo tecidual tanto pela PCR quanto pela HE. A maior positividade da PCR foi de 93,8%, 85,1% e 55,6%, respectivamente, para os isolados ALVANI, AQ1-7 e MUTUM, e referente à HE 30,0%, 11,1% e 0%, respectivamente, aos isolados AQ1-7, ALVANI e MUTUM. Ao contrário do observado no sangue, o isolado MUTUM mostrou um menor parasitismo tecidual tanto pela PCR (55,6%) ($p < 0,05$) quanto pela HE (0%) (Tabela 7).

Tabela 7: Análise comparativa dos diferentes métodos de detecção da capacidade infectante das diferentes populações de TcI para camundongos, independente da linhagem. (*) $p < 0,05$

Método	ALVANI	AQ1-7	MUTUM	Total
EF e/ou MH	0% (0/24)	0% (0/24)	0% (0/24)	0% (0/72)
Hem	4,4% (2/45)	8,9% (4/45)	66,7% (18/27)	20,5% (24/117)
PCR sangue	16,6% (1/6)	33,3% (2/6)	83,3% (5/6)*	44,4% (8/18)
HE	11,1% (4/36)	30,5% (11/36)	0% (0/36)	13,8% (15/108)
PCR tecidual	93,8% (76/81)	85,1% (69/81)	55,6%* (30/54)	81,0% (175/216)

Abreviaturas: EF (exame a fresco); MH (microhematócrito); Hem (hemocultura -15 animais/AQ1-7 e ALVANI e 9 animais/MUTUM); HE (hematoxilina e eosina - correspondente a 6 tecidos/2 animais/3 linhagens); PCR (reação em cadeia da polimerase - 9 tecidos/3 animais/3 linhagens)

Tabela 8: Análise comparativa dos diferentes métodos de detecção da capacidade infectante dos três isolados de TcI de acordo com as linhagens de camundongos.

Método	Balb/c	C57BL/6	Swiss	Total
EF e/ou MH	0% (0/24)	0% (0/24)	0% (0/24)	0% (0/72)
Hem	23,1% (9/39)	23,1% (9/39)	15,4% (6/39)	20,5% (24/117)
HE	22,2% (8/36)	11,1% (4/36)	8,3% (3/36)	13,8% (15/108)
PCR tecidual	81,9% (59/72)	84,7% (61/72)	76,4% (55/72)	81,0% (175/216)

Abreviaturas: EF (exame a fresco); MH (microhematócrito); HE (hematoxilina - eosina correspondente a 6 tecidos/2 animais/3 isolados); PCR (reação em cadeia da polimerase) AQ1-7 e ALVANI (9 tecidos/3 animais/linhagem) e MUTUM (9 tecidos/2 animais/linhagem)

5.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA HEMATOXILINA E EOSINA

5.4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA ENTRE AS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS

O estudo histopatológico no 35º dia de infecção pelo isolado ALVANI referente à linhagem C57BL/6 demonstrou processo inflamatório variado com ausência de parasitismo tecidual avaliado pela HE: intenso e difuso na musculatura esquelética e lisa (bexiga), discreto a moderado e focal no coração e junções gastro-intestinais.

A linhagem Balb/c evidenciou processo inflamatório focal e discreto no coração seguido por miosites difusas e intensas na musculatura esquelética e miosites moderadas com presença de parasitos dispersos no tecido na musculatura lisa.

A linhagem Swiss demonstrou processo inflamatório difuso sendo moderado a intenso no coração e bexiga com parasitismo, ao passo que, a musculatura esquelética apresentou processo inflamatório discreto e focal. A porção gastro-intestinal apresentou miosites discretas e focais nas junções gastro-duodenal e íleo-cecal, com ausência de parasitismo (Figuras 5, 6 e 7).

Referente ao estudo histopatológico após infecção pelo isolado AQ1-7, a linhagem C57BL/6 evidenciou processo inflamatório intenso e difuso no coração e músculo esquelético com ninhos de parasitos e discreto e focal na musculatura lisa sem parasitos.

A linhagem Balb/c demonstrou processo inflamatório no coração moderado e focal seguido de parasitismo. A musculatura lisa apresentou miosites discretas e focais com parasitismo na porção gastro-intestinal, ao passo que, a musculatura esquelética evidenciou miosites intensas e difusas com parasitos dispersos no tecido.

Na linhagem Swiss, observou-se processo inflamatório no coração discreto e focal, com presença de parasitos. A musculatura lisa e esquelética apresentou miosites intensas e focais com parasitismo (Figuras 5, 6 e 7).

O estudo histopatológico pela HE no 35º dia de infecção pelo isolado MUTUM referente à linhagem C57BL/6, Balb/c e Swiss não evidenciou parasitos no tecido, porém, foram observados processos inflamatórios moderados, focais ou difusos na musculatura lisa, sendo focais e discretos no coração e musculatura esquelética (Figura 8).

De acordo com a análise pela HE referente ao isolado PV (TcIV), a linhagem C57BL/6 demonstrou processo inflamatório discreto e focal no coração, musculatura esquelética e lisa, sem parasitismo. A linhagem Balb/c apresentou parasitismo no coração acompanhado de processo inflamatório discreto e focal, porém nos demais tecidos foram observados processos inflamatórios discretos com ausência de ninhos de parasitos. A linhagem Swiss demonstrou processo inflamatório focal e discreto a moderado no coração, acompanhado de parasitismo. A musculatura esquelética e musculatura lisa evidenciaram miosites discretas e focais, sem a presença de parasitos no tecido (Figura 9).

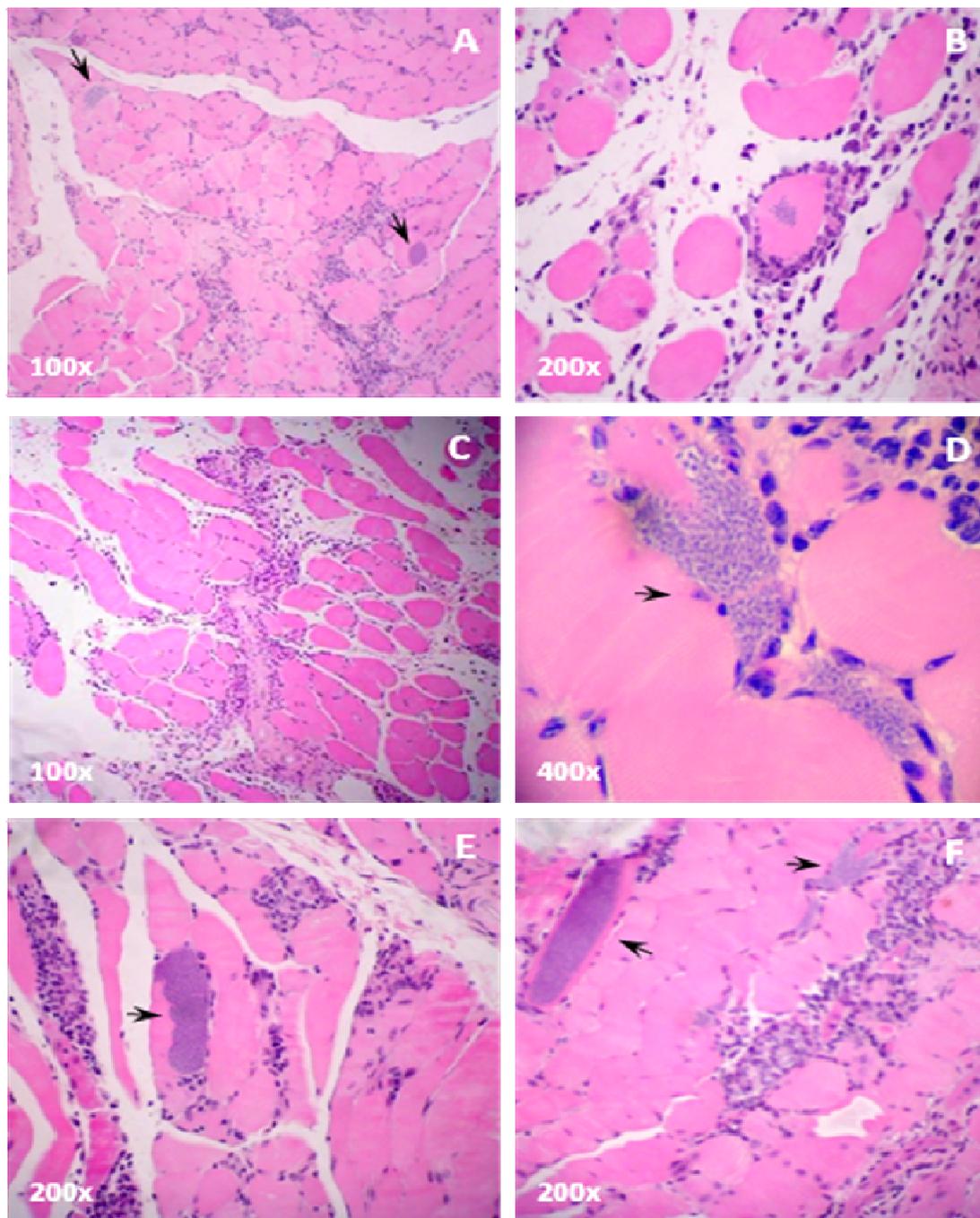


Figura 5. Fotomicrografias histológicas da musculatura estriada esquelética (íleo psoas) coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens (Swiss, Balb/c e C57BL/6) infectados com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) dos isolados AQ1-7 (*Triatoma sordida* - BA) e ALVANI (*Panstrongylus megistus* - MG). **A, B e C:** Músculo estriado esquelético com parasitismo e miosite intensa e difusa. **B e C:** Músculo esquelético com destruição de fibras musculares. **D, E e F:** Presença de ninhos de amastigotas no tecido muscular entre células do infiltrado inflamatório. Esse perfil histopatológico foi detectado nas três linhagens de camundongos infectados com o isolado AQ1-7 e nos animais C57BL/6 infectados com o isolado ALVANI, nesse caso, com ausência de parasitismo (Setas: ninhos de amastigotas).

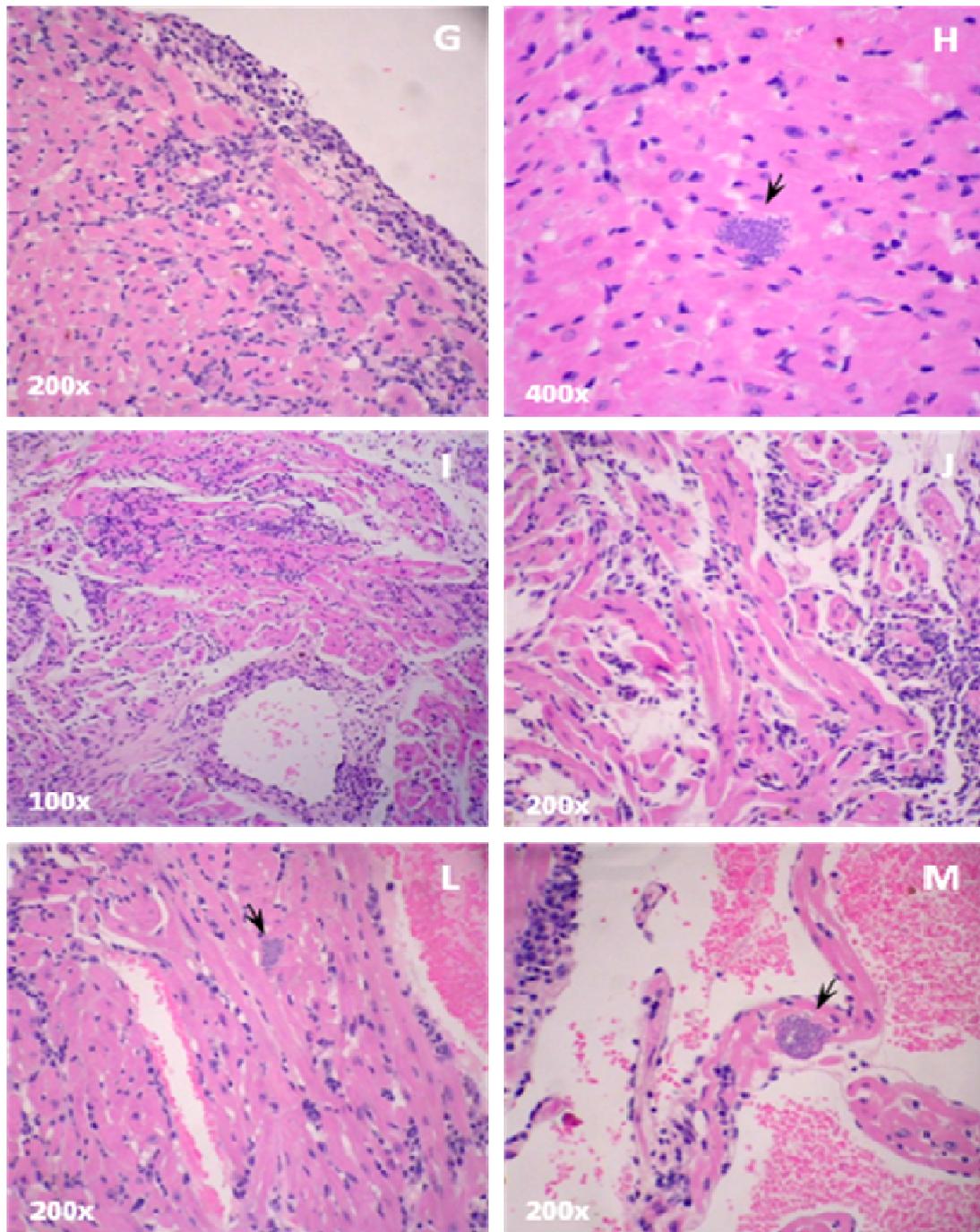


Figura 6: Fotomicrografias histológicas do músculo estriado cardíaco (miocárdio) coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens Swiss, Balb/c e C57BL/6, na fase aguda da infecção com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) dos isolados AQ1-7 (*Triatoma sordida* - BA) e ALVANI (*Panstrongylus megistus* - MG). **G e H:** Região ventricular demonstrando parasitismo e infiltrado inflamatório intenso (epicardite e miocardite). **I e J:** Região atrial demonstrando infiltrado inflamatório intenso e difuso (miocardite). **L e M:** Infiltrado inflamatório intenso e difuso seguido de parasitismo na região ventricular e atrial respectivamente. Esse comportamento foi semelhante nas três linhagens de camundongos infectadas com o isolado AQ1-7, e naqueles da linhagem Swiss infectados com o isolado ALVANI (Setas: ninhos de amastigotas).

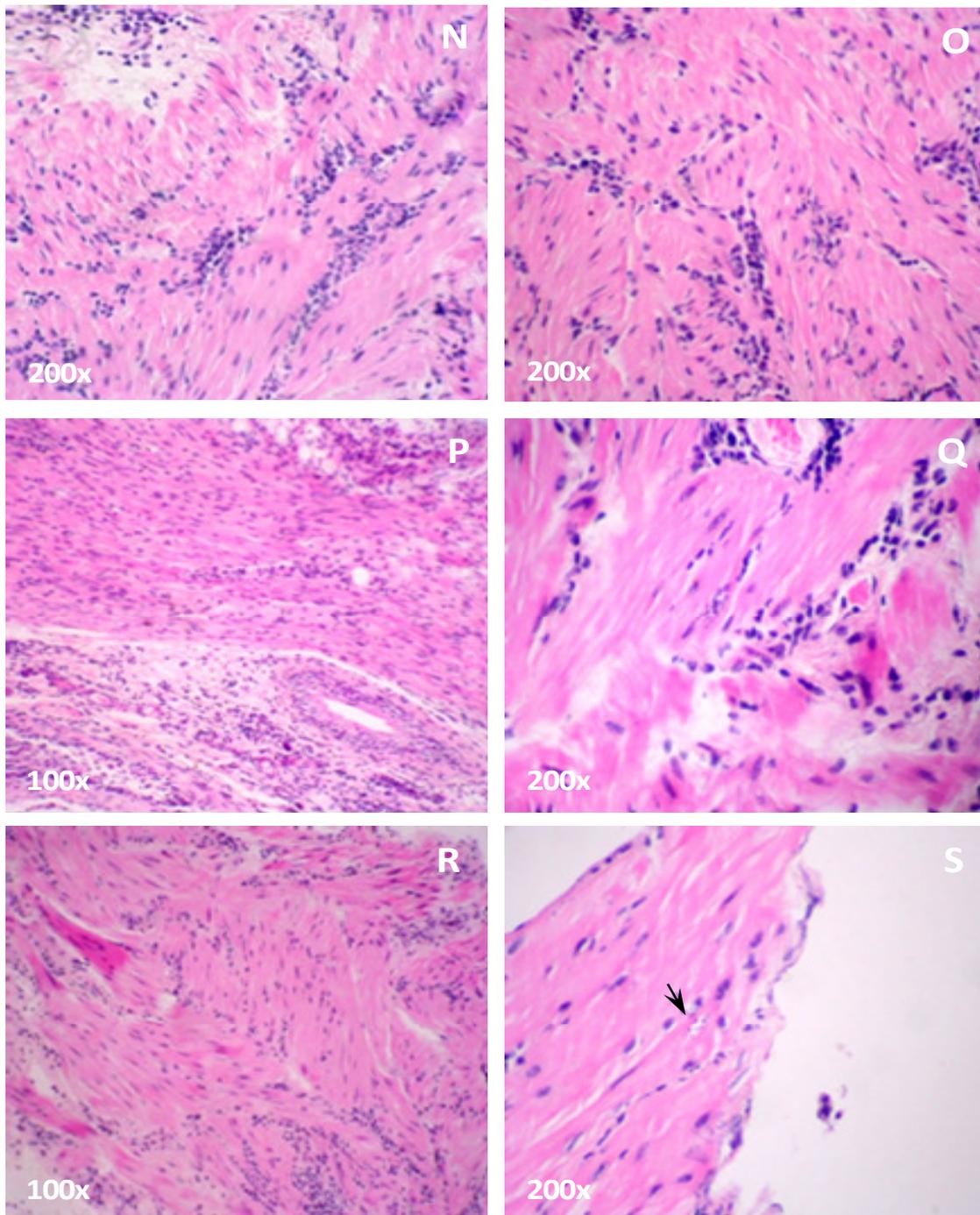


Figura 7: Fotomicrografias histológicas da musculatura lisa da bexiga coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens Swiss, Balb/c e C57BL/6 na fase aguda da infecção com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) dos isolados AQ1-7 (*Triatoma sordida* - BA) e ALVANI (*Panstrongylus megistus* - MG). **N e O:** Infiltrado inflamatório intenso e difuso, caracterizando-se como miosite. **P e Q:** Infiltrado inflamatório intenso e difuso. **R e S:** Infiltrado inflamatório difuso com desorganização de fibras musculares e parasitismo. Esse perfil histopatológico foi semelhante nas três linhagens de camundongos infectados com o isolado ALVANI e naqueles da linhagem Swiss infectados com o isolado AQ1-7 (Seta: ninho de amastigotas).

