

**Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

Influência da alteração dos níveis de ferro sobre o curso crônico da infecção de camundongos pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e sobre a dinâmica das populações dos parasitos reisolados por hemocultura

Lorena Cera Bandeira

Ouro Preto, MG
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Influência da alteração dos níveis de ferro sobre o curso crônico da infecção de camundongos pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e sobre a dinâmica das populações dos parasitos reisolados por hemocultura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dra. Cláudia Martins Carneiro.
Co-Orientadora: Prof^a Dra. Vanja Maria Veloso.

Ouro Preto, MG
2010

*Ao meu amado e saudoso pai que sempre nos motivou, garantindo que a educação
fizesse parte de nossas vidas.*

*“A sua ausência nos causa profunda tristeza, mas lembrar as alegrias que você
gerou entre nós é como se você aqui estivesse presente” .*

Universidade Federal de Ouro Preto

Laboratório de Doença de Chagas

Marta de Lana

Girley Machado de Assis

Laboratório de Imunopatologia

Paula Melo de Abreu Vieira

Amanda Fortes Francisco

Luisa Helena Perin

Flavia Bittencourt

Thais Vieira Carvalho

Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri

Helen Rodrigues Martins

A Deus, por me dar forças quando o cansaço e o desânimo tentavam prevalecer. Por me renovar a cada dia desta caminhada, para que eu realizasse tudo com amor e gratidão a todos aqueles que me ajudaram.

À amiga e professora Cláudia, agradecer o exemplo incomparável. Com você foi possível aprender que competência, ética, ciência, sensibilidade e amizade podem sim conviver em harmonia. Poucas pessoas conseguem ser tão dinâmicas como você e realizar este belo trabalho de compartilhar conhecimento. Estar ao seu lado me deu segurança, confiança e certeza de estar trilhando o caminho certo.

À amiga e professora Vanja, minha companheira inseparável, dos dias de muito trabalho e também dos dias mais tranquilos. Nosso convívio me fez crescer e cada vez mais me tornei uma amante da ciência. A nossa empolgação com cada conquista me dava motivação para seguir sempre em frente. Obrigada por estar sempre comigo!

À Professora Marta de Lana que me apresentou a este fantástico mundo de conhecimento. Saiba que sua dedicação à pesquisa e seu constante empenho pela qualidade dos novos profissionais formados nesta Universidade me fazem respeitá-la e admirá-la cada vez mais.

À Helen por todos os ensinamentos durante o período de iniciação. Com certeza você foi muito importante para meu crescimento técnico e também científico.

Ao amigo Girley, o *Auffy*, pela agradável convivência. Seu bom humor muitas vezes aliviava a tensão durante a solução de um problema ou durante a execução de algumas técnicas que muitas vezes pareciam intermináveis.

Aos sempre amigos da Parasito Jack, Lili, Ricardo, Sérgio, Ivo e Dani pelos bons momentos juntos que não serão nunca esquecidos.

À Maria Chaves pelo apoio na realização das técnicas histopatológicas.

À Tânia Martins e ao Phillipe Costa que sempre me auxiliaram fornecendo os materiais necessários para a realização deste trabalho.

A todos os alunos do Laboratório de Imunopatologia pelo apoio. Infelizmente não foi possível conviver com vocês de forma plena, mas saibam que o sentimento de equipe cultivado por todos e o companheirismo, sempre presente, tem toda minha admiração. Obrigada por estarem comigo nesta conquista.

À Paula e Amanda pela cumplicidade e apoio em todas as etapas deste trabalho. Vocês me auxiliaram sem medir esforços, sempre que necessário. Os conselhos e orientações sempre me tranquilizaram. Espero que algum dia eu possa retribuir todo bem que me fizeram. Contem sempre comigo! Sou eternamente grata por tudo!

À Flávia, Luísa e Thaís que sempre demonstraram boa vontade e empenho para me auxiliar nas atividades deste trabalho.

Aos bioteristas Hugo, Érica, Selma, Marcos, Jorgino e em especial a amiga Cristina pela dedicação, por sempre me ajudar com presteza e carinho.

Aos professores da Pós-graduação pelo conhecimento adquirido e aos colegas, em especial Raquel e Paola, pela troca de experiências.

A Josiane e José Wallace pela confiança, permitindo que este momento se tornasse possível. Vocês contribuíram para minha formação profissional me orientando em meus primeiros passos como profissional farmacêutica. Valores como ética e respeito são constantes em nosso convívio diário. Saibam que vocês são preciosos em minha vida. Obrigada!

À Acurácia Pharmaceutica e a todos os seus colaboradores por compreenderem meus momentos de ausência e por torcerem pelo meu sucesso.

A minha família pelo incentivo e apoio. Mamãe, obrigada pelas orações diárias, com seu cuidado e carinho me sinto muito mais segura. Luluti, a cumplicidade. Afinal o que seria de mim sem minha amada irmã? Ao Lô, pelos conselhos sábios. A Abigail, lindeza da tia Nena, por alegrar meus dias. Tenham a certeza que tudo foi possível porque vocês estavam ao meu lado.