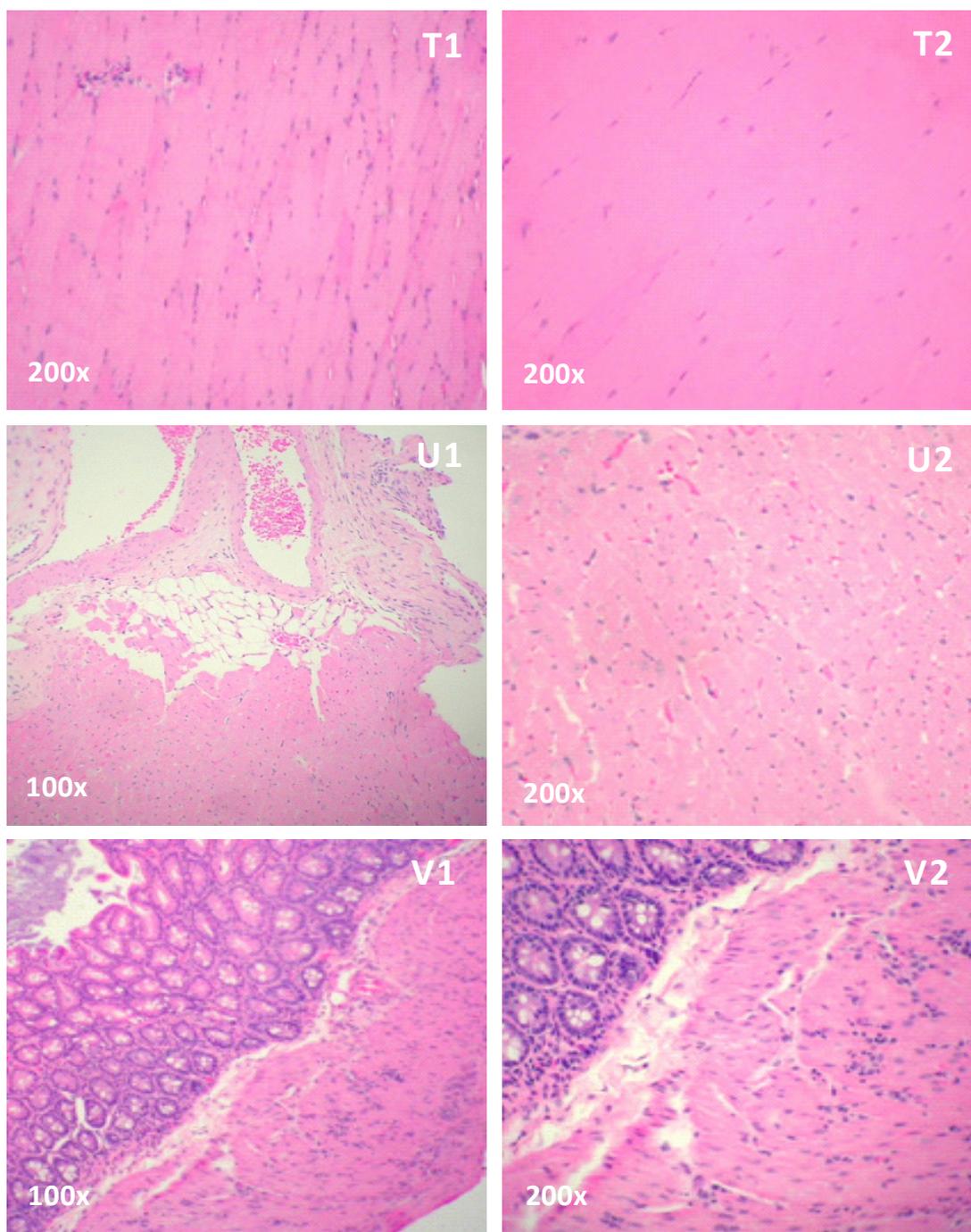


Figura 8: Fotomicrografias histológicas da musculatura esquelética, miocárdio e porção gastrointestinal, coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens Swiss, Balb/c e C57BL/6 na fase aguda da infecção com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) do isolado MUTUM (*Panstrongylus megistus* - MG) **T1 e T2:** Processo inflamatório discreto e focal na musculatura esquelética com ausência de parasitismo, porém, observa-se a preservação da arquitetura tecidual em grande parte do tecido. **U1 e U2:** Preservação da arquitetura tecidual cardíaca (atrial e ventricular) pela ausência de processos inflamatórios e parasitismo. **V1 e V2:** Miosites discretas e focais na porção gastroduodenal sem parasitismo. Este perfil histopatológico foi semelhante nas três linhagens de camundongos, sendo que, a linhagem Balb/c apresentou miocardites (ventriculares e atriais) discretas e focais.

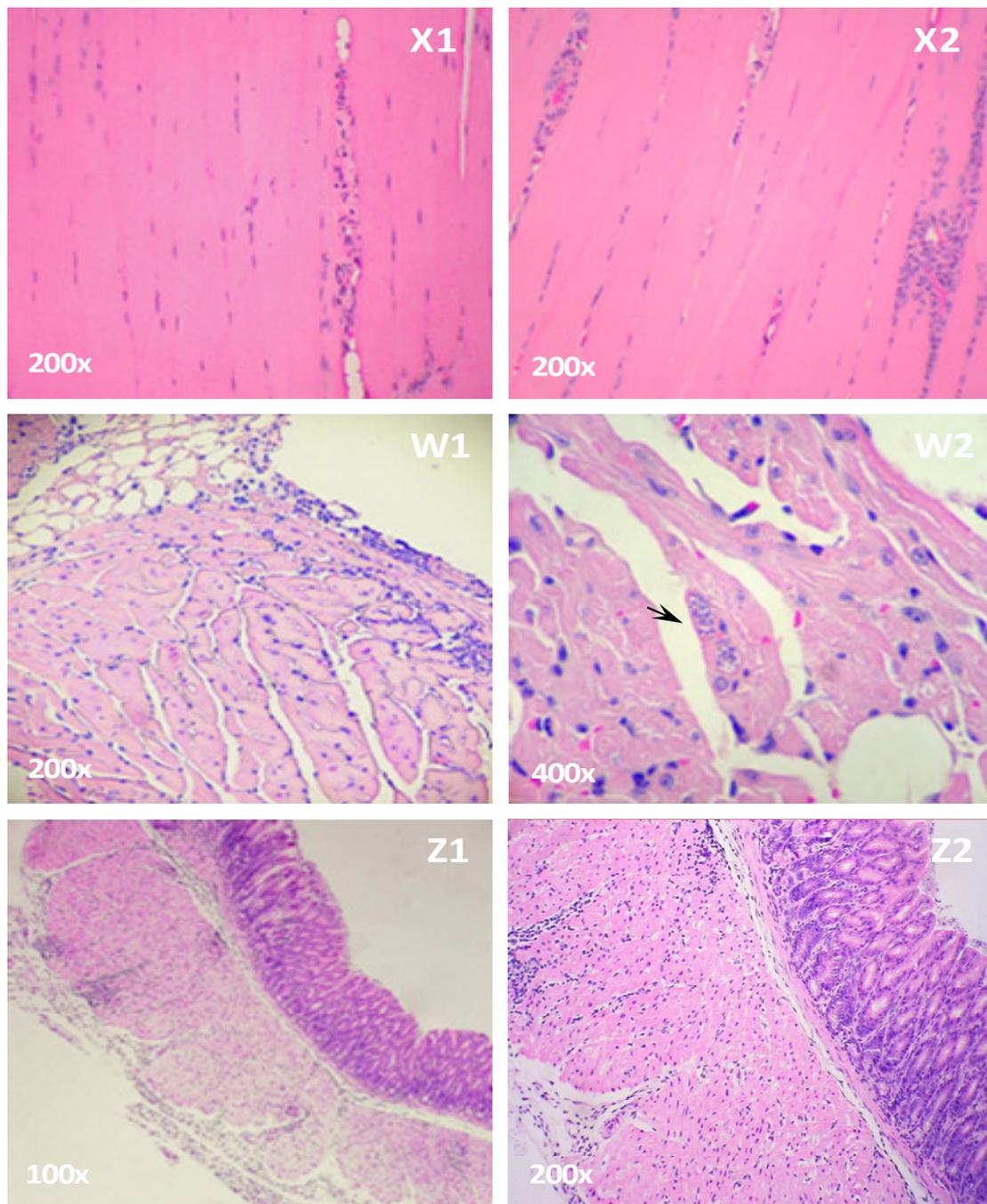


Figura 9: Fotomicrografias histológicas da musculatura esquelética, miocárdio e porção gastrointestinal, coradas com hematoxilina e eosina (H.E) de camundongos das linhagens Swiss, Balb/c e C57BL/6 na fase aguda da infecção com 10.000 tripomastigotas (via intraperitoneal) do isolado PV (Humano - RO). **X1 e X2:** Processos inflamatórios discretos e focais na musculatura esquelética com ausência de parasitos. **W1 e W2:** Miocardites moderadas e focais tanto no átrio quanto no ventrículo, sendo mais acentuada na união atrioventricular, seguido de parasitismo. **Z1 e Z2:** Miosites discretas e focais nas porções, gastroduodenal e íleo-cecal, com ausência de parasitos dispersos no tecido. Este perfil histopatológico foi observado nas três linhagens de camundongos, ao passo que, na linhagem C57BL/6 não se observou parasitismo (Seta: ninho de amastigotas).

5.4.2 ANÁLISE DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E PARASITISMO TECIDUAL PELA HISTOPATOLOGIA

Os isolados de TcI apresentaram comportamento tecidual diversificado no que se refere à virulência e patogenicidade como demonstrado pela análise conjunta dos resultados obtidos pela HE, PCR e IPI (intensidade do processo inflamatório). O isolado AQ1-7 foi o que apresentou maior patogenicidade avaliada pela maior capacidade de multiplicação tecidual como detectado pela HE (45,8%) e maior intensidade do processo inflamatório. O isolado ALVANI foi classificado como de média patogenicidade com parasitismo tecidual também detectado pela HE, porém, em menor percentual (10,4%) e processo inflamatório discreto a moderado. Já o isolado MUTUM foi considerado de baixa patogenicidade uma vez que apresentou processos inflamatórios discretos e baixo parasitismo tecidual em todas as amostras analisadas o qual foi evidenciado exclusivamente pela PCR (54,2%), sobretudo quando comparado com ALVANI (94,4%) e AQ1-7 (83,3%) (Tabela 9) (Figura 10).

Apesar da baixa sensibilidade da HE na detecção dos parasitos teciduais em relação à PCR a positividade desta técnica possibilitou uma estreita comparação entre a presença do parasito e o IPI assim como avaliar um tropismo dessas populações, sobretudo nos isolados AQ1-7 e ALVANI. A PCR pode ser considerada uma ferramenta importante para avaliar o tropismo tecidual nos isolados de baixa multiplicação como demonstrado pelo isolado MUTUM. Sendo que, a análise dos três isolados do TcI mostrou que o coração foi o órgão mais parasitado como evidenciado pela HE nos isolados AQ1-7 (83,3%) e ALVANI (16,6%) e pela PCR no isolado MUTUM (66,7%). A musculatura lisa também apresentou elevado parasitismo detectado pela HE em AQ1-7 (33,3%) e ALVANI (16,6%) e pela PCR no isolado MUTUM (66,7%), seguido pela musculatura estriada e fígado/baço, comprovada pela presença de ninhos de amastigotas nos isolados AQ1-7 (66,6%) e ALVANI (8,3%) (Tabela 9) (Figuras 10 e 11).

Em relação ao isolado PV (TcIV) a HE evidenciou maior tropismo tecidual pelo coração (50,0%), e o parasito pode ser detectado na musculatura lisa, musculatura estriada e fígado/baço exclusivamente pela PCR (Tabela 9) (Figura 10 e 11).

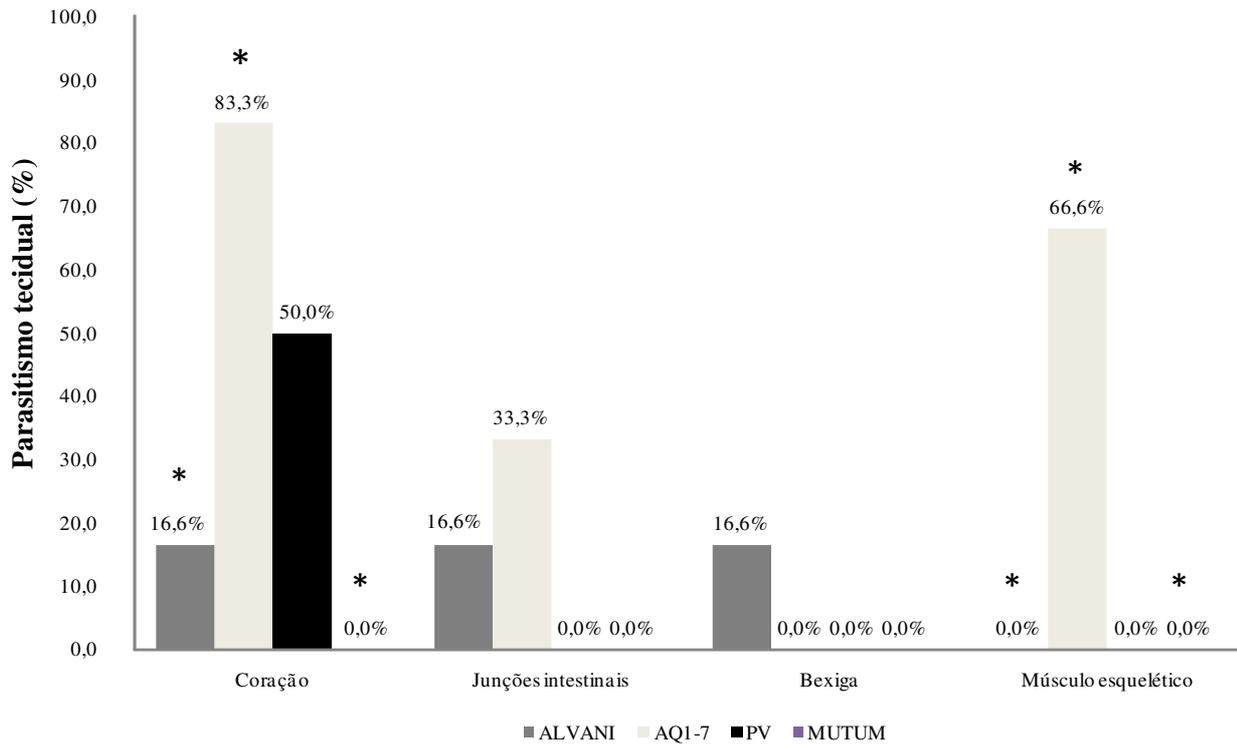


Figura 10: Parasitismo tecidual total referente às três linhagens de camundongos após análise histopatológica qualitativa (n = 6).