A José Ricardo, pelo amor, compreensão, apoio, carinho e paciência nos momentos de cansaço e nervosismo. “Sentir-se amada é sentir que a pessoa tem interesse real na sua vida, que zela pela sua felicidade, que coloca-se a postos para ouvir sempre”.

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - DOENÇA DE CHAGAS E O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	2
1.2 - INFECÇÃO EXPERIMENTAL	4
1.3 - DINÂMICA POPULACIONAL DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	5
1.4 - QUIMIOTERAPIA NA DOENÇA DE CHAGAS.....	8
1.5 - NÍVEIS DE FERRO DO HOSPEDEIRO E SEU IMPACTO NA DOENÇA DE CHAGAS.....	13
2 - JUSTIFICATIVA.....	18
3 - OBJETIVOS	20
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4- ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 - ETAPAS PREVIAMENTE REALIZADAS	23
4.2 - ETAPAS REALIZADAS NESTE TRABALHO.....	25
4.2.1 - Primeira etapa.....	25
4.2.1.1 - Animais, eutanásia e coleta de amostras.....	25
4.2.1.2 - Pesquisa de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> pela ELISA	25
4.2.1.3 - Hemocultura	26
4.2.1.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	26
4.2.1.4.1 - Extração do DNA.....	26
4.2.1.4.2 - Amplificação específica do <i>T. cruzi</i> (sangue e tecidos).....	28
4.2.1.5 - Processamento do material para avaliação histopatológica	28
4.2.1.5.1- Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)	29
4.2.1.5.2- Quantificação da inflamação no coração e fígado.....	29
4.2.2- Segunda etapa.....	30
4.2.2.2 - Parâmetros avaliados	30
Infectividade (INF)	30
Parasitemia (PAR).....	31
Período Pré-patente (PPP)	32
Período Patente (PP).....	32
Pico Máximo de Parasitemia (PMP).....	32
Dia do Pico Máximo (DPMP)	32
Sobrevida.....	32
4.2.2.3 - Eutanasia, coleta, fixação, processamento e coloração do material.....	32
4.2.2.4 - Caracterização Bioquímica: Perfil Eletroforético de Isoenzimas (Zimodemas).....	33
4.2.2.4.1 - Obtenção de epimastigotas cultivadas em meio LIT (massa úmida) e do extrato enzimático.....	33
4.2.2.4.2 - Eletroforese de Isoenzimas e Revelação.....	33
5 - RESULTADOS.....	36
5.1 - Primeira Etapa.....	37
5.1.1 - ELISA.....	37
5.1.2 - Hemocultura.....	37
5.1.3 - PCR.....	37

5.1.3.1 - PCR em sangue.....	37
5.1.3.2 - PCR em tecido.....	39
5.1.4 - Avaliação Histopatológica.....	40
5.1.4 - Avaliação da cura parasitológica.....	41
5.2 - Segunda Etapa.....	42
5.2.1 - Parâmetros relacionados às curvas de parasitemia	42
5.2.2 - Sobrevida	45
5.2.3 - Análise morfométrica do processo inflamatório cardíaco e hepático.....	46
5.2.4 - Análise do perfil eletroforético de isoenzimas (Zimodema)	50
6 - DISCUSSÃO	51
7 - CONCLUSÕES	59
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