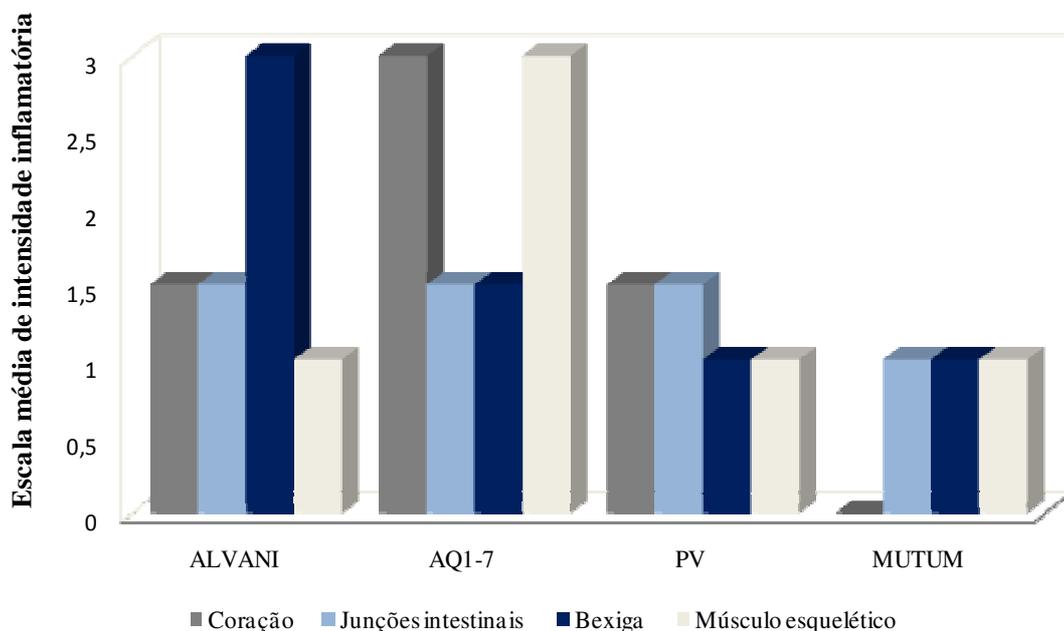


Figura 11: Média de intensidade do processo inflamatório no coração, junções intestinais, bexiga e musculatura esquelética nas três linhagens de camundongos, sendo considerado ausente (0), discreto (1), discreto a moderado (1,5), moderado (2,0) e moderado a intenso (3) (n = 6) (Chapadeiro, 1967).

Tabela 9: Distribuição do parasitismo tecidual dos isolados de *T. cruzi* avaliada pela PCR e HE e sua relação com a intensidade do processo inflamatório.

Isolados	ALVANI			AQ1-7			MUTUM			PV		
	HE	PCR	IPI	HE	PCR	IPI	HE	PCR	IPI	HE	PCR	IPI
Coração	16,6%	100%	1,5	83,3%	77,7%	3	0,0%	66,7%	0	50,0%	100%	1,5
Musculatura lisa	16,6%	94,4%	2	33,3%	88,8%	1,5	0,0%	66,7%	1	0,0%	83,3%	1,5
Musculatura estriada	0,0%	94,4%	1	66,6%	77,7%	3	0,0%	50,0%	1	0,0%	66,7%	1
Fígado/Baço	8,3%	88,9%	1	0,0%	88,9%	1,5	0,0%	33,3%	1	0,0%	66,7%	0
Média Total	10,4%	94,4%	1,5	45,8%	83,3%	2	0,0%	54,2%	1	12,5%	79,2%	1

Legenda: IPI - Intensidade do processo inflamatório (*score*) observado em 6 animais independente da linhagem: 0 - ausente; 1- discreto; 1,5 - discreto à moderado; 2 - moderado; 3 - moderado à intenso (Chapadeiro, 1967); HE - hematoxilina e eosina

5.5 AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE DO kDNA DOS ISOLADOS DE *T. CRUZI* I (ALVANI, AQ1-7 E MUTUM) E *T. cruzi* IV (PV) PELA TÉCNICA DE LSSP-PCR

5.5.1 PERFIS DE LSSP-PCR DOS INÓCULOS

A análise comparativa do kDNA das populações presentes no inóculo dos quatro diferentes isolados de *T. cruzi* amplificadas em meio LIT e utilizados na infecção dos camundongos, revelaram características próprias e perfis polimórficos agrupados em dois braços divergentes com 60,5% de similaridade entre si. Dos três isolados de TcI, dois deles, MUTUM e AQ1-7, foram geneticamente correlacionados e se agruparam em um braço, com 66,7% de bandas compartilhadas. O isolado ALVANI (TcI) se localizou em outro braço do fenograma com 77,8% de similaridade com PV caracterizado como TcIV (Figura 12).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
LSSP-PCR

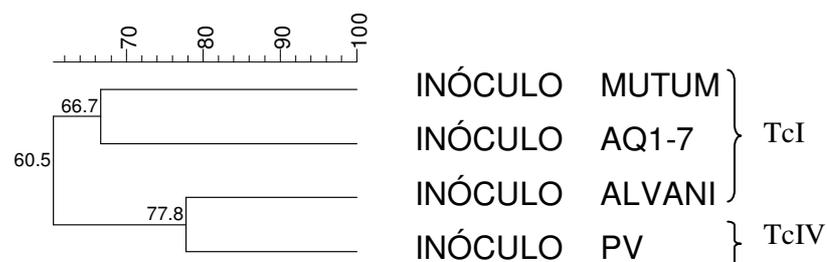


Figura 12: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* presentes nos inóculos de cada isolado após análise pelo LSSP-PCR.

5.5.2 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS ASSINATURAS GÊNICAS DOS ISOLADOS DO *T. CRUZI* EM CAMUNDONGOS Balb/c, C57BL/6 E Swiss

5.5.2.1. AMOSTRAS DO ISOLADO ALVANI

Foram avaliados os perfis genéticos gerados pela LSSP-PCR do kDNA de 13 amostras do isolado ALVANI representativas das três linhagens de camundongos estudadas e correspondentes ao inóculo (1), sangue (3), amostras do coração, músculo e bexiga (9) cujo fenograma mostrou três braços definidos um deles associados com as populações inoculadas e aquelas presentes no sangue do animal e os outros dois com as populações presentes nos tecidos (Figura 13).

O primeiro braço (I) constituído pela maioria das amostras (10/13) foi distribuído em dois subgrupos (IA e IB) com 70,7% de similaridade entre si. O grupo IA demonstrou uma elevada semelhança genética entre as amostras obtidas do inóculo e aquelas presentes no sangue dos camundongos (85,6% de bandas compartilhadas) independentemente da linhagem avaliada. O grupo IB representou 66,7% (6/9) das populações teciduais evidenciando nas linhagens Balb/c e C57BL/6 identidade genotípica (100% de compartilhamento das bandas) no coração e musculatura esquelética, demonstrando o quão semelhantes são estas populações entre si, independentemente da linhagem do hospedeiro (Figura 13).

Na linhagem de camundongo Swiss foi detectada maior variabilidade das populações teciduais do *T. cruzi* referente ao isolado ALVANI, uma vez que aquelas presentes na musculatura esquelética, coração e bexiga se agruparam em braços totalmente diferenciados, II, III e IB e pouco correlacionados. Curiosamente, a bexiga foi o tecido com populações mais heterogêneas apresentando no Swiss identidade total com aquelas do coração de Balb/c. Os animais Balb/c mostraram 88% de semelhança com as populações no tecido muscular do Swiss. Na bexiga de camundongos C57BL/6 as populações apresentaram 83,0% de semelhança com o grupo IB (Figura 13).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

LSSP-PCR

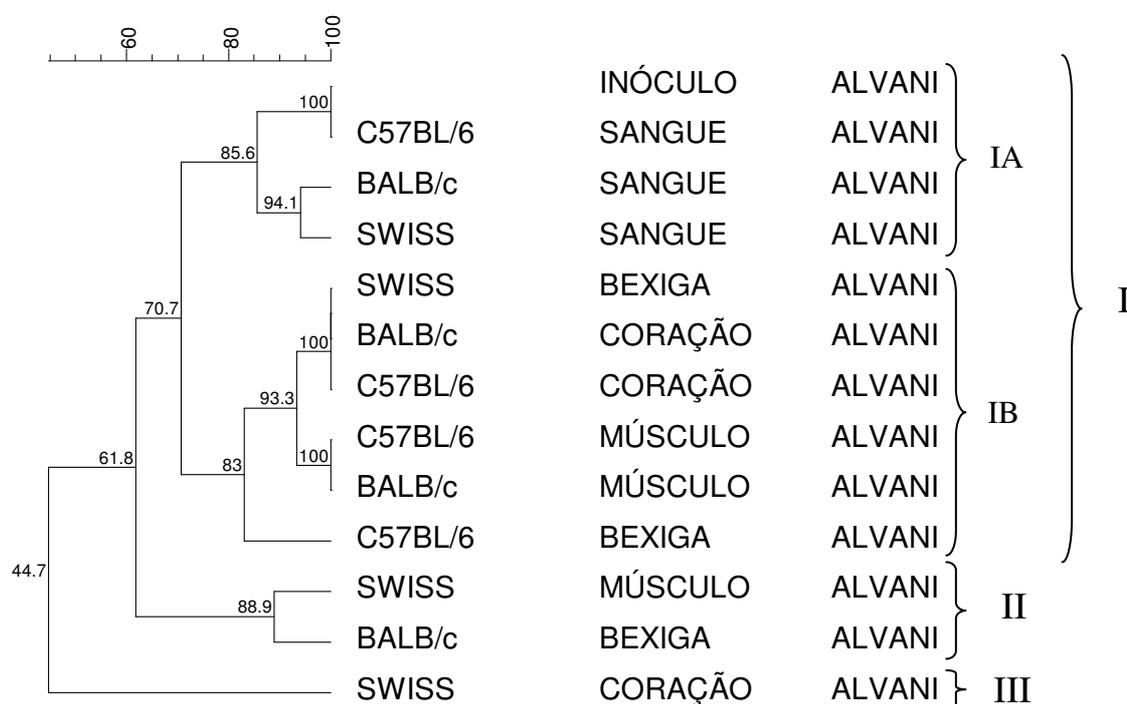


Figura 13: Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *T. cruzi* do isolado ALVANI no inóculo, sangue e tecidos (coração, músculo esquelético e bexiga) nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss.

5.5.2.2 AMOSTRAS DO ISOLADO AQ1-7

Foram analisados os perfis de LSSP-PCR de 12 amostras do isolado AQ1-7 correspondentes ao inóculo (1), sangue (2) e amostras do coração, músculo e bexiga (9) que na árvore filogenética foram agrupados em dois braços (I e II) divergentes com 65,9% de similaridade (Figura 14).

A maioria das amostras, 83,3% (10/12) foram distribuídas no braço I o qual, por sua vez, apresentou dois subgrupos (IA e IB), com 82,7% de semelhança entre os seus perfis de LSSP-PCR, sendo um deles associado com as populações do inóculo e sangue (IA) e o outro com as dos tecidos (IB). O grupo IA altamente homogêneo (90,8% de compartilhamento genético) foi constituído pelas populações do inóculo e do sangue e o grupo IB associado com as populações presentes nos tecidos (89,7% de bandas compartilhadas). Essas semelhanças demonstram uma conservação das características genéticas do isolado na maioria das amostras na fase aguda da infecção independente das linhagens de camundongos avaliadas (Figura 14).

No segundo braço (II) pode-se observar um distanciamento das características genéticas das populações do parasito localizados na bexiga em relação às demais amostras teciduais (65,9% de similaridade). As populações do parasito, presentes na bexiga dos animais das linhagens Swiss e Balb/c foram idênticas entre si e divergentes em relação às presentes na bexiga dos animais C57BL/6. No entanto, essa ultima apresentou identidade total com às do músculo esquelético nesta mesma linhagem e na linhagem Balb/c (Figura 14).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

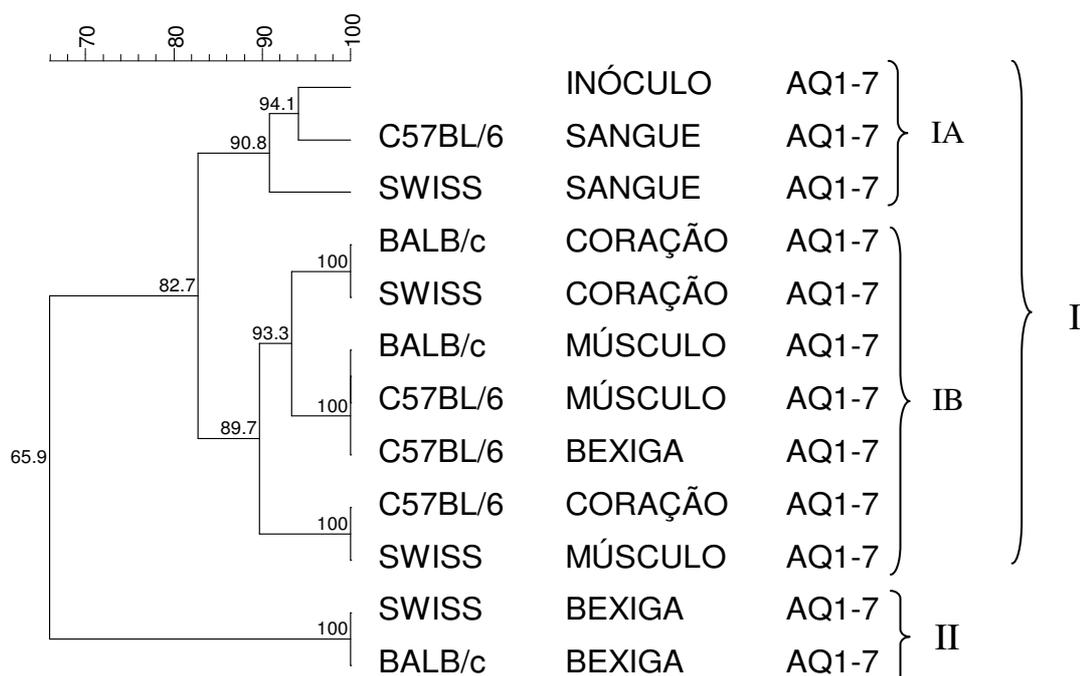
LSSP-PCR

Figura 14: Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *T. cruzi* do isolado AQ1-7 no inóculo, sangue e tecidos (coração, músculo esquelético e bexiga) nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss.

5.5.2.3 AMOSTRAS DO ISOLADO MUTUM

Foram analisados os perfis de LSSP-PCR de 15 amostras do isolado MUTUM, correspondentes ao inóculo (1), cultura (6) e amostras do coração, músculo, junções intestinais e bexiga (8). Essas foram localizadas na árvore filogenética em dois braços divergentes com 79,8% de similaridade e associados com amostras do inóculo e cultura em um deles e amostras teciduais em outro (Figura 15).

No agrupamento (I) 7/15 amostras (46,6%) foram distribuídas em dois subgrupos, um deles constituído pelas populações do parasito inoculadas nos animais e o outro com as hemoculturas realizadas aos 15° e 60° dia de infecção. Foi observada uma similaridade de 85,0% entre populações inoculadas e aquelas isoladas pela hemocultura que apresentaram 94,1% de identidade entre si, independentemente das linhagens de camundongos (Figura 15).

No agrupamento (II) foi detectada elevada similaridade (variação de 82,8% a 100%) entre as populações teciduais do isolado MUTUM independente dos órgãos e das linhagens de camundongos avaliadas (Figura 15).

Esses dados sugerem manutenção das características genotípicas das populações referentes ao isolado MUTUM em diferentes tecidos e linhagens de camundongos, não ocorrendo variações importantes em relação a uma pressão seletiva por parte do sistema imunológico dos camundongos na fase aguda da doença de Chagas experimental.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

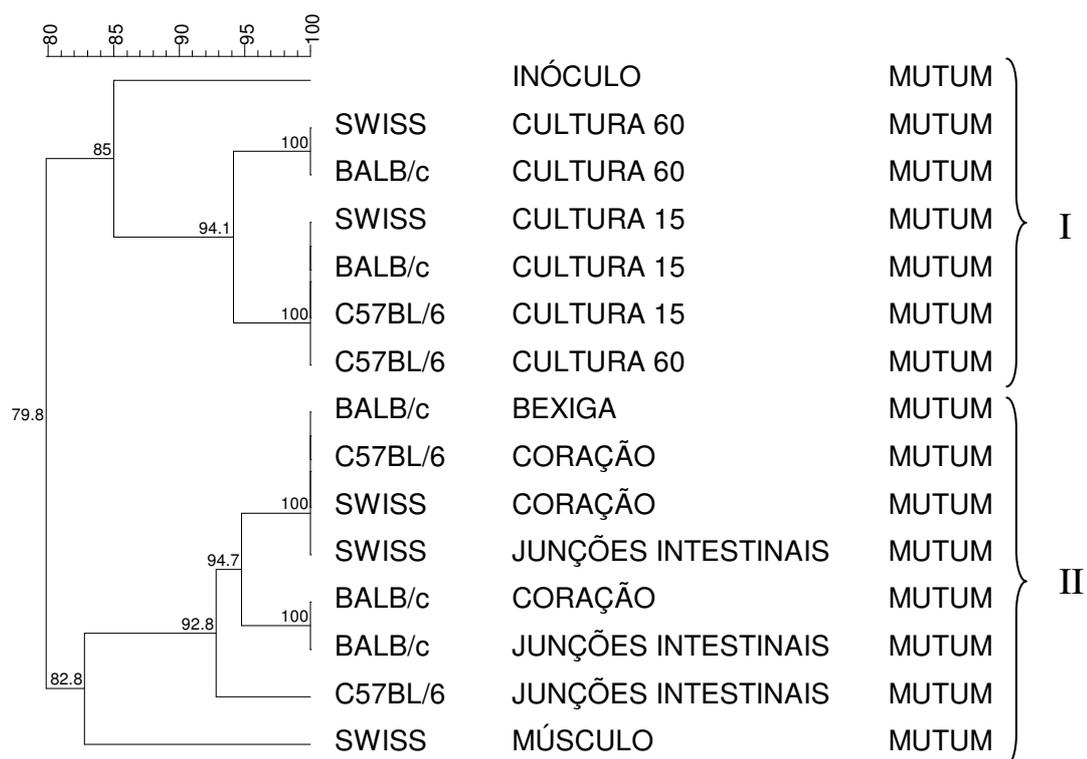
LSSP-PCR

Figura 15: Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *T. cruzi* do isolado MUTUM no inóculo, culturas (15° e 60° dia) e tecidos (coração, músculo esquelético e junções intestinais) nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss.

5.5.2.4 AMOSTRAS DO ISOLADO PV

O estudo filogenético referente ao isolado PV, avaliou 17 amostras referentes ao inóculo (1), sangue (2), culturas do 15° e 60° dia (5) e tecidos (9). As amostras foram localizadas em dois braços divergentes com 75,8% de compartilhamento genético, sendo que o braço I foi subdividido em IA e IB, estando o agrupamento IA associado com amostras do inóculo e culturas (15° e 60° dia) e o agrupamento IB associado com amostras teciduais, ao passo que o agrupamento II apresentou associação entre amostras de sangue e tecidos (Figura 16).

A maioria das amostras 70,58% (12/17) foram distribuídas no braço I que apresentou dois subgrupos (IA e IB) com 81,0% de similaridade entre si, sendo que o agrupamento IA foi associado com amostras do inóculo e de culturas (15° e 60° dia) independente das linhagens de camundongos, demonstrando identidade pelo alto compartilhamento genético (94,1% a 100% de similaridade), ao passo que, o agrupamento IB associado com amostras teciduais referentes apenas às linhagens Swiss e C57BL/6, apresentou 91,8% a 100% de similaridade genética (Figura 16).

O braço II, constituído por 29,4% (5/17) das amostras evidenciou 84,1% de similaridade entre amostras teciduais referentes à linhagem Balb/c e amostras de sangue referentes às linhagens Balb/c e Swiss, demonstrando alta semelhança genética entre as amostras (Figura 16).

Observou-se a presença de uma variabilidade genética entre as populações de *T. cruzi*, referente ao isolado PV, havendo uma conservação de características relacionadas ao kDNA do parasito observadas entre os dois agrupamentos, com similaridade genética importante de 75,8% (Figura 16).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
LSSP-PCR

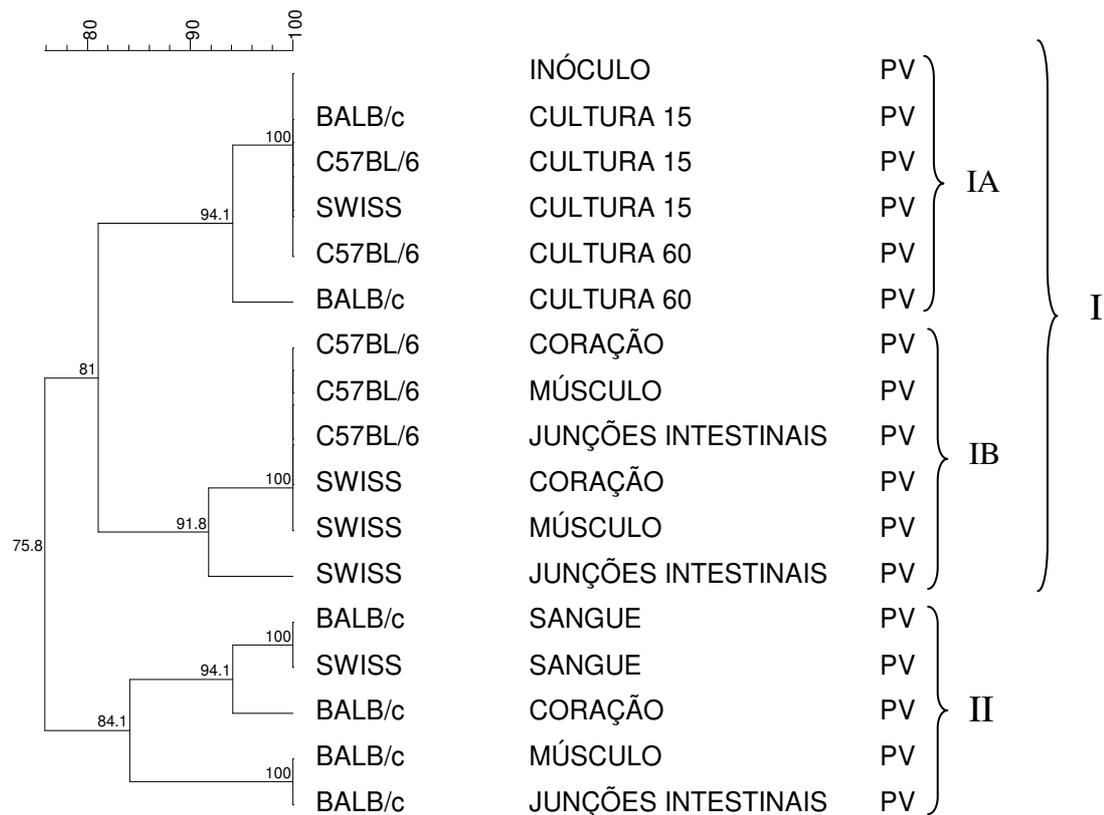


Figura 16: Fenograma referente aos perfis de LSSP-PCR das populações de *T. cruzi* do isolado PV no inóculo, culturas (15° e 60° dia), sangue e tecidos (coração, músculo esquelético e junções intestinais) nas linhagens de camundongos Balb/c, C57BL/6 e Swiss.

5.5.3 VARIABILIDADE DO kDNA DAS POPULAÇÕES TECIDUAIS DOS ISOLADOS DO *T. CRUZI* NA LINHAGEM Balb/c

A análise da variabilidade do kDNA das populações teciduais dos diferentes isolados de *T. cruzi* na linhagem Balb/c, demonstrou perfis específicos para cada isolado distribuídos em dois braços heterogêneos (I e II) com 61,9% de similaridade. Observou-se que PV e ALVANI foram geneticamente correlacionados, localizados no braço I, referentes aos subgrupos IA e IB respectivamente com 79,3% de semelhança genética, por outro lado, no braço II, a maioria de amostras referentes aos isolados AQ1-7 e MUTUM, associaram-se, demonstrando 69,2% de bandas compartilhadas localizados nos subgrupos IIA e IIB respectivamente (Figura 17).

As populações teciduais dentro de cada isolado foram altamente homogêneas com 94,7%, 93,3% e 87,5% de similaridade respectivamente para MUTUM, ALVANI e PV. Entre amostras teciduais referentes ao isolado AQ1-7 observamos populações com elevada similaridade (93,3%) na musculatura esquelética e no miocárdio, porém, diferentes daquelas da bexiga, a qual por sua vez foi geneticamente correlacionada com o isolado ALVANI (subgrupos IC e ID) (Figura 17).

Esses dados reforçam a manutenção das características genéticas intrínsecas de cada isolado, com diferenças marcantes inter-isolado, porém, elevada similaridade intra-isolado, como foi demonstrado anteriormente entre os inóculos. A similaridade das populações presentes na bexiga entre diferentes isolados sugere um possível tropismo de alguns clones específicos do parasito nessa linhagem de camundongo.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
LSSP-PCR

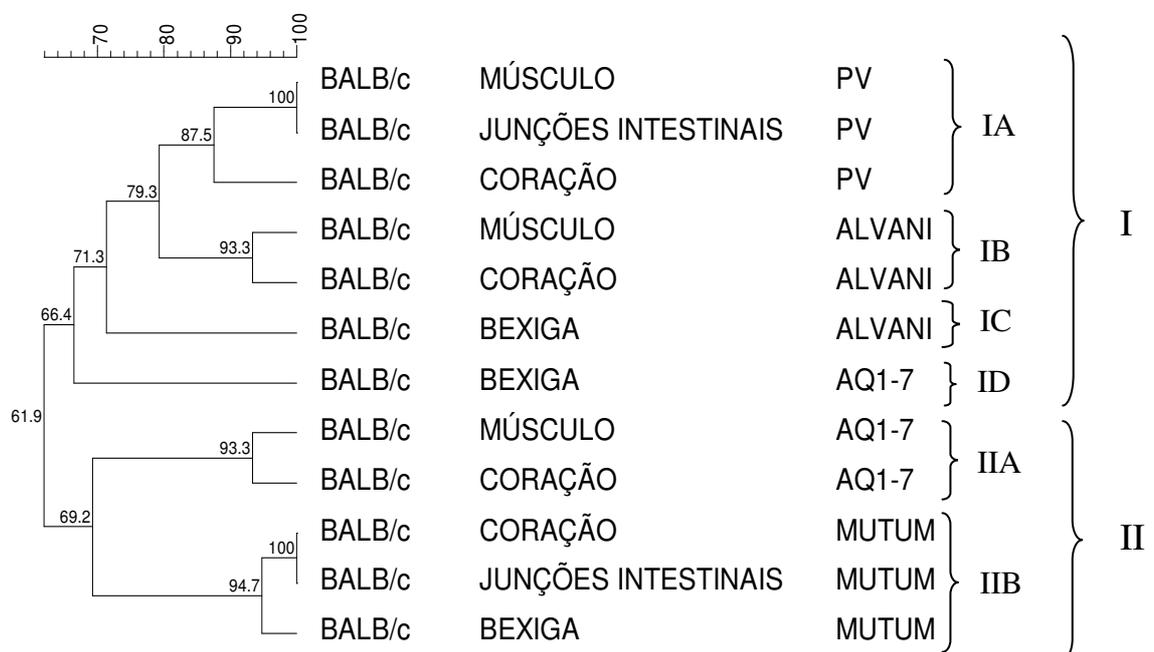


Figura 17: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* dos quatro isolados nos tecidos da linhagem Balb/c após análise pelo LSSP-PCR.

5.5.4 VARIABILIDADE DO kDNA DAS POPULAÇÕES TECIDUAIS DOS ISOLADOS DO *T. CRUZI* NA LINHAGEM C57BL/6

O fenograma representativo dos perfis de LSSP-PCR realizado entre amostras teciduais referentes aos isolados de *T. cruzi* na linhagem C57BL/6, demonstrou também uma distribuição específica e homogênea entre os isolados, comparado à análise em camundongos Balb/c e Swiss. Apresentou uma maior conservação das características de cada isolado, com a permanência da semelhança genética entre os isolados PV e ALVANI; AQ1-7 e MUTUM com 71,9% e 57,1% de compartilhamento genético respectivamente, observado entre os agrupamentos (I e II) e (III e IV) (Figura 18). Novamente, observou-se alta similaridade entre populações na musculatura esquelética e miocárdio, referentes ao isolado ALVANI, talvez determinando um miotropismo por musculatura estriada (Figura 18).

Levando em consideração a característica imunológica da linhagem C57BL/6, esperava-se maior seleção com maior heterogeneidade intra e inter-específica pela pressão imunológica possivelmente induzida aos parasitos, característica desta linhagem, no entanto, observou-se um perfil cepa-dependente, onde o comportamento gênico das populações de *T. cruzi*, talvez tenha sido mais eficiente que o *background* genético do hospedeiro.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

LSSP-PCR

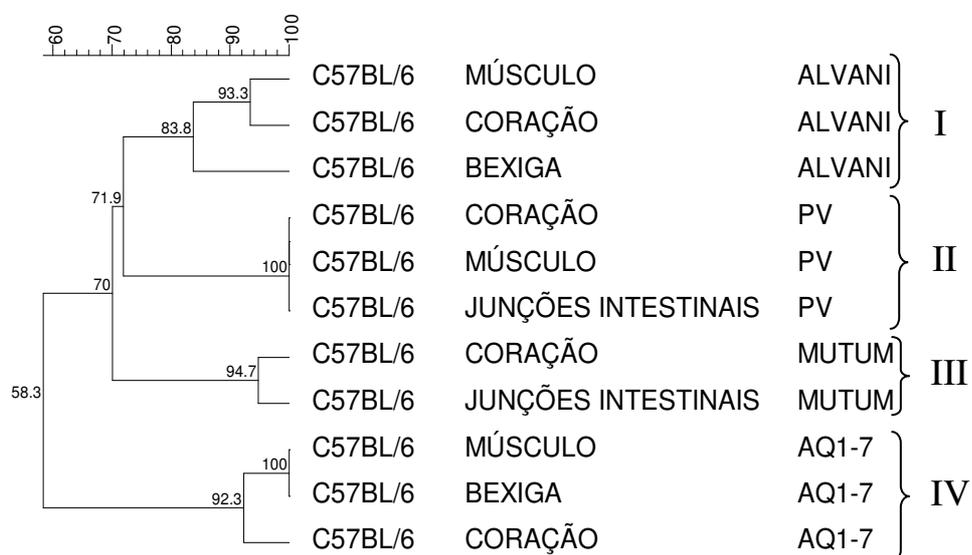


Figura 18: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* dos quatro isolados nos tecidos da linhagem C57BL/6 após análise pelo LSSP-PCR.

5.5.5 VARIABILIDADE DO kDNA DAS POPULAÇÕES TECIDUAIS DOS ISOLADOS DO *T. CRUZI* NA LINHAGEM Swiss

A análise filogenética referente às amostras teciduais entre os isolados de *T. cruzi* na linhagem Swiss, apresentou uma heterogeneidade não observada anteriormente nas linhagens C57BL/6 e Balb/c, principalmente em relação ao isolado ALVANI (Figura 19).

Foram evidenciados dois braços (I e II), no entanto, o primeiro fragmentou-se em três subgrupos (IA, IB e IC) com 68,5% de similaridade, compostos necessariamente por amostras referentes a isolados de TcI. O braço II, foi composto por amostras teciduais referentes ao isolado PV (TcIV) e uma amostra (músculo esquelético) referente ao isolado ALVANI, talvez pela semelhança genética observada anteriormente entre estes dois isolados (Figura 19).

Apenas o agrupamento IA foi mais homogêneo, representado por amostras teciduais do isolado AQ1-7, variando entre 77,4% a 85,7% de similaridade. As amostras do isolado ALVANI apresentaram uma diferença genética importante entre si, agrupadas nos braços IB, IC e II e evidenciaram um compartilhamento genético com amostras referentes aos isolados MUTUM e PV, principalmente (82,4% e 71,7%) (Figura 19).

Amostras referentes aos isolados MUTUM e PV apresentaram identidade entre si (82,4% e 94,1% de compartilhamento), mesmo apresentando similaridade com amostras do isolado ALVANI, evidenciando uma conservação de suas características (Figura 19).

A linhagem Swiss possui características indeterminadas em relação à resposta imunológica, e isso pode ter influenciado durante o envolvimento do sistema imunológico com determinadas populações em alguns tecidos, tornando a análise intra-específica mais heterogênea e com menor identidade genética, principalmente em relação ao isolado ALVANI, que apresentou uma heterogeneidade importante em relação as suas características próprias na linhagem Swiss.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

LSSP-PCR

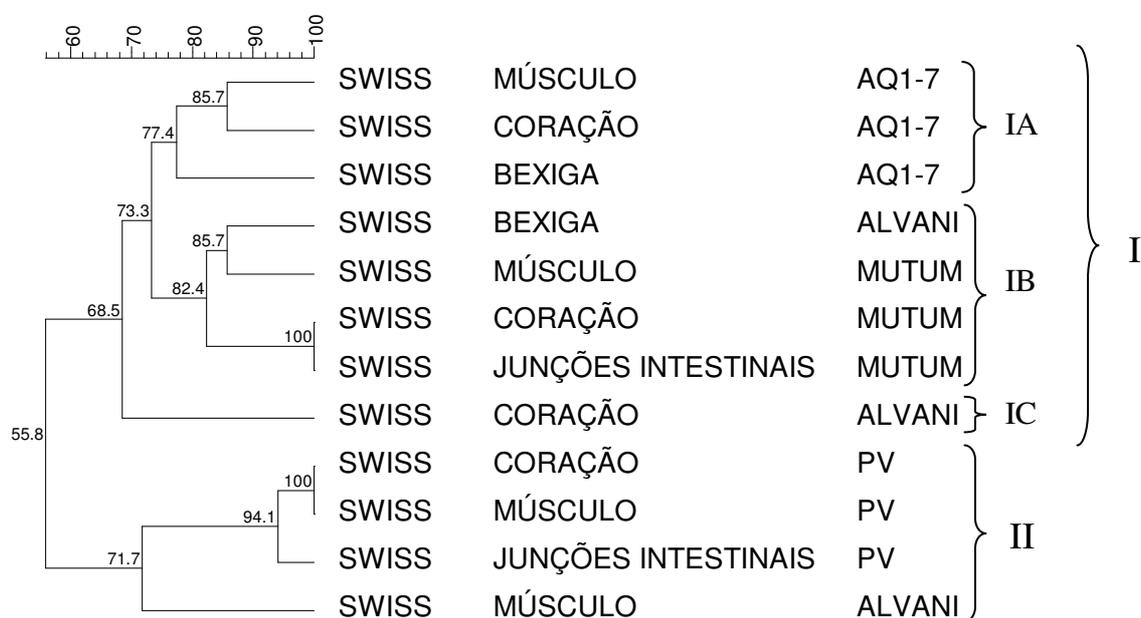


Figura 19: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* dos quatro isolados nos tecidos da linhagem Swiss após análise pelo LSSP-PCR.