No presente trabalho foi investigada, na primeira etapa, a cura parasitológica e o processo inflamatório cardíaco e hepático em camundongos cronicamente infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e que foram submetidos à alteração dos estoques de ferro pelo uso da Desferrioxamina (DFA), tratados ou não com Benzonidazol (Bz). Utilizaram-se 80 camundongos Swiss, machos, 30 dias de idade, distribuídos em quatro grupos experimentais: INT - infectado e não tratado; BZ - infectado e tratado com Bz durante 21 dias; DFA-35 - infectado e tratado com DFA durante 35 dias e DFA/BZ-35 - infectado e tratado com Bz e DFA durante 35 dias. Dezoito meses após o inóculo foi observado que 16 camundongos (13,3%) sobreviveram à infecção. É importante mencionar que camundongos infectados com a cepa Y não sobrevivem à fase aguda da infecção. Foram utilizadas técnicas de ELISA, Hemocultura e PCR e, apesar da taxa de sobrevida de 20% nos grupos BZ e DFA-35 e 40% no grupo DFA/BZ-35, nenhum dos camundongos foi considerado curado. Isoladamente, os índices de cura foram 0% pela ELISA, 81,25% pela hemocultura e 25% pela PCR. Foi avaliado também o processo inflamatório do coração e fígado destes animais para verificar a influência dos diferentes protocolos sobre estes órgãos. Os resultados demonstraram que os animais do grupo BZ apresentaram processo inflamatório cardíaco e hepático mais intenso que o observado nos demais grupos. Fragmentos de DNA do *T. cruzi* foram detectados em 47,5% (67/144) das reações de PCR realizadas em diferentes tecidos dos 16 camundongos avaliados. O cólon (12/16 - 75%) e o baço (4/16 - 25%) apresentaram a maior e a menor taxa de positividade respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que os diferentes esquemas terapêuticos não promoveram a cura parasitológica nos animais. Entretanto a associação DFA/BZ-35 além de permitir uma maior sobrevida também protegeu o coração do desenvolvimento de lesões, semelhante ao observado nos animais apenas submetidos ao tratamento com DFA. Na segunda etapa, foi realizada a caracterização biológica e bioquímica das populações isoladas por hemocultura. Utilizaram-se 120 camundongos Swiss, alocados nos seguintes grupos experimentais: Cepa Y, Isolado 1A, Isolado 1B, Isolado 2A, Isolado 2B e Isolado 3. A sobrevida foi maior para os animais inoculados com os isolados 1A, 2A, 2B e 3. O período pré-patente (PPP) e o pico máximo de parasitemia (PMP) observados para os isolados foram significativamente menores do que os valores da cepa Y. O isolado 1A apresentou o maior período patente (PP) (18 dias) e o isolado 1B o dia do pico máximo de parasitemia (DPMP) mais tardio. Em relação ao processo inflamatório no coração e fígado, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. A avaliação do perfil eletroforético de isoenzimas revelou que não houve alteração para os sistemas avaliados (GPI, PGM, G6PD, ICD, GDH, MPI e 6PGDH) quando comparados à cepa Y. Esses resultados sugerem que o protocolo utilizando Bz e DFA associados pode ter alterado a dinâmica populacional dessa cepa ou ainda favorecido o surgimento de uma população menos patogênica, entretanto, não alterou seu comportamento bioquímico.

In the present study was investigated in the first stage, the parasitological cure and heart and liver inflammation of mice chronically infected with Y strain of *T. cruzi* and submitted to the change of iron stores by the use of desferrioxamine(DFA) treated or not with Benzonidazol(Bz). We used 80 male Swiss mice, 30 days old, divided into four groups: INT - infected and untreated; BZ - infected and treated with Bz; DFA-35 - infected and treated for 35 days with DFA and DFA / BZ-35 - infected and treated with Bz and DFA for 35 days. Eighteen months after inoculation, we found that 16 mice (13.3%) survived infection. It is worth noting that mice infected with Y strain do not survive the acute phase of infection. We used ELISA, PCR and hemoculture, and although the survival rate of 20% in groups and DFA BZ-35 and 40% in group DFA/BZ-35, none of the mice were considered cured. Separately, the cure rates were 0% for ELISA, 81.25% by hemoculture and 25% PCR. We evaluated the inflammatory process of the heart and liver of animals to check the influence of different protocols on these organs. The results showed that animals of the BZ group had cardiac and hepatic inflammatory process more intense than the other groups. DNA fragments of *T. cruzi* were detected in 47.5% (67/144) of the PCR reactions carried out in different tissues of 16 mice evaluated. The tissue with the highest and lowest rate of positivity was the colon (12/16 -75%) and spleen (4 / 16 - 25%), respectively. The results suggest that the different therapeutic regimens did not induce parasitological cure in gilts. However the association DFA/BZ-35 besides allowing a better survival also protects the heart from the development of lesions, similar to that seen in animals only subjected to treatment with desferrioxamine. In the second step, we performed biological and biochemical characterization of populations isolated by hemoculture. We used 120 Swiss mice, allocated in the following groups: Y strain, Isolate 1A, Isolate 1B, Isolate 2A, Isolate 2B and Isolate 3. Survival was higher for animals inoculated with the isolates 1A, 2A, 2B and 3. The PPP and PMP parameters observed for the isolates were significantly lower than the values of the standard strain. The isolate 1A had the highest PP (18 days) and the isolated 1B DPMP later. In relation to the inflammatory process in heart and liver, there were no significant differences between the groups. The evaluation of isoenzyme electrophoresis revealed no change to the evaluated systems (GPI, PGM, G6PD, ICD, GDH, MPI and 6PGDH) compared to the strain Y. These results suggest that the protocol using Bz and DFA associates may have altered the population dynamics of this strain or even favored the emergence of a population less pathogenic but which did not change as to their biochemical behavior.

Bz - Benzonidazol

BZ – grupo de animais infectados e tratados com Bz

BZ/DFA-35 - grupo de animais infectados e tratados com DFA durante 35 dias e tratados com Bz

DC - doença de Chagas

DFA - Desferrioxamina

DFA-35 - grupo de animais infectados e tratados com DFA durante 35 dias

DPI - dias pós-infecção

DPMP - dia do pico máximo de parasitemia

DTUs - discrete typing units

GDH - Glutamato desidrogenase

GPI - Glicose-6-fosfato isomerase

G6PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase

Hc - Hemocultura

HE - hematoxilina & eosina

ICD - Isocitrato desidrogenase

INF - Infectividade

INT – grupo de animais infectados e não tratados

LIT - *Liver Infusion Tryptose*

LSSP-PCR - Low-Stringency Single specific Primer PCR

MPI - Malato 6-fosfato isomerase

NI – grupo de animais não infectado

PAR - Parasitemia

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PGM - Fosfoglicomutase

PMP - pico máximo de parasitemia

PPP - período pré-patente

PP - período patente

Rpm - Rotações por minuto

6PGDH - Fosfogluconato Desidrogenase

Z - Zimodema

- Figura 1 - Fórmula estrutural dos medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas.9
- Figura 2 - Fórmula estrutural de novos derivados triazólicos com atividade tripanomicida. 12
- Figura 3 - Fórmula estrutural do Desferal (Mesilato de desferrioxamina). O grupo destacado em vermelho refere-se ao grupo ligante do sideróforo denominado hidroxamato..... 16
- Figura 4 - Delineamento experimental da primeira etapa. Camundongos Swiss machos (n=80), infectados com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, infectados e não tratados (INT, n=20), tratados com Bz por 21 dias (BZ, n=20), tratados com DFA por 35 dias (DFA, n=20), infectados e tratados com DFA por 35 e Bz por 21 dias (DFA/BZ-35, n=20).24
- Figura 5 - Delineamento experimental da segunda etapa. Camundongos Swiss machos (n=90), infectados com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (n=15) e com as populações isoladas 1A, 1B, 2A, 2B e 3 (n=15 para cada grupo).31
- Figura 6 - Gel de poliacrilamida representativo da amplificação, pela PCR, do kDNA do *Trypanosoma cruzi* obtido em amostras de sangue de camundongos infectados por 18 meses com a cepa Y, tratados ou não com desferrioxamina associada ou não ao benzonidazol.38
- Figura 7 - Percentagem de PCR positiva no fígado, baço, esôfago, coração, músculo esquelético (ME), cérebro, cólon e linfonodo abdominal (LA) de camundongos infectados por 18 meses com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, tratados ou não com desferrioxamina, associada ou não ao benzonidazol.40
- Figura 8 - Análise morfométrica do processo inflamatório cardíaco (A) e hepático (B) de animais infectados por 18 meses com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.41
- Figura 9 - Curvas de parasitemia observadas até o 15^o dia após a infecção em camundongos inoculados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.43
- Figura 10 - Curvas de parasitemia de camundongos inoculados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi* observadas durante o período patente (34 dias).44
- Figura 11 - Taxa de sobrevivência dos animais inoculados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.46
- Figura 12 - Análise morfométrica do processo inflamatório cardíaco no 7^o, 11^o e 15^o dia após a infecção de camundongos com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.48

Figura 13 - Análise morfométrica do processo inflamatório hepático no 7^o, 11^o e 15^o dia após a infecção de camundongos com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.....49

Figura 14 - Perfis eletroforéticos das enzimas GPI (A) e G6PD (B) de amostras de *Trypanosoma cruzi* de animais inoculados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*. 50

Tabela 1 - Condições eletroforéticas e de revelação usadas para os sistemas enzimáticos estudados.....	35
Tabela 2 - Condições eletroforéticas e de revelação usadas para os sistemas enzimáticos estudados.....	36
Tabela 3 – Resultados dos testes de ELISA, Hemocultura e PCR realizados no sangue de camundongos infectados por 18 meses com a cepa Y, tratados ou não com desferrioxamina associada ou não ao benzonidazol.....	38
Tabela 4: Parâmetros biológicos avaliados em camundongos Swiss inoculados com a cepa Y e com as populações isoladas por hemocultura (1A, 1B, 2A, 2B e 3) do <i>Trypanosoma cruzi</i>	45

1.1- Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida por insetos hematófagos da subfamília Triatominae durante seu repasto sanguíneo. No homem ou em outros hospedeiros vertebrados o ciclo tem início quando as formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas pelo inseto vetor e entram em contato com mucosas ou regiões lesadas da pele invadindo diversos tipos celulares como macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais. A partir desse momento ocorre proliferação intracelular e liberação de formas tripomastigotas. Estas formas podem invadir novas células localizadas no local da infecção, bem como a corrente sanguínea e atingir outros tecidos do hospedeiro. Outros possíveis mecanismos de transmissão incluem as vias transfusional, congênita, oral, acidentes laboratoriais e transplantes (Xavier *et al.*, 2006; Bittencourt, 2000; Coura, 2006).