5.5.6 ANÁLISE COMPARATIVA DA VARIABILIDADE DO kDNA DAS POPULAÇÕES DE *T. CRUZI* DO INÓCULO, SANGUE, CULTURAS E TECIDOS DE CADA ISOLADO NAS TRÊS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS

5.5.6.1 AMOSTRAS DO ISOLADO ALVANI

A análise filogenética intra-específica de populações de *T. cruzi* referentes ao isolado ALVANI nas linhagens C57BL/6 (A), Swiss (B) e Balb/c (C), demonstrou uma homogeneidade genética relativa entre as populações do inóculo, sangue e tecidos (Figura 20).

As três linhagens (A, B e C) apresentaram ampla identidade entre as populações do inóculo e do sangue (100%, 82,4%, 88,9% de compartilhamento respectivamente), ao passo que, as populações teciduais se distanciaram geneticamente em relação às populações no inóculo e do sangue (69,9%, 43,5%-70,8%, 66,5%-66,7% de compartilhamento, respectivamente), demonstrando similaridade importante entre as populações de *T. cruzi* em cada tecido (Figura 20).

A linhagem Swiss apresentou um perfil genético menos homogêneo em relação às outras linhagens, havendo maior interação entre as populações do inóculo, sangue e tecidos, possivelmente relacionados com uma instabilidade da resposta imunológica característica desta linhagem.

As populações de *T. cruzi* referentes ao isolado ALVANI na bexiga, demonstraram um perfil de semelhança com as populações do inóculo e sangue nas três linhagens de camundongos com 83,8% no agrupamento A, 70,8% no agrupamento B e 66,7% no agrupamento C, talvez associado a uma variação da resposta imunológica em determinados tecidos (Figura 20).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

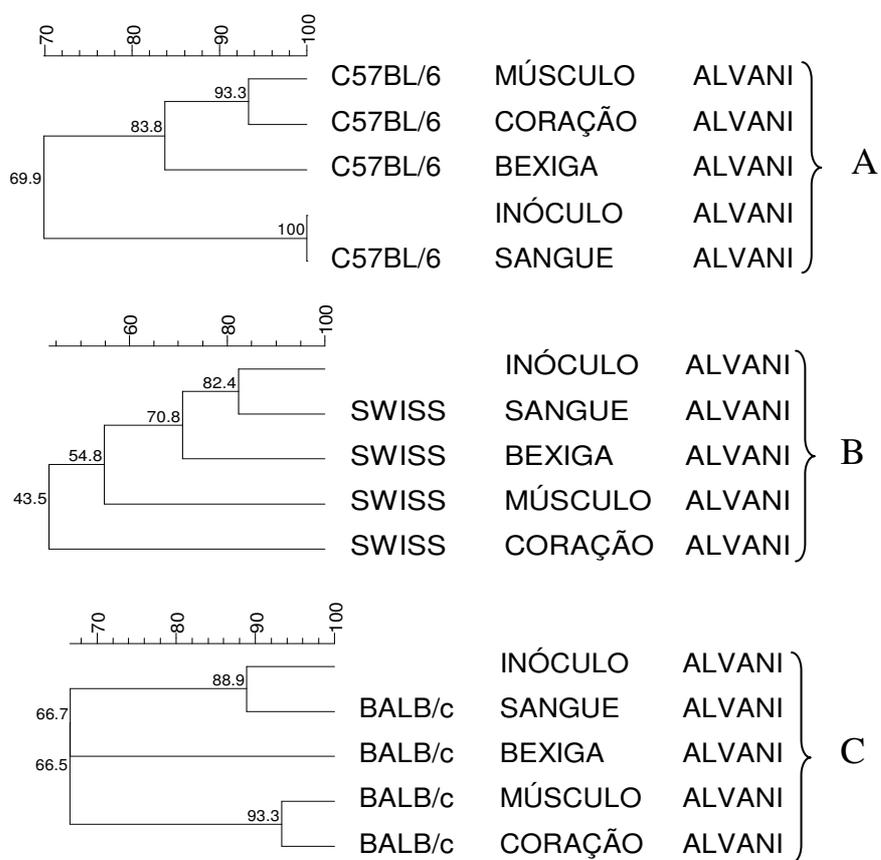
LSSP-PCR

Figura 20: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* do isolado ALVANI no inóculo, sangue e tecidos nas três linhagens de camundongos separadamente após análise pelo LSSP-PCR.

5.5.6.2 AMOSTRAS DO ISOLADO AQ1-7

O fenograma representativo da análise intra-específica referente ao isolado AQ1-7 nas linhagens de camundongos C57BL/6 (D), Swiss (E) e Balb/c (F), evidenciou um compartilhamento genético observado anteriormente durante a análise referente ao isolado ALVANI, preservando as diferenças genotípicas entre amostras teciduais em relação às do inóculo e sangue (83,5%, 70,2% e 58,2%-77,5% de compartilhamento respectivamente) (Figura 21).

No entanto, a linhagem Swiss, especificamente nesta análise, apresentou maior definição em relação às diferenças genotípicas entre as populações do inóculo e sangue e as populações teciduais referente à análise com o isolado ALVANI (70,2% de similaridade) (Figura 21).

As populações de *T. cruzi* no inóculo e no sangue apresentaram ampla similaridade entre si, ao passo que, as populações teciduais, distanciaram-se geneticamente das populações do inóculo e sangue, porém, observou-se algum compartilhamento genético entre elas (Figura 21).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

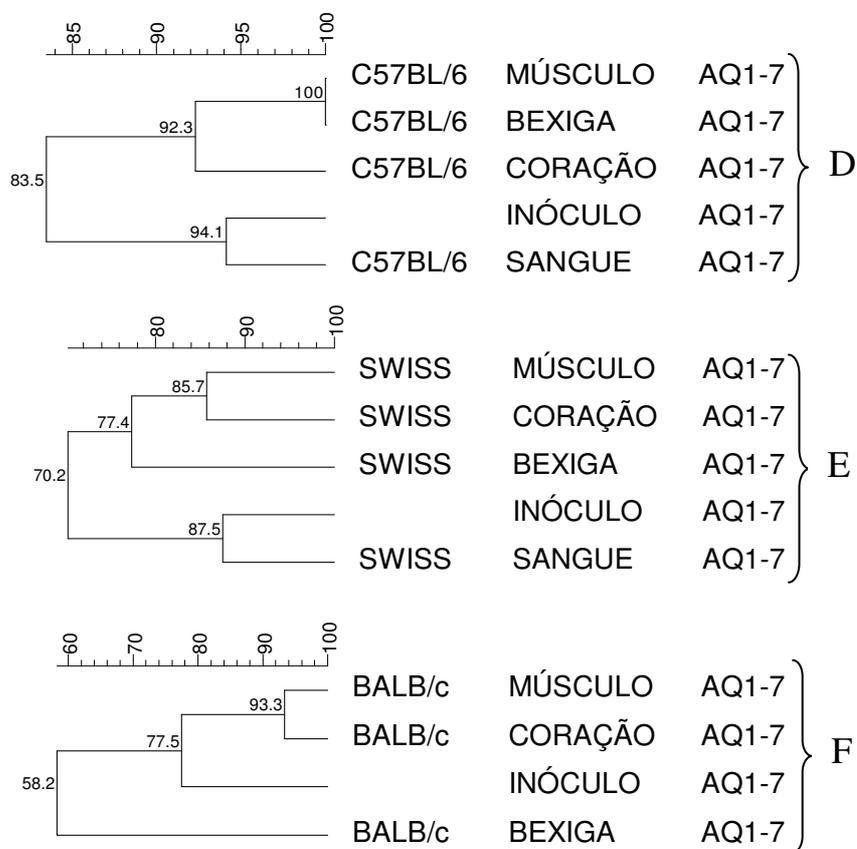
LSSP-PCR

Figura 21: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* do isolado AQ1-7 no inóculo, sangue e tecidos nas três linhagens de camundongos separadamente após análise pelo LSSP-PCR.

5.5.6.3 AMOSTRAS DO ISOLADO MUTUM

A análise filogenética intra-específica das populações de *T. cruzi* referentes ao isolado MUTUM nas linhagens C57BL/6 (G), Swiss (H) e Balb/c (I), demonstrou-se mais heterogênea comparada às análises anteriores referentes aos isolados ALVANI e AQ1-7, pelo compartilhamento observado entre amostras de cultura (15° e 60° dia) e tecidos, em relação às amostras do sangue e tecidos nas análises anteriores (Figura 22).

A linhagem C57BL/6 (G) demonstrou um padrão semelhante às demais análises, porém, neste caso, o inóculo apresentou uma identidade genotípica importante em relação às populações de *T. cruzi* em cultura (15° e 60° dias), independentemente do período (Figura 22).

As linhagens Swiss e Balb/c (H e I) apresentaram um perfil heterogêneo em relação às populações do inóculo, culturas e tecidos, apresentando alta similaridade entre as populações teciduais e em cultura (15° e 60° dias) com 86,6% e 86,2% respectivamente, seguido pela população do inóculo com 77,2% e 77,6% respectivamente (Figura 22).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
LSSP-PCR

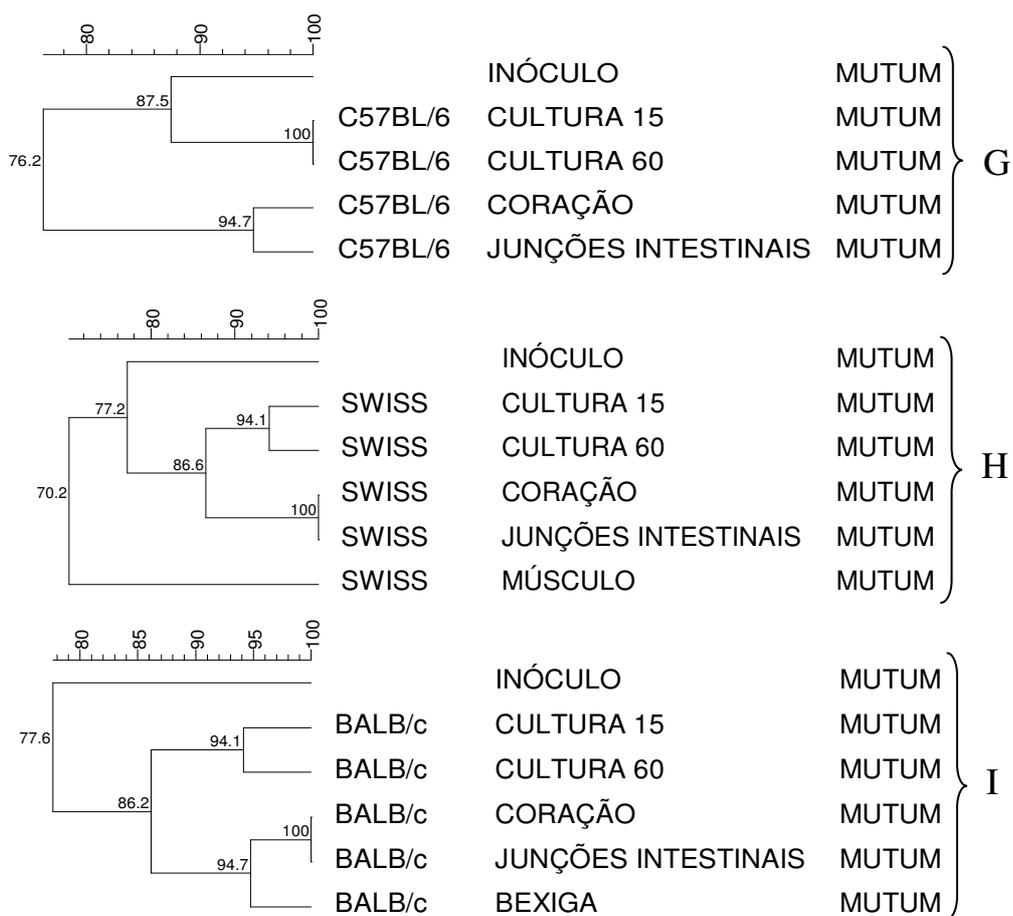


Figura 22: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* do isolado MUTUM no inóculo, culturas e tecidos nas três linhagens de camundongos separadamente após análise pelo LSSP-PCR.

5.5.6.4 AMOSTRAS DO ISOLADO PV

A análise filogenética intra-específica do isolado PV nas linhagens C57BL/6 (J), Swiss (K) e Balb/c (L), demonstrou um perfil homogêneo em relação às populações de *T. cruzi* do inóculo, culturas, sangue e tecidos (Figura 23).

Observou-se um predomínio no compartilhamento gênico entre as populações do inóculo e culturas (15° e 60° dias), independentemente do período, considerando as populações geneticamente idênticas nas três linhagens de camundongos (100%, 100% e 94,1-100% de similaridade, respectivamente) (Figura 23).

As populações de *T. cruzi* do sangue e dos tecidos demonstraram ampla identidade na linhagem Balb/c (94,1%), porém, observado com menor intensidade na linhagem Swiss, que neste caso apresentou similaridade média de 76,3% em relação às populações do inóculo, culturas e tecidos (Figura 23).

Esta análise demonstra uma possível seleção natural e por parte do hospedeiro nos tecidos, a partir de uma pressão imunológica sistêmica e, possivelmente, com características independentes entre tecidos (Figura 23).

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
LSSP-PCR

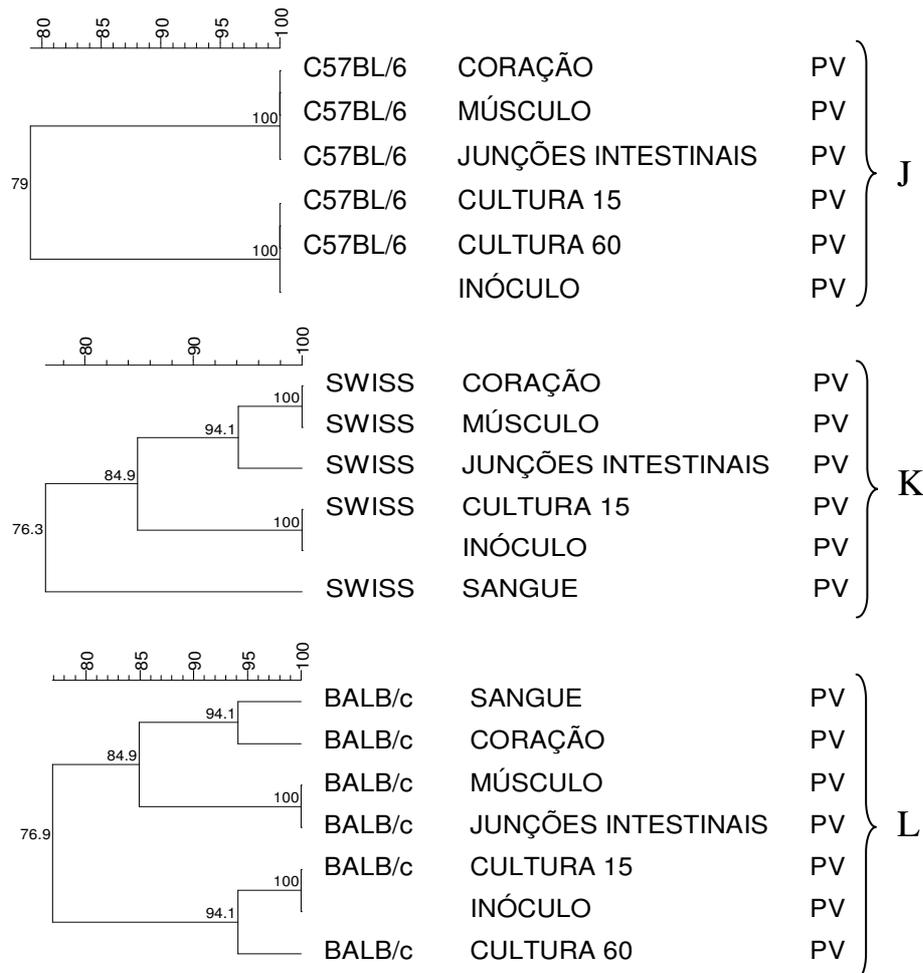


Figura 23: Fenograma referente às populações de *T. cruzi* do isolado PV no inóculo, sangue, culturas e tecidos nas três linhagens de camundongos separadamente após análise pelo LSSP-PCR.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Nas últimas décadas têm ocorrido mudanças epidemiológicas na transmissão da doença de Chagas que podem ter influenciado no processo adaptativo de vetores silvestres e das populações de *T. cruzi*, desencadeando possivelmente variações no comportamento biológico e genotípico de ambos.

A partir de meados dos anos 40 foram iniciados estudos focados no desenvolvimento de inseticidas, tais como o gammexane (BHC), para a eliminação de vetores em áreas endêmicas (Dias & Coura, 2008). Em consequência, houve redução de determinadas espécies de triatomíneos, e, em 2004, a OMS incluiu, além do Brasil, países como Chile e Uruguai livres da transmissão vetorial pelo *T. infestans*, considerado o principal responsável pela transmissão vetorial no ciclo doméstico. Esse fato influenciou no processo adaptativo de algumas espécies de vetores silvestres como o *P. megistus* na região do Triângulo Mineiro, *T. sordida* no estado da Bahia e *T. brasiliensis* no estado do Rio Grande do Norte, gerando uma transição entre os ciclos onde populações do *T. cruzi* do ambiente silvestre foram incorporados ao ambiente doméstico.

A importância da manutenção da vigilância epidemiológica no controle da transmissão da doença de Chagas no país pode ser comprometida pela crescente descentralização das ações de saúde à perda de financiamento em toda a região endêmica (Dias *et al.*, 2002). Estudos recentes vêm demonstrando aumento na ocorrência de infecções agudas em humanos, com populações do parasito ligadas ao ciclo silvestre, em países como Venezuela, Colômbia e México, porém, acompanhadas de manifestações compatíveis às observadas em infecções agudas causadas por isolados do ciclo doméstico (Añes *et al.*, 2004). Na Argentina tem sido registrado casos agudos a partir da reinfecção de comunidades rurais pelo vetor, devido a ausência de um sistema de vigilância sustentável (Gurtler, 2005). No nordeste do Brasil, o *T. brasiliensis* infectado pelo *T. cruzi* foi encontrado no domicílio em regiões onde os programas de controle têm sido descontínuos (Sarquis *et al.*, 2004). Além disso, o *T. infestans*, embora em baixa densidade, ainda está presente em vários municípios brasileiros, o que pode ser uma importante ameaça, devido à capacidade de repovoamento desse vetor

(Dias *et al.*, 2002). Portanto, estes relatos indicam o risco de reinfestação das zonas borrifadas com inseticidas por vetores silvestres (Scholfield *et al.*, 2006, Diotaiuti *et al.*, 2000; Assis *et al.*, 2007), sendo que, no Brasil, a incidência de infecções por via congênita e oral são os maiores causadores de infecções nos últimos anos (Coura, 2006).

O *T. cruzi* I inserido no ciclo silvestre e o *T. cruzi* II, inserido no ciclo doméstico assim como as DTU híbridas (III, IV, V e VI) (Zingales *et al.*, 2009), são alvos de estudos moleculares necessários para o acompanhamento de mudanças relacionadas à evolução biológica a partir de fatores genéticos do hospedeiro e do parasito, e à virulência e patogenicidade destas populações em relação às infecções humanas.

Vários pesquisadores têm sugerido que isolados de TcI devem estar associados com baixa patogenicidade em humanos (Ruiz *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1999), correlacionando esta hipótese com as infecções que evoluem para a forma indeterminada na bacia Amazônica. Porém, este DTU tem sido associado à infecções graves como meningoencefalites, cardiomiopatia e doenças gastrointestinais (megaesôfago e megacôlon) (Zingales *et al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2002; Coura *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 2004; Sanchez-Guillén *et al.*, 2006; Brenière *et al.*, 2007; Samudio *et al.*, 2007; Acquatella, 2007; Burgos *et al.*, 2008). Dados recentes tem demonstrado na Colômbia a presença de TcI e infecções mistas com ambos DTU (TcI e TcII) em pacientes com cardiomiopatia e formas digestivas da doença de Chagas (Mantilla *et al.*, 2010; Flórez *et al.*, 2010). Estas divergências estão possivelmente relacionadas à alta variabilidade genética (Jaramillo *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 2006) ou subdivisões dentro das populações de TcI (Diosque *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2007; O'Connor *et al.*, 2007; Coura *et al.*, 2010).

6.2 PARASITISMO SANGUÍNEO

A análise do parasitismo sanguíneo de três isolados de *T. cruzi* I (ALVANI, AQ1-7 e MUTUM) na fase aguda da infecção foi avaliada por diferentes técnicas e evidenciou baixo parasitismo do TcI pela hemocultura (20,5% - 24/117) nas três linhagens de camundongos (Swiss, Balb/c e C57BL/6) o qual foi associado com a parasitemia subpatente e detecção do parasito apenas pela hemocultura e PCR. O comportamento das populações do TcI no sangue do hospedeiro foi cepa-dependente e não influenciado pela linhagem do animal.

O baixo parasitismo sanguíneo poderia estar relacionado com a criopreservação, ativação e manutenção dos parasitos cultivados em meios artificiais. No entanto, o estudo do isolado silvestre PV, mantido nas mesmas condições dos isolados do TcI, demonstrou que a capacidade infectante do isolado se manteve, como evidenciado pela parasitemia patente detectada pelo exame fresco nas três linhagens de camundongos. Esse dado contradiz estudos que relataram a diminuição da virulência e infectividade em estoques de *T. cruzi* não clonados durante longo tempo em cultura ou mantidos em camundongos (Romanha *et al.*, 1979; Taliaferro & Pizzi, 1954) e reforça a possível característica dos isolados de TcI em expressarem baixa virulência durante a fase aguda na infecção experimental. Vários pesquisadores têm sugerido que isolados de TcI devem estar associados com baixa patogenicidade em humanos (Ruiz *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1999). Dados de Bertoli *et al.*, (2006) demonstraram, após infecção experimental com oito isolados de TcI, parasitemia subpatente pelo exame a fresco em sete isolados e hemoculturas negativas em cinco isolados analisados, corroborando com os achados do presente estudo e reforçando a característica de baixa infectividade inserida nas populações de TcI durante a infecção em camundongos.

O baixo parasitismo e a baixa virulência evidenciados pelas amostras de TcI isoladas de triatomíneos, podem estar associados à não adaptação do parasito a hospedeiros vertebrados e à características genótípicas distintas de cada população (Andrade & Magalhães, 1996). Contudo, alguns autores sugerem que a manutenção seriada de isolados em camundongos possa induzir um aumento na virulência do parasito (Brener *et al.*, 1974; Magalhães *et al.*, 1985).

Diante do baixo parasitismo das populações do TcI aqui estudadas, verificamos que a amplificação do kDNA do *T. cruzi* pela PCR específica no sangue periférico foi o melhor método de detecção do parasito na fase aguda da infecção experimental em camundongos com 44,4% (8/18), seguido da hemocultura com 20,5% (24/117) e MH/EF, que demonstraram baixa sensibilidade para o acompanhamento da parasitemia. Apesar da hemocultura constituir uma técnica importante para a detecção do *T. cruzi* na circulação em infecções subpatentes (Brener, 1975), a PCR apresenta superioridade em relação aos métodos convencionais como xenodiagnóstico e hemocultura (Britto *et al.*, 2001).

A PCR é uma técnica molecular, porém, tem sido considerada como método parasitológico complementar no diagnóstico da doença de Chagas, cuja positividade é

influenciada diretamente pela parasitemia do hospedeiro (Avila *et al.*, 1993; Wincker *et al.*, 1994, Lages-Silva *et al.*, 2001).

A intermitência e a quantidade de parasitos circulantes no sangue de um hospedeiro infectado pelo *T. cruzi* são dependentes da constituição genética da população parasitária (Sanchez *et al.*, 1990), desse modo, a positividade global da PCR no sangue de apenas 44,4% reforça o baixo número de parasitos circulantes das populações do TcI.

As diferenças no parasitismo sanguíneo apresentadas pelos isolados do TcI foram cepa-dependentes. Sendo assim, o isolado MUTUM apresentou melhor capacidade de multiplicação no sangue como demonstrado pela hemocultura (66,7% - 18/27) e estatisticamente significativo pela PCR (83,3% - 5/6) ($p < 0,05$) em relação aos demais isolados de TcI que apresentaram baixa positividade. O isolado PV (TcIV), apresentou parasitemia patente na fase aguda, com alta positividade na hemocultura no 15° e 60° dia, ao passo que, evidenciou uma sobrevida de 100% dos camundongos nas três linhagens, designando este isolado de característica silvestre, como pouco patogênico, porém, com alta infectividade.

A resposta imune celular é um fator importante no controle do *T. cruzi* em todas as fases e seu desequilíbrio pode resultar em aumento do parasitismo tecidual e sanguíneo (Sartori *et al.*, 1999), possivelmente relacionado com a alta patogenicidade apresentada pelos isolados ALVANI e AQ1-7 evidenciada pela análise histopatológica. Curiosamente, estes isolados apresentaram baixo parasitismo sanguíneo demonstrado pela baixa capacidade de multiplicação em cultura e baixa positividade da PCR nas três linhagens de camundongos, provavelmente correlacionado a uma susceptibilidade pela resposta Th2 do hospedeiro e/ou ausência de mecanismos de evasão característicos de algumas populações de *T. cruzi*. Garzon *et al.* (2005), propuseram que a lise de formas tripomastigotas circulantes por meio do sistema complemento explique o fato de algumas cepas apresentarem baixos níveis de parasitos sanguíneos e teciduais e alta sobrevida na fase aguda em hospedeiros vertebrados.

O comportamento do isolado MUTUM, que apresentou parasitemia mais elevada que ALVANI e AQ1-7, talvez esteja relacionado a mecanismos de evasão à resposta imune do hospedeiro como “capping”, “shedding” e “fabulation”, os quais proporcionam a manutenção de determinadas populações do parasito no sangue periférico. Estes mecanismos podem constituir fatores determinantes para explicar o perfil cepa-dependente observado neste trabalho e relacionado à superioridade do

isolado MUTUM em permanecer na circulação durante a fase aguda. As formas sanguíneas do *T. cruzi* são capazes de induzir uma mobilidade aos antígenos de superfície agregando os complexos antígenos-anticorpos em uma das extremidades do parasito eliminando-os posteriormente como demonstrado na cepa Y do *T. cruzi*, este mecanismo é denominado de *capping* e quando este complexo é eliminado, ele é denominado por *shedding* (Schmuñis *et al.*, 1980). Outro processo de evasão do parasito detectado na cepa CL é a *fabulation*, no qual o *T. cruzi* secreta uma enzima semelhante à papaína que cliva a imunoglobulina aderida aos sítios de ligação do parasito degradando o fragmento Fc, desse modo, o parasito inibe a ativação da resposta imune mediada por anticorpos e células (Krettli *et al.*, 1979). Como relatado por Ruiz *et al.* (1998) algumas populações de parasitos não expressam a proteína gp90 relacionada com a inibição da mobilização do cálcio necessário para a invasão celular, tornando estas populações altamente infectantes.

Dados na literatura relatam que macrófagos teciduais e monócitos sanguíneos também são potencialmente capazes de destruir o *T. cruzi* por mecanismos associados com imunofagocitose (Villalta & Kierszenbaum, 1984). Este dado pode se relacionar com o macrofagotropismo evidenciado pelos isolados ALVANI (HE e PCR tecidual) e AQ1-7 (PCR tecidual) ao contrário do isolado MUTUM que demonstrou baixo parasitismo no fígado e baço, justificando a elevada parasitemia revelada pela hemocultura neste último e baixa nos demais.

De acordo com Andrade, (1985) o comportamento biológico e os perfis histopatológicos de isolados de *T. cruzi*, possibilitam o seu agrupamento em três biodemas distintos: I, II e III. Neste estudo, apesar das diferenças biológicas evidenciadas entre o isolado MUTUM e os demais isolados, foi possível associar o comportamento biológico dos três isolados de TcI utilizados neste trabalho, com o biodema III, sobretudo pela baixa multiplicação observada nos isolados ALVANI e AQ1-7, o acometimento da musculatura esquelética e pela mortalidade inexistente na fase aguda. Dados na literatura têm demonstrado que os genótipos 19 e 20 do TcI também apresentam comportamento diferenciado, onde o genótipo 20 evidenciou características semelhantes aos isolados do biodema III com picos de parasitemia mais elevados entre o 20º e 30º dia e miotropismo enquanto o genótipo 19 apresentou níveis de parasitemia mais baixos e multiplicação mais lenta (Toledo *et al.*, 2004).

Atualmente, tem sido relatadas diferentes manifestações clínicas nas infecções humanas pelo TcI em diversas regiões endêmicas. As infecções humanas agudas no

México, Venezuela e Colômbia (Añes *et al.*, 2004) podem evoluir para formas clínicas graves, no entanto, formas brandas ou ausência de manifestações graves ocorrem na Amazônia brasileira (Coura, 2010), fato esse que pode estar associado com a variabilidade genética das populações do TcI e com a hipótese de que clones principais do parasito TcI estejam distribuídos em determinadas regiões geográficas (Tibayrenc & Ayala, 1988; Campos *et al.*, 1996).

Como proposto por Vallejo & Gulh, (2009) subpopulações específicas de tripanossomas são transmitidas, frequentemente, por vetores específicos em áreas geográficas definidas. No entanto, os isolados ALVANI e AQ1-7 que são provenientes de triatomíneos e regiões geográficas distintas (*P. megistus* de Minas Gerais e *T. sordida* da Bahia respectivamente) demonstraram que a diversidade geográfica e os diferentes vetores de origem não determinaram características biológicas distintas, uma vez que estas duas populações apresentaram comportamento semelhante e foram isoladas em regiões geograficamente distantes. No presente estudo, foi demonstrado experimentalmente o comportamento polar do TcI observado nos humanos.

Os isolados ALVANI e AQ1-7 apresentaram maior patogenicidade nas três linhagens de camundongos, ao passo que, MUTUM, apesar de ter sido isolado na mesma região geográfica e da mesma espécie de hospedeiro invertebrado que ALVANI, não apresentou patogenicidade na fase aguda da infecção experimental em camundongos. Esse dado sugere a existência de clones com comportamento biológico polar circulando ou não em uma mesma região geográfica.

Dados na literatura sugerem que as populações do TcI continuam sendo populações mais homogêneas do que o TcII, contudo, a diversidade intra-específica inserida nas populações de TcI têm sido recentemente relatada.

Herrera *et al.* (2007) e Falla *et al.* (2009) sub classificaram a linhagem TcI em quatro haplótipos (a, b, c, d) e determinaram características biológicas distintas entre os isolados de diferentes regiões. O haplótipo Ia foi relacionado com vetores domiciliados e humanos, o haplótipo Ib à vetores silvestres e infecções humanas, o haplótipo Ic ainda não está completamente caracterizado, existindo indícios que o insere no ciclo silvestre e o haplótipo Id, que parece estar associado com ambientes silvestres e à diferentes vetores e reservatórios como *R. prolixus* e *D. marsupialis* na Colômbia.

Os clones 19 e 20 do TcI são intimamente relacionados no ponto de vista genético e se agrupam pela análise de 22 *locos* isoenzimáticos (Barnabé *et al.*, 2000). Contudo, esses genótipos são diferenciados no *locos* isoenzimático 6-fosfogluconato

desidrogenase (6PGDH) (Tibayrenc & Ayala, 1988) sendo, o genótipo 20 associado com maior patogenicidade, como observado em clones do isolado Colombiana (Camandaroba *et al.*, 2001). Toledo *et al.* (2004) avaliaram 14 diferentes parâmetros relacionados com virulência e patogenicidade e mostraram que os genótipos 19 e 20 apesar de serem estreitamente relacionados diferem significativamente em quatro desses.

Considerando o comportamento biológico semelhante dos isolados ALVANI e AQ1-7, seria possível que os mesmos também apresentassem similaridade genética. Contudo, Kappel *et al.*, (2010 comunicação pessoal), classificou o isolado ALVANI como haplótipo Id, enquanto os isolados AQ1-7 e MUTUM não se encaixaram em nenhuma dessas divisões e pode ser mais um indício de que o isolado MUTUM represente uma população diferenciada do *T. cruzi* I ou talvez populações polares do TcI.