Dados recentes indicam que cerca de 8 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasito. Mundialmente, o valor anual estimado de mortes diminuiu de 45.000 em 1990 para cerca de 11.000 em 2008, enquanto o número estimado de infecções diminuiu de 30 milhões em 1990 para 8 milhões em 2006. Nesse período de 16 anos, a incidência anual caiu de 700.000 mil casos para 56.000 (WHO, 2009), demonstrando claramente a efetividade das medidas dos Programas de Controle da Doença de Chagas com a Iniciativa do Cone Sul em 1991, com o Pacto Andino e o Programa de Controle da América Central (Moncayo e Yanine, 2006).

Na história natural da doença de Chagas são observadas duas fases distintas: a fase aguda e a crônica da infecção.

A fase aguda, geralmente assintomática, corresponde a um período no qual o parasito é encontrado com facilidade no sangue periférico e nos tecidos. A maioria dos casos permanece assintomática nessa fase e a infecção muitas vezes passa despercebida. Nos casos sintomáticos, podem ser observados febre, edema, enfartamento ganglionar e sinais da porta de entrada dos parasitos (sinal de Romana e chagoma de inoculação), além de apresentarem miocardite severa ou envolvimento neurológico, principalmente, em crianças menores de dois anos de idade (Brener, 1992). Prata (2001) ao avaliar as fases e as formas da doença relatou que 5 a 10% dos pacientes sintomáticos morrem na fase aguda. Porém, na maioria dos casos agudos, os sintomas desaparecem espontaneamente e os indivíduos evoluem para a fase crônica.

À medida que o indivíduo evolui para a fase crônica a parasitemia patente diminui com o estabelecimento de uma resposta imune efetiva, que é um importante parâmetro para o estudo dessa doença (Giordanengo *et al.*, 2002). Desse modo, na fase crônica ocorre ausência ou escassez de parasitos no sangue que pode permanecer por toda vida do indivíduo mesmo na falta de tratamento adequado. Essa fase é caracterizada por um curso clínico variável sendo que a maioria dos indivíduos permanece assintomática (70-90%), mas alguns casos podem evoluir para formas clínicas graves. A ausência de sintomas caracteriza a forma indeterminada ou inaparente da DC (Prata, 2001). Nesta fase a suspeita da infecção pode ser confirmada por testes sorológicos (ELISA, IFI, HAI) e evidenciada por testes parasitológicos como a hemocultura, o xenodiagnóstico e a PCR (Chiari *et al.*, 1989; Barreto e Lanni, 1994 e Gomes *et al.*, 1998). O indivíduo apresenta ausência de sinais e sintomas, exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdômen normais e parasitemia baixa e intermitente necessitando muitas vezes repetição dos testes parasitológicos indiretos para sua confirmação. Após vários anos de infecção assintomática, 20% a 30% dos indivíduos infectados desenvolvem os sintomas cardíacos (que podem levar a morte súbita), 5% a 10% desenvolvem danos digestivos e os pacientes imunocomprometidos apresentam comprometimento do sistema nervoso central (WHO, 2009).

A forma mista da infecção (manifestação cardíaca e digestiva) é observada em cerca de 8% dos casos. Os dados epidemiológicos de acompanhamento clínico de pacientes em longo prazo demonstram que o índice de evolução clínica anual varia de 2% a 4% (Dias, 2006).

A forma cardíaca é a mais importante devido à sua elevada morbimortalidade associada sendo até hoje considerada uma das principais causas de morte por doenças do coração na América. Essa é caracterizada por fibrose e destruição de células do miocárdio (Palacios-Pru *et al.*, 1989), pela miocardite crônica, que frequentemente leva à cardiomegalia, à insuficiência cardíaca congestiva e às arritmias (Tanowitz *et al.*, 1992). As anormalidades podem ser silenciosas, identificadas apenas por meio de exames complementares mais sensíveis ou podem ser exacerbadas podendo levar à morte súbita.

Na forma digestiva, observa-se dilatação do esôfago (megaesôfago) e/ou cólon (megacólon) além de degeneração neuronal com denervação (Köberle, 1968). As alterações descritas acima podem levar os pacientes a desenvolverem problemas de motilidade, de secreção e de absorção do sistema digestório.

As razões pelas quais a doença se manifesta de forma distinta permanecem desconhecidas, mas sabe-se que podem estar relacionadas à idade, ao sexo, à exposição à re-infecção ou à genética do parasito, entre outros fatores (Macedo e Pena, 1998).

1.2- Infecção experimental

Por razões éticas, a maioria das pesquisas realizadas em humanos, além de apresentar limitações, inicia-se após vários anos de infecção. A correlação entre os níveis de parasitemia e o parasitismo tecidual nestes indivíduos, bem como os padrões patológicos das lesões cardíacas, torna-se difícil de ser avaliada. Desse modo, faz-se necessário a utilização de modelos experimentais adequados a fim de melhor compreender os aspectos relacionados à interação parasito/hospedeiro.

Assim, experimentalmente, a DC pode ser avaliada, através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos como ratos, camundongos, roedores silvestres, cães, coelhos, primatas e cobaias, podendo ser reproduzidos nos mesmos, alguns aspectos patológicos semelhantes aos da doença humana. O modelo murino tem sido escolhido por diversos pesquisadores pela facilidade de obtenção, manutenção e por serem de pequeno porte. Os camundongos têm sido utilizados também no estudo de diversos parâmetros relacionados à interação parasito-hospedeiro, como por exemplo, no comportamento biológico de cepas do *T. cruzi*, na eficácia de diferentes fármacos utilizados na terapia específica contra o parasito e na resposta imunológica e histopatológica do hospedeiro (Brener *et al.*, 1976; Andrade *et al.*, 1985; Ben Younès-Chennoufi *et al.*, 1988; Rottenberg *et al.*, 1988).

As características da DC observadas em modelo murino podem ser variadas. Segundo Minoprio *et al.* (1989) a fase aguda da infecção em camundongos é caracterizada por alta parasitemia, grande disseminação do parasito e imunossupressão, levando-os com frequência à morte. Porém, nos casos de camundongos que sobrevivem ao longo período de infecção pelo *T. cruzi*, esses podem desenvolver miocardite intensa e lesões na inervação autonômica do coração (Tafari, 1970; Machado *et al.*, 1975), na microcirculação (Factor *et al.*, 1985) e mudanças eletrocardiográficas parecidas com as encontradas na miocardite chagásica humana (Laguens *et al.*, 1981a). O acometimento do miocárdio em camundongos cronicamente infectados parece ser consequência do parasitismo e da inflamação

durante os primeiros estágios da doença (Schlemper *et al.*, 1983). A miocardite pode ser induzida experimentalmente através de injeções múltiplas de antígenos subcelulares específicos do *T. cruzi* (Teixeira *et al.*, 1975) ou através da transferência de células do baço de animais imunizados pelo *T. cruzi* para animais normais (Laguens *et al.*, 1981b), sugerindo a participação do sistema imune na patogênese da miocardite crônica.

Assim, o curso da infecção, aguda ou crônica, pelo *T. cruzi* em camundongos depende do *background* genético do hospedeiro (Pizzi *et al.*, 1949; Trischmann *et al.*, 1978; Corsini *et al.*, 1980; Soares *et al.*, 2001) e do parasito isolado (Brener, 1965; Postan *et al.*, 1983; Soares *et al.*, 2001).

Diferentes cepas do *T. cruzi* têm sido utilizadas em estudos das fases aguda e crônica da infecção experimental em modelos animais. Isso é de extrema relevância, pois tem aumentado o conhecimento da relação parasito-hospedeiro, evidenciando que cepas do parasito apresentam comportamentos biológicos distintos (Andrade e Magalhães, 1996).

A cepa Y (Silva e Nussenzweig, 1953) é considerada referência em pesquisas relacionadas a DC, pois apresenta algumas particularidades, como a predominância de formas tripomastigotas sanguíneas delgadas, alta virulência e patogenicidade para camundongos, com taxa de mortalidade de 100%, independente do tamanho do inóculo. Apresenta um grau intermediário de resistência ao Bz (aproximadamente 50% de cura), quando avaliada em camundongos (Filardi e Brener, 1987). Segundo Brener (1977, 1985), a cepa Y produz elevado pico de parasitemia dos sete aos doze dias de infecção, alta taxa de mortalidade, intenso parasitismo no baço e células fagocíticas do fígado, nos primeiros estágios de infecção, e miotropismo nos estágios mais tardios. Ela é considerada reticulotrópica, parasitando principalmente, baço, fígado e medula óssea (Melo e Brener, 1978).

1.3- Dinâmica populacional do *Trypanosoma cruzi*

A presença de populações geneticamente distintas vem sendo sugerida como fator determinante das alterações observadas em diferentes formas clínicas na DC possivelmente devido ao tropismo tecidual característico de cada população (Macedo, 1998; Vago *et al.*, 2000) e ao fato de que o parasito ocupa um papel predominante no curso da infecção. Tarleton (2001) demonstrou que a redução da carga parasitária

após tratamento específico diminui a intensidade das lesões. Já o seu aumento, quando induzido por imunossupressão exacerba as manifestações clínicas.