6.3 PARASITISMO TECIDUAL

Apesar dos isolados de TcI não terem induzido parasitismo sanguíneo, a presença do parasito dos três isolados foi detectada em 81,0% (175/216) dos tecidos analisados em sua maioria por meio da PCR com predomínio do mesmo na musculatura estriada e lisa. A elevada sensibilidade da PCR na detecção do *T. cruzi* tem sido demonstrada por vários autores (Jones *et al.*, 1993; Vago *et al.*, 1996; Añes *et al.*, 1999) e neste trabalho permitiu a detecção tecidual do TcI em todos os órgãos analisados. A baixa sensibilidade da HE para evidenciar o parasito nos tecidos tem sido relatada por diferentes autores (Barbosa & Andrade, 1984; Teixeira *et al.*, 1991) e aqui foi corroborada.

Os dados encontrados demonstraram tanto pela HE como pela PCR diferenças na intensidade do parasitismo tecidual do TcI com perfis cepa-dependente e maior parasitismo nos animais infectados com os isolados ALVANI e AQ1-7 que MUTUM, no qual o parasitismo tecidual só pode ser detectado pela PCR evidenciando o baixo potencial patogênico dessa população. Toledo *et al.*, (2004) mostraram que clones do grupo genético 20 relacionado com o TcI, e que apresentaram níveis mais elevados de parasitemia, apresentaram também maior parasitismo tecidual e reação inflamatória na fase aguda da infecção como proposto também por Marinho *et al.* (1999) e Garzon *et al.* (2005). Esses dados contrastam com nosso estudo, nos quais o potencial patogênico em

populações de TcI não foi necessariamente relacionado com os níveis de parasitemia uma vez que detectamos parasitismo tecidual e processos inflamatórios intensos associados com parasitemia subpatente nos isolados ALVANI e AQ1-7.

Na infecção experimental por diferentes patógenos o hospedeiro pode desempenhar papel importante na evolução da doença em função do tipo de sua resposta imune, sendo demonstrado que os animais isogênicos C57BL/6 apresentam uma resposta imune dominante Th1 e os Balb/c, uma resposta Th2 evidenciando, respectivamente, um caráter de resistência e susceptibilidade (Michailowsky *et al.*, 2001). A susceptibilidade de modelos Balb/c ao *T. cruzi* está associada com a produção de IL-4 como indicado pelos altos níveis parasito-específico de IgG1 em relação à IgG2a, quando comparado com o modelo C57BL/6. A IL-4 é considerada o maior fator mediador de susceptibilidade do modelo Balb/c infectado com a cepa Colombiana (TcI) como sugerido pelo baixo número de amastigotas, baixa parasitemia e baixa taxa de mortalidade em camundongos Balb/c IL-4 KO (Knockout). Alguns estudos sugerem que a IL-4 e IL-10 podem atuar em sinergia no controle da miocardite durante a infecção pelo *T. cruzi*, ao passo que, a IL-12 e INF- γ são essenciais para o controle do parasito na fase aguda após a infecção pelo *T. cruzi* (Michailowsky *et al.*, 2001).

Jackson & Tinsley, (2005) salientaram que diferenças relacionadas à susceptibilidade entre diferentes genótipos de hospedeiros modificam a resposta diante de diferentes genótipos de parasitos, elegendo o fator genético como um importante mediador durante a relação parasito-hospedeiro na patogênese da doença de Chagas. A análise do parasitismo tecidual pela HE demonstrou maior susceptibilidade da linhagem Balb/c (22,2%), seguido por C57BL/6 (11,1%) e Swiss (8,3%), contudo, a susceptibilidade de uma mesma linhagem frente às diferentes populações do TcI apresentou resultados divergentes, sendo observado que os animais da linhagem Balb/c se mostraram mais resistentes ($p < 0,001$) à infecção pelo isolado MUTUM (38,8% - 7/18) quando comparado com ALVANI: 100% (27/27) e AQ1-7: 92,5% (25/27).

Já a análise do comportamento de um mesmo isolado em diferentes modelos animais mostrou no isolado MUTUM maior susceptibilidade da linhagem C57BL/6 e maior resistência em relação à linhagem Balb/c (66,6% e 38,8% de positividade pela PCR respectivamente), contrariando as características imunológicas destas linhagens.

6.4 PATOGENICIDADE E TROPISMO TECIDUAL

Achados histopatológicos em infecções experimentais pelo *T. cruzi*, indicam o tropismo tecidual do parasito como sendo um importante fator de patogenicidade na doença de Chagas (Franco *et al.*, 2003; Andrade, 1990). De acordo com Franco *et al.* (2003), camundongos Balb/c infectados artificialmente com duas populações monoclonais de *T. cruzi*, revelaram diferentes tropismos teciduais durante a fase crônica da infecção experimental na doença de Chagas, o que demonstra que a variabilidade genética do parasito pode determinar o tropismo tecidual e desenvolver um importante papel na patogênese.

O potencial patogênico dos isolados do TcI aqui estudados foi cepa dependente e associado principalmente aos isolados AQ1-7 e ALVANI, os quais apresentaram, independente das linhagens de camundongos avaliadas, tropismo pela musculatura estriada e lisa, respectivamente. Já o isolado MUTUM não apresentou ninhos de amastigotas no tecido pela HE e apresentou apenas processo inflamatório discreto na musculatura lisa, evidenciando variabilidade e comportamento polar também no parasitismo tecidual. O isolado PV apesar da parasitemia patente observada na fase aguda, apresentou baixa patogenicidade comparado aos isolados AQ1-7 e ALVANI, com parasitismo tecidual evidenciado pela HE apenas na musculatura estriada cardíaca (50,0%), porém, foram observados processos inflamatórios discretos a moderados, tanto no miocárdio quanto nas junções intestinais.

De acordo com o parasitismo sanguíneo e tecidual classificamos os isolados MUTUM e PV como sendo de alta infectividade e baixa patogenicidade e os isolados ALVANI e AQ1-7 de baixa infectividade e alta patogenicidade. Dados na literatura mostram que os danos teciduais observados na fase crônica não estão necessariamente associados com a existência de parasitismo tecidual, uma vez que as reações auto-imunes podem ser desencadeadas por antígenos circulantes provenientes de parasitos destruídos pelo sistema imune (Tarleton, 1999). Além disso, o modelo histotrópico clonal sugere que devido ao tropismo diferencial dos vários isolados, os clones circulantes e disponíveis para o isolamento por hemocultura, podem ser diferentes daqueles responsáveis pela lesão tecidual (Macedo & Pena, 1998).

6.5 VARIABILIDADE GENÉTICA PELO LSSP-PCR

A LSSP-PCR é uma técnica capaz de detectar variações únicas e múltiplas em fragmentos alvo de DNA. Tem sido aplicada no estudo de doenças genéticas (Pena *et al.*, 1994) e na caracterização genotípica de diversos microorganismos (Villa *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2003).

A realização da LSSP-PCR a partir do kDNA do *T. cruzi* tem demonstrado que a variabilidade genética é um fator determinante na patogênese da doença de Chagas (Andrade *et al.*, 1999; Vago *et al.*, 2000). A alta sensibilidade da LSSP-PCR permite a caracterização direta de populações naturais do parasito. A simplicidade durante a execução, a rapidez e a elevada capacidade em produzir e reproduzir assinaturas gênicas torna esta técnica uma ferramenta útil nos estudos envolvendo a epidemiologia molecular na doença de Chagas (Salazar *et al.*, 2006).

Após o estudo do comportamento biológico e caracterização genética pelo kDNA de amostras de *T. cruzi*, observamos que não houve correlação entre o comportamento genético e biológico, pelo fato dos isolados ALVANI e AQ1-7 e MUTUM e PV evidenciarem importante semelhança biológica, não sendo reproduzido geneticamente após a análise pela LSSP-PCR, que demonstrou 77,8% de similaridade entre ALVANI e PV e 66,7% entre AQ1-7 e MUTUM. Bértoli *et al.* (2006), relataram uma elevada associação do comportamento biológico (infectividade) entre o hospedeiro e as respectivas amostras de *T. cruzi* isoladas, não estando relacionado ao grupo genético do parasito.

Vago *et al.* (2000) observaram uma similaridade importante entre o kDNA de amostras de *T. cruzi* provenientes de pacientes distintos que habitam a mesma região geográfica após a análise pela LSSP-PCR, sugerindo que isolados de *T. cruzi* da mesma região geográfica podem ser geneticamente semelhantes, e possivelmente ser um fator determinante no desenvolvimento das formas clínicas da doença de Chagas. Porém, em nosso estudo, foi evidenciado que as amostras de *T. cruzi* (ALVANI e MUTUM) isolados do mesmo hospedeiro invertebrado (*P. megistus*) e na mesma região geográfica (Uberaba/MG), não foram geneticamente correlacionadas após a análise pela LSSP-PCR.

O *T. cruzi* possui uma estrutura de população clonal apresentando também isolados policlonais. Desse modo, podem existir diferentes clones teciduais que desenvolvem um tropismo órgão seletivo (Andrade, 1974; Devera *et al.*, 2002),

relacionado à capacidade do hospedeiro vertebrado em atuar como um “filtro biológico” reduzindo a variabilidade genética na fase crônica da infecção (Macedo *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1998, 1999).

Vários estudos têm demonstrado que populações de *T. cruzi* isoladas de vetores e animais silvestres são geneticamente mais complexas comparadas às amostras obtidas de pacientes na fase aguda da doença de Chagas (Oliveira *et al.*, 1997, 1998; Gomes *et al.*, 1998; Diosque *et al.*, 2003). No entanto, a variabilidade genética observada em nosso estudo entre as populações de *T. cruzi* do inóculo, sangue e tecidos foi muito semelhante tanto nas amostras isoladas de vetores silvestres (ALVANI, AQ1-7 e MUTUM) quanto à amostra obtida de humano na fase aguda da doença (PV).

Neste trabalho, de acordo com os fenogramas apresentados, observamos uma elevada heterogeneidade entre os isolados avaliados com perfis de LSSP-PCR cepa-específicos, contudo, dentro de cada isolado detectamos elevada similaridade entre as amostras analisadas. Demonstramos também que o perfil genético do hospedeiro não interferiu na seleção de populações do parasito os quais mantiveram suas características genéticas independente da linhagem de camundongo. O isolado ALVANI apresentou 85,6% de similaridade entre populações do inóculo e sangue, no entanto, foi observada uma elevada heterogeneidade entre as populações teciduais, variando de 44,7% a 61,8% de similaridade, sugerindo a presença de populações policlonais. Em relação aos isolados AQ1-7 e MUTUM foi evidenciado 90,8% e 85,0% de similaridade entre populações do inóculo e sangue, 89,7% e 82,8% de similaridade entre os tecidos e 82,7% e 79,8% entre populações do inóculo, sangue e tecidos respectivamente, demonstrando uma elevada homogeneidade, sugerindo a existência de populações monoclonais.

Vago *et al.* (2000) demonstraram que clones presentes no tecido cardíaco de pacientes foram diferentes daqueles existentes no esôfago. Curiosamente, detectamos heterogeneidade de populações de *T. cruzi* na musculatura lisa da bexiga dos animais infectados com isolados ALVANI e AQ1-7 nas linhagens Balb/c e Swiss, fato talvez relacionado a um tropismo órgão seletivo e/ou policlonalidade de populações.

Foi evidenciada maior variabilidade genética na linhagem Swiss, talvez pela maior heterogeneidade individual desta linhagem, uma vez que não são isogênicos (Devera *et al.*, 2002). A utilização dessa linhagem visou reproduzir o que poderia acontecer na infecção humana devido à complexidade dos componentes genéticos e biológicos. Devera *et al.*, (2002), sugeriram que possa ocorrer simultaneamente

adaptação e seleção de parasitos tanto no camundongo, quanto em cultura, demonstrando que em nível biológico, bioquímico e molecular, os parasitos presentes após manutenção em meio de cultura *in vitro* e no camundongo poderão ser diferentes da cepa original, ocorrendo portanto um processo seletivo nestes sistemas.

No presente estudo, as populações existentes nas culturas (15° e 60° dia), sangue e tecidos demonstraram-se heterogêneas, sendo que as populações em cultura agruparam-se com as populações do inóculo (original) (observado por Devera *et al.* 2002 a partir da técnica de RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* do kDNA do *T. cruzi*) e do sangue evidenciando uma elevada similaridade, ao passo que, as populações teciduais apresentaram variabilidade genética importante em relação às demais populações, padrão este observado nos quatro isolados analisados, independente das linhagens de camundongos, reforçando a característica cepa-dependente evidenciado neste estudo e o indício de que a resposta imunológica nos órgãos e tecidos é mais intensa resultando em uma possível seleção natural e um aumento da variabilidade genética destes clones.

Quando se realiza a caracterização genética de isolados do parasito pelas técnicas existentes, o isolamento do *T. cruzi* mediante seu crescimento em animais experimentais ou meios de cultura se faz necessário. Esta condição pode levar a uma seleção de clones e, conseqüentemente, de populações de parasitos que estão presentes na cultura, mas que diferem das presentes no sangue ou tecidos dos hospedeiros (Devera *et al.*, 2002). Esta intensa variabilidade inserida no kDNA do parasito pode estar relacionado à diferentes fatores como a presença de diferentes classes de sequências dos minicírculos em cada parasito, altas taxas de mutações nas regiões variáveis, danos reversíveis nas sequências do kDNA ou baixa identidade entre elas (Lages-Silva *et al.*, 2006).

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Os isolados de TcI apresentaram parasitemia subpatente e uma variação na infectividade e patogenicidade, sendo ALVANI e AQ1-7 de baixa virulência e alta patogenicidade e MUTUM de alta virulência e baixa patogenicidade.
2. A infecção experimental dos isolados de *T. cruzi* I e IV em camundongos evidenciou um perfil cepa-dependente não influenciado pela linhagem do animal.
3. O tropismo tecidual evidenciado pelos isolados de TcI nas diferentes linhagens de camundongos foi pela musculatura estriada e lisa, sendo o coração o órgão mais parasitado.
4. Os isolados do TcI apresentaram comportamento biológico polar sendo detectada maior capacidade infectante para os tecidos em ALVANI e AQ1-7 e maior parasitismo pelo sangue em relação ao isolado MUTUM o qual foi semelhante ao isolado PV (TcIV).
5. A PCR foi à melhor técnica para detecção das populações do TcI no tecido e sangue seguida pela hemocultura.
6. A HE apesar da baixa sensibilidade foi capaz de demonstrar a diferença do parasitismo entre os isolados e entre as linhagens de camundongos.
7. Os isolados de *T. cruzi* estudados não apresentaram uma correlação entre o comportamento biológico e genotípico.
8. Os perfis de LSSP-PCR demonstraram elevada heterogeneidade entre os isolados de TcI avaliados com perfis exclusivos e cepa específico.
9. A variabilidade genética das populações teciduais do TcI foi cepa-dependente, com maior similaridade sugestiva de populações monoclonais em AQ1-7 e

MUTUM e maior heterogeneidade, possivelmente associada com policlonalidade em ALVANI.

10. As linhagens de camundongos não induziram seleção de populações sanguíneas ou teciduais do TcI, as quais se agruparam de acordo com cada o isolado.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**. v. 115, p. 1124-31, 2007.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. **Rev. Pat. Trop**, v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, S. G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 18, p. 29-38, 1985.

ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardial pathology in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 85, p.17-27, 1990.

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

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.; CHIARI, E.; PENA, S.; MACEDO, A.M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 100, p. 163–172, 1999.

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

AÑES, N.; CARRASCO, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; *et al.* Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, p. 726-732, 1999.

AÑES, N.; CRISANTE G.; da SILVA, FM.; ROJAS A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA E. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuela patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. **Trop Med: Health**, v. 9, p. 1319-1326, 2004.

- ÁVILA, H.A.; SIGMAN, D. S.; COHEN, L. M.; *et al.* Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. **Mol Biochem Parasitol.** v. 48, p. 211-22, 1991.
- AVILA, H. A.; PEREIRA, J. B.; THIEMANN, O.; *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. **J Clin Microbiol.** v. 31, p. 2421-6, 1993.
- BARBOSA, A. A.; ANDRADE, Z. A. Identificação do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.** v. 17, p. 123-126, 1984.
- BARNABÉ, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. **Parasitology.** v.120, p. 513-26, 2000.
- BERTOLI, M.; ANDÓ, M.H.; TOLEDO, M. J. O.; DE ARAÚJO, S. M.; GOMES, M. L. Infectivity for mice of *Trypanosoma cruzi* I and II strains isolated from different hosts, **Parasitol Res.** v. 99, p. 7-13, 2006.
- BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J. cell. Biol.** v. 106, p. 1349-1358, 1988.
- BOSSENO, M. F.; BARNABÉ, C.; MAGALLÓN GASTÉLUM, E.; *et al.* Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. **J Clin Microbiol.** v. 40, p. 627-32, 2002.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 4, p. 389-396, 1962.
- BRENER, Z.; CHIARI, E.; ALVARENGA, N. J. Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. **Rev Inst Med Trop.** v. 16, p. 39-46, 1974.