Segundo Tibayrenc e Ayala (1988) esse parasito apresenta estrutura predominantemente clonal com raros eventos de troca genética, o que presuppõe que os clones se mantêm altamente estáveis ao longo do tempo e espaço. Inúmeros trabalhos descrevem a caracterização biológica e molecular da cepa Y (Andrade 1974; Romanha *et al.*, 1979; Marques de Araújo e Chiari, 1988; Oliveira *et al.*, 1998; Barnabé e Tibayrenc, 2004). De acordo com Barnabé e Tibayrenc (2004), a cepa Y é encontrada em muitos laboratórios, apresentando pelo menos dois genótipos distintos, A e B correspondendo aos DTUs (*discrete typing units*) *T. cruzi* II e *T. cruzi* V, respectivamente, sendo V considerado híbrido. Entretanto, a instabilidade nesses genótipos tem sido demonstrada por outros autores. Por exemplo, Romanha (1982) registrou a transição entre os zimodemas A, B e C. Os autores registraram inclusive que para a enzima glicose-6-fosfato isomerase (GPI) foi detectado estágios intermediários entre um zimodema e outro. Posteriormente, Alves *et al.* (1993) mostraram mudanças do ZA para ZB, e ZC após a realização de sub-culturas de culturas clonadas da cepa Y em meios com diferentes composições ou após passagem em camundongos recém-nascidos. Os autores mostraram que o ZA foi observado em meio contendo sangue e os ZB e ZC em meios de cultura progressivamente menos ricos em nutrientes e sem sangue. Barnabé e Tibayrenc (2004) tentaram reproduzir os resultados obtidos por Alves *et al.* (1993; 1994; 1996) com dois subclones da cepa Y pertencentes aos genótipos A e B, utilizando diferentes procedimentos de clonagem. Os autores não observaram mudanças nos padrões de isoenzimas e RAPD (Randomly Amplified polymorphic DNA) e atribuíram a discrepância dos resultados à diferenças entre os métodos de clonagem.

O termo polimorfismo foi sugerido inicialmente para expressar as diferentes habilidades, competências ou comportamento das formas tripomastigotas sanguíneas distintas morfologicamente (Brener, 1971). Posteriormente, análises moleculares de diferentes isolados do *T. cruzi* também demonstraram que as populações do parasito são extremamente polimórficas geneticamente (Buscaglia e Di Noia, 2003). Por apresentar uma enorme variabilidade biológica e genética, fato que interfere em características como virulência, patogenicidade e susceptibilidade a drogas, diferentes pesquisadores têm realizado estudos de caracterização bioquímica e molecular do *T.*

cruzi utilizando marcadores diversos e tentando correlacionar com propriedades específicas do parasito.

Um destes estudos inclui avaliações do perfil eletroforético de isoenzimas, que permitem demonstrar diferenças na estrutura primária de uma enzima mesmo entre indivíduos de uma mesma população. Os perfis eletroforéticos são expressões fenotípicas e podem ser atribuídos às diferenças genéticas do parasito (Romanha, 1982).

Recentemente, frente aos avanços na compreensão da estrutura populacional do *T. cruzi*, fez-se necessário a revisão dessas nomenclaturas. A padronização da nomenclatura visa, principalmente, facilitar a comunicação entre os pesquisadores além de caracterizar aspectos relativos à biologia básica, à eco-epidemiologia e à patogenicidade. Assim, em reunião de especialistas realizada no ano de 2009 durante a XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, XXXVI Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, foi definido que as cepas do *T. cruzi* devem ser classificadas em seis DTUs, *T. cruzi* I-VI (Zingales *et al.*, 2009).

Como observado por diversos autores, dependendo do método e do manuseio utilizados em estudos de caracterização de cepas ou clones do *T. cruzi*, é possível obter mudanças tanto no fenótipo quanto no genótipo. Essas mudanças poderiam ser atribuídas a dois fatores principais: 1) a mudança na dinâmica populacional dos clones presentes naquela amostra ou 2) a instabilidade genética frente a pressões específicas. Mudanças nos perfis de RAPD de clones pertencentes aos quatro genótipos principais 19, 20, 39 e 32 (Tibayrenc e Ayala, 1988), foram observadas por Toledo (2001), após tratamento com Bz, tanto na fase aguda quanto crônica da infecção pelo *T. cruzi*. Os autores sugeriram que essas mudanças poderiam estar associadas às propriedades biológicas apresentadas pelos clones estudados. Desta maneira, nos genótipos 19 e 20 foi constatada a presença de clones considerados resistentes, parcialmente resistentes e sensíveis ao Bz e, no genótipo 20, apenas clones resistentes ao Bz. Os clones desses genótipos não mantiveram o padrão inicial após sofrerem pressão do quimioterápico e passaram a apresentar além de outros perfis, o perfil híbrido, que segundo McDaniel e Dvorak (1993), dependendo do tipo de pressão seletiva, as populações do parasito passam a apresentar o perfil híbrido mais adaptado para sobreviver em condições adversas. Martins *et al.* (2008) também observaram mudanças no perfil genético de clones pertencentes a esses genótipos após infecção e

isolamento em camundongos submetidos ou não ao tratamento pelo perfil de Isoenzimas.