- BRENER, Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. **Adv Pharmacol Chemother.** v. 13, p. 1-81, 1975.
- BRENIÈRE, S. F.; BOSSENO, M. F.; MAGALLÓN-GASTELÚM, E.; *et al.* Peridomestic colonization of *Triatoma longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma barberi* (Hemiptera, Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in Jalisco state, Mexico. **Acta Trop.** v. 101, p. 249-57, 2007.
- BRIONES, M. R.; SOUTO R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol Biochem Parasitol**, v.104, p.219-32, 1999.
- BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Int J Parasitol.** v. 30, p. 35-44, 2000a.
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by sequence-characterized amplified region markers. **Mol Biochem Parasitol.** v. 11, p. 95-105, 2000b.
- BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **Int J Parasitol.** v. 31, p.1213-1226, 2001.
- BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; WINCKER, P.; MOREL, C. M. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.** v. 88, p. 171-172, 1993.
- BRITTO, C.; SILVEIRA, C.; CARDOSO, M. A.; MARQUES, P.; LUQUETTI, A.; MACÊDO, V.; FERNANDES, O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.** v. 96, p. 823-6, 2001.
- BURGOS, J. M.; BEGHER, S.; SILVA, H. M.; *et al.* Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. **Am J Trop Med Hyg.** v. 78, p. 294-7, 2008.

- BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. **Microbes Infect**, v. 5, p. 419-427, 2003.
- CAMANDAROBA, E. L.; CAMPOS, R. F.; MAGALHÃES, J. B.; ANDRADE, S. G. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 34, p. 151-7, 2001.
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S. E.; STUM, N. R. Transcription Kinetoplastid Protozoa: Why be normal? **Microbes infect**, v.5, p. 1231-40, 2003.
- CAMPOS, R. M.; ANDRADE, S. G. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**. v. 91, p. 795-800, 1996.
- CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana: estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**. v. 1, p. 159-218, 1909.
- CHAPADEIRO, E. Pêso do coração e intensidade do processo inflamatório na cardiopatia chagásica crônica. **Boletín de La oficina Sanitária Panamericana**. p. 236-239, Septiembre, 1967.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**. v. 97, p. 3-24, 2002.
- COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M. A. Emerging Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol**. v.18, p.171-6, 2002.
- COURA, J. R. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas' disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, p.113-7, 2006.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**. v. 104, p.31-40, 2009.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop.** v.115, p. 5-13, 2010.

ASSIS, G. F.; AZEREDO, B. V.; CARBAJAL DE LA FUENTE, A. L.; *et al.* Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa e Espínola 1964) in the Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 40, p. 391-6, 2007.

FREITAS, J. M.; PINTO, L. A.; PIMENTA, J. R.; *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Plos Pathogens**, v. 2, p. 226-235, 2006.

MEIS, J.; MORROT, A.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A.; *et al.* Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, p. 1-9, 2009.

DEVERA, R.; ILLARRAMENDI, X.; MONTOYA-ARAÚJO, R.; *et al.* [Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from humans from three endemic areas in Minas Gerais State]. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 35, p. 323-30, 2002.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**, v.98, p.1-12, 2003.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Emmanuel Dias and *Trypanosoma cruzi* discovery: two centenaries to celebrate – Editorial. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**, v.103, p.415-416, 2008.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: _____ *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: 2 ed.; Guanabara Koogan, p. 379-388, 2000.

DIAS, J. C. P.; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: ____ COURA, J. R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: 2 ed.; Guanabara Koogan Editora, p.557-93, 2005.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 97, p. 603-12, 2002.

DIOSQUE, P., BARNABE, C., PADILLA, A.M., *et al.* Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. **Int. J. Parasitol.** v. 15, p. 997–1003, 2003.

DIOTAIUTI, L.; FARIA FILHO, O.F.; CARNEIRO, F. C.; DIAS, J. C.; PIRES, H.H.; SCHOFIELD, C. J. [Operational aspects of *Triatoma brasiliensis* control] **Cad Saude Publica.** v. 2, p. 61-7, 2000.

DOMINGUES, F.A.A. Topografia e astronomia de posição: para engenheiros e arquitetos. São Paulo: Editora Mc Graw Hill do Brasil, p. 403, 1979.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol.** v. 21, p. 581-587, 2005.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005.

FALLA, A.; HERRERA, C.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M.; VALLEJO, G. A.; GUHL, F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. **Acta Tropica.** v. 110, p. 15-21, 2009;

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-eon and ribossomal RNA sequences. **Am J Trop Hyg.** v. 58, p. 807-811, 1998.

FLÓREZ, O.; ESPER, J.; HIGUERA, S.; *et al.* Chagasic megacolon associated with *Trypanosoma cruzi* I in a Colombian patient. **Parasitol Res.** v.107, p. 439-42, 2010.

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

FREITAS, J. M.; ANDRADE, L. O.; PIRES, S. F.; LIMA, R.; CHIARI, E.; *et al.* The MHC Gene Region of Murine Hosts Influences the Differential Tissue Tropism of Infecting *Trypanosoma cruzi* strains. **Plos one**, v. 4, 2009.

GARZON, E.; GENNA, F.; BOSSENO, M. F.; SIMONY-LA FONTAINE, J.; *et al.* Differential infectivity and immunopathology in murine experimental infections by two natural clones belonging to the *Trypanosoma cruzi* I lineage. **Parasitology**, v. 131, p. 109-119, 2005.

GOMES, M.A.; SILVA, E.F.; MACEDO, A.M.; VAGO, A.R.; MELO, M.N. LSSP-PCR for characterization of stocks of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. **Parasitology**, v. 114, p. 517-520, 1997.

GOMES, ML.; MACEDO, AM.; VAGO, AR.; PENA SJD.; GALVÃO, LMC.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Exp. Parasitol.** v. 88, p. 28-33, 1998.

GÜRTLER, R. E.; CECERE, M. C.; LAURICELLA, M. A.; *et al.* Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. **Am J Trop Med Hyg.** v.73, p. 95-103, 2005.

HERRERA, C.; BARGUES, M. D.; FAJARDO, A.; MONTILLA, M.; *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.** v. 7, p. 535-39, 2007.

HIGUCHI, M. L.; GUTIERREZ, P. S.; AIELLO, V. D.; *et al.* Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic Chagas disease myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, v. 423, p. 157-160, 1993.

HIGUCHI, M. L.; De BRITO, T.; REIS, M. M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A. C.; MEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasi myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc. Pathol.**, v. 2, p. 101-105, 1993a.

JACKSON, J. A.; TINSLEY, R. C. Geographic and within-population structure in variable resistance to parasite species and strains in a vertebrate host. **Int. Journal Parasitol.** v. 35, p. 29-37, 2005.

JARAMILLO, N.; MORENO, J.; TRIANA, O.; ARCOS-BURGOS, M.; MUÑOZ, S.; SOLARI, A. Genetic structure and phylogenetic relationships of Colombian *Trypanosoma cruzi* populations as determined by schizodeme and isoenzyme markers. **Am J Trop Med Hyg.** v. 61, p. 986-93, 1999.

JONES, E. M.; COLLEY, D. G.; TOSTES, S.; LOPES, E. R.; VNENCAK-JONES, C. L.; MCCURLEY, T. L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg.** v.48, p. 348-57, 1993.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A.; The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae – a review. **Parasitol. Today.** V. 16, p. 308-317, 2000.

KRETTLI, A. U.; WEISZ-CARRINGTON, P.; NUSSENZWEIG, R. S. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. **Clin Exp Immunol.** v. 37, p. 416-23, 1979.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L. E.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D, CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. **Am J Trop Med Hyg.** v.65, p.435-41, 2001.

LAGES-SILVA, E.; RAMÍREZ, L. E.; PEDROSA, A. L.; CREMA, E.; *et al.* Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **Journal Clinical Microbiology.** v. 44, p. 2167-71, 2006.

LEWIS, M. D.; M. A, J.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; LLEWELLYN, M. S.; MILES M. A. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 81, p. 1041-49, 2009.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D. L.; VOTÝPKA, J.; ZÍKOVÁ, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P. T. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryot Cell,** v.4, p. 495-502, 2002.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. Chagas disease role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert reviews in molecular medicine,** v. 4, p. 1-16, 2002.

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

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol Today.** v. 14, p. 119-24, 1998.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. *Trypanosoma cruzi*: genetic Structure of populations and Relevance of genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz,** v. 99, p. 1-12, 2004.

MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L.; ANDRADE, S. G. [Behavior of the Y and Peruvian strains of *Trypanosoma cruzi* in mice, after passage through various media] **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.** v. 80, p.41-50, 1985.

MANTILLA, J. C.; ZAFRA, G. A.; MACEDO, A. M.; GONZÁLEZ, C. I. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. **Hum Pathol.** v. 41, p. 610-3, 2010.

MARINHO, C. R.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; GRISOTTO, M. G.; ALVAREZ, J.M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect Immun.** v. 67, p. 308-18, 1999.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M.; PEÑA, V. H.; TRIANA-CHÁVEZ, O. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. **Exp Parasitol,** v. 121, p. 83-91, 2009.

MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; *et al.* Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol.** v.159, p. 1723-33, 2001.

MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYLE, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature,** v. 272, p. 819-821, 1978.

- MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D.; de ARIAS, A. R. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **BMJ clinical evidence**, v. 326, p. 1444-8, 2003.
- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; *et al.* Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 1810-14, 1980.
- MURTHY, V. K.; DIBBERN, K. M.; CAMPBELL, D. A. A PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. **Mol Cell Prob.** v. 6, p. 237-243, 1992.
- MYLER, P. J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta Tropica**, v. 53, p. 205-225, 1993.
- O'CONNOR, O.; BOSSENO, M. F.; BARNABÉ, C.; DOUZERY, E.J.; BRENIÈRE, S. F. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. **Infect Genet Evol.** v. 5, p. 587-93, 2007.
- OLIVEIRA, R. P.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. **Parasitol Today**. v. 13, p. 196-200, 1997.
- OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A. M.; CANTOR, C. R.; SMITH, C. L.; PENA, S. D. J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with microsatellites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 3776-3780, 1998.
- OLIVEIRA, R. P.; MELO, A. I. R.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: Expanded analyses of 54 strains using eight polymorphic microsatellites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 65-70, 1999.
- OLIVEIRA, M.A.; CABALLERO, O.L.; VAGO, A.M.; *et al.* Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. **J. Med. Microb.** v. 52, p. 127-135, 2003.
- PEDROSO, A.; CUPOLILLO, E.; ZINGALES, B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 129, p. 79-90, 2003.

PENA, S.; BARRETO, G.; VAGO, A.; DE MARCO, L.; REINACH, F.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. Sequence-specific gene signatures can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 1946–1949, 1994.

PENA, S. D. J.; MACHADO, C. R.; MACEDO, A. M. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 108-114, 2009.

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

RAMIREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E.; FRANCO, F. A.; *et al.* High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**. v. 84, p. 189-198, 2002.

REIS, D. A.; GUERRA, L. B.; CAMARGOS, E. R. S.; MACHADO, R. S. Lymphocyte subsets in peripheral blood and esophagus of chronic chagasic patients bearing different stages of digestive disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 44, 1996.

ROTTENBERG, M.; RIARTE, A.; SPORRONG, L.; ALTCHEH, J.; *et al.* Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4+ and/or CD8+. **Immunol. Lett.**, v. 45, p.53-60, 1995.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M. C. G.; *et al.* The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. **Immunol. Lett.**, v. 49, p. 163-168, 1996.

RUIZ, R. C.; FAVORETO, S.JR.; DORTA, M. L.; *et al.* Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **Biochem J.** v. 15, p. 505-11, 1998.

SALAZAR, A.; SCHIJMAN, A. G.; TRIANA-CHÁVEZ, O. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. **Acta Trop.** v.100, p. 110-8, 2006.

SAMUDIO, F.; ORTEGA-BARRÍA, E.; SALDAÑA, A.; CALZADA, J. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I among Panamanian sylvatic isolates. **Acta Trop.** v. 101, p. 78-81, 2007.

SANCHEZ, G.; WALLACE, A.; OLIVARES, M.; DIAZ, N.; AGUILERA, X.; APT, W.; SOLARI, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: in vitro differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. **Exp Parasitol.** v.71, p. 125-33, 1990.

SÁNCHEZ-GUILLÉN, M. C.; LÓPEZ-COLOMBO, A.; ORDÓÑEZ-TOQUERO, G.; *et al.* Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 10, p. 733-40. 2006.

SARQUIS, O.; BORGES-PEREIRA, J.; MAC CORD, J. R.; *et al.* Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 99, p. 263-70, 2004.

SARTORI, A. M.; SOTTO, M. N.; BRAZ, L. M.; *et al.* Reactivation of Chagas disease manifested by skin lesions in a patient with AIDS. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 93, p. 631-2, 1999.

SCHMUÑIS, G. A.; SZARFMAN, A.; DE SOUZA, W.; LANGEMBACH, T. *Trypanosoma cruzi*: antibody-induced mobility of surface antigens. **Exp Parasitol.** v. 50, p. 90-102, 1980.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitol.** v. 22, p. 583-8, 2006.

SLOOF, P.; BOS, J. L.; KONINGS, A. F.; *et al.* Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **J Mol Biol.** v. 167, p. 1-21, 1983.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Mol Biochem Parasitol.** v. 62, p. 45-52, 1993.

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

STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol Biochem Parasitol.** v. 126, p. 73-80, 2003.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. **Mol Biochem Parasitol.** v. 33, p. 205-14, 1989.

TANOWITZ, H. B. Chagas disease. **Clin Microbiol.** v. 5, p. 400-419, 1992.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol Today.** v. 15, p. 94-99, 1999.

TEIXEIRA, V. P. A.; REIS, M. A.; ARAÚJO, M. B. M.; et al. Comparação do parasitismo da veia central da supra-renal com o de outros tecidos em chagásicos crônicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 24, p.73-78, 1991.

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

TIBAYRENC, M., AYALA, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitol. Today,** v. 7, p. 228-232, 1991.

TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C.; et al. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 90, p. 1335-9, 1993.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kin biol dis.** v. 2, p.1-12, 2003.

TOLEDO, M. J; BAHIA, M. T; VELOSO, V. M; et al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. v. 53, p. 1045-53, 2004.

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

- VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **Am J Pathol.** v. 149, p. 2153-2159, 1996.
- VAGO, AR.; ANDRADE, LO.; LEITE, AA.; *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* from tissues of patients with chronic Chagas disease. **Am J Pathol.** v. 156, p. 1805-1809, 2000.
- VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. *rangeli*: Vector–parasite interactions, **Acta Tropica.** v. 110, p. 137–147, 2009.
- VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. II. Interactions of mouse macrophages and human monocytes with intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*: uptake and mechanism of destruction. **J Immunol.** v. 133, p. 3338-43, 1984.
- VILLA, L.L.; CABALLERO, O.L.; LEVI, J.E.; *et al.* An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. **Mol. Cell. Probes.** v. 9, p. 45–48, 1995.
- YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; *et al.* Origins of Chagas disease: didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids, **Int J Parasitol.** v. 35, p. 225-233, 2005.
- WEEKLY, E. R. New global efforts to eliminate Chagas disease. **Report. Wer.** v. 82, p. 259-260, 2007.
- WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J. B.; *et al.* Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **Am J Trop Med Hyg.** v.51, p.771-7, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: Report sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Pan American Health Organization/World Health Organization, 2007; www.who.int/tdr; acesso em 26 de maio, 2009.
- ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; *et al.* Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int J Parasitol.** v. 28, p. 105-12, 1998.

ZINGALES, B.; STROLF, B. S.; SOUTO, R. P. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 94, p. 159-164, 1999.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 104, p. 1051-54, 2009.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

6/

**Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS**

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: INFLUÊNCIA DO PARASITO E DO HOSPEDEIRO NO POTENCIAL PATOGÊNICO DAS POPULAÇÕES DO Trypanosoma cruzi I NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Eliane Lages Silva

INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM - Departamento de Ciências Biológicas/ Disciplina de Parasitologia

DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 23/03/2009

PROTOCOLO CEUA/UFTM: 115

11. ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Em relação aos riscos para os animais, a manipulação destes será realizada de maneira que haja um mínimo de sofrimento, fazendo uso de analgésicos e/ou anestésicos em procedimentos invasivos no momento da coleta de sangue, durante a eutanásia, que será realizada quando o bem-estar do animal estiver ameaçado, neste caso, após a infecção pelo protozoário Trypanosoma cruzi.

Como medida preventiva dos riscos às pessoas envolvidas na pesquisa, os alunos receberão treinamento adequado para o manuseio do T. cruzi e uso de aventais de manga comprida, luvas, máscaras e calçado fechado, além disso, as inoculações que oferecem maior risco de contaminação serão realizadas pelo pessoal técnico do laboratório. Em caso de acidente com o parasita, será administrado imediatamente Rochagan por via oral e realizada a sorologia para T. cruzi seguido de acompanhamento clínico pelos médico da DIP.

12. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Protocolo bem estruturado e justificado. Metodologia descrita e fundamentada. Serão armazenados órgãos para futuras análises, havendo um melhor aproveitamento dos animais.

PARECER DA CEUA: APROVADO

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).

DATA DA REUNIÃO: 15/10/2010

PROF. DR. GUILHERME VANNUCCHI PORTARI
Coordenador da CEUA

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](#)