1.4- Quimioterapia na doença de Chagas

Considerando os eventos cronológicos referentes à quimioterapia da DC observa-se uma etapa inicial que vai desde a descoberta da doença em 1909 até 1935, sendo o marco principal a publicação do “Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas” por Carlos Chagas e Evandro Chagas. Em um segundo momento, destacam-se os resultados obtidos com o uso de 20 quimioterápicos, 30 antibióticos com efeito supressivo sobre a infecção causada pelo *T. cruzi* (Brener, 1968; De Castro, 1993). Entre estes compostos usados no segundo momento, ressalta-se o uso do antisséptico violeta de genciana que ainda hoje é utilizado como agente profilático em bancos de sangue (Dias *et al.*, 2009). Na fase seguinte, a partir de 1960, a utilização da infecção experimental como ferramenta científica torna-se essencial para a comprovação dos benefícios de alguns compostos. O nifurtimox (Nif - um composto nitrofurano) e o Bz (composto nitro-imidazólico), que foram empiricamente desenvolvidos no início da década de 1970, são os fármacos que destacaram-se nesta fase. A fórmula estrutural destes compostos nitro-heterocíclicos está representada na Figura 1.

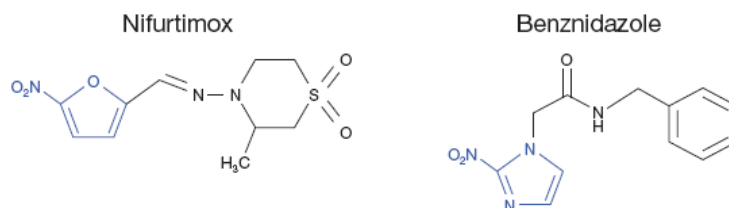


Figura 1 - Fórmula estrutural dos medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas.

Andrade *et al.* (1985) avaliaram a eficácia destes dois fármacos em camundongos infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*, e observaram diferenças de suscetibilidade aos fármacos utilizados de acordo com a cepa empregada. Posteriormente, Toledo *et al.* (2004) fizeram uma ampla revisão da literatura e demonstraram que das 104 cepas do parasito estudadas 58,5% foram susceptíveis aos derivados nitro-heterocíclicos, 5,77% parcialmente sensíveis e 35,8% foram resistentes a estes derivados. Uma justificativa para tal fato seria a grande variabilidade genética das populações de parasitos (Brenner e Chiari, 1967) o que pode estar relacionado à origem geográfica das mesmas (Murta *et al.*, 1999).

Em humanos, a eficácia terapêutica destes compostos está relacionada principalmente, ao período da infecção em que se inicia o tratamento. Assim, tem sido demonstrado que quando o tratamento específico é iniciado na fase aguda, geralmente evita a letalidade e pode reduzir a duração e a gravidade clínica nesta fase e em certa porcentagem é capaz de curar (Cançado, 1991). Porém, durante a fase crônica, o tratamento é bem menos promissor. Segundo Coura e Castro (2002), a fase crônica pode ser subdividida em fase crônica recente, na qual o indivíduo adquiriu a infecção dentro de um prazo de 10 anos, e fase crônica tardia que se refere à pacientes infectados há mais de dez anos. Quando as taxas de cura parasitológica são comparadas entre esses dois grupos, observam-se valores maiores para os indivíduos na fase crônica recente e menores índices para aqueles na fase tardia (10 a 20% de cura parasitológica).

Atualmente, no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai o Bz é o único medicamento disponível para o tratamento da DC. Inicialmente produzido com exclusividade pela Roche Farmacêutica, teve sua tecnologia de produção cedida ao Brasil e, atualmente, é fabricado pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE). Hoje esse

medicamento é fornecido gratuitamente pelo SUS, pois faz parte do elenco de medicamentos estratégicos. O Ministério da Saúde (MS) considera como estratégicos todos os medicamentos utilizados para tratamento das doenças de perfil endêmico, cujo controle e tratamento tenham protocolos e normas estabelecidas e que tenham impacto sócio-econômico. Desta forma, os medicamentos têm a aquisição centralizada pelo MS e são repassados para os Estados sendo de responsabilidade das secretarias estaduais, fazer o armazenamento e distribuição aos municípios.

O Bz possui ação tripanomicida, é muito pouco solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Após administração por via oral, distribui-se pelos tecidos, sofre metabolização hepática e seus metabólitos são eliminados principalmente, na urina. Apresenta uma absorção por via oral relativamente alta, atravessa a barreira hematoencefálica, sua concentração plasmática máxima é atingida entre 2 ou 4 horas, e seu tempo de meia vida, em humanos, é em torno de 12 horas (Puppulin, 2005).

Durante o tratamento, podem surgir reações adversas que podem ser classificadas em três grupos:

1) Sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas (que surgem entre o 7^o e o 10^o dia de tratamento), febre, edema, linfadenopatia, dor muscular e nas articulações;

2) Depressão de medula óssea, trombocitopenia púrpura e agranulocitose, nas manifestações mais severas;

3) Polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos (Coura e Castro, 2002). A ocorrência desses sintomas leva a suspensão do tratamento (Cançado, 2000).

O modo de ação específico do Bz, ainda permanece desconhecido. Entretanto, vários estudos visando propor mecanismos de ação para esse fármaco, têm sido descritos na literatura. Uma dessas propostas sugere que o grupo nitro pode ser reduzido a um grupo amino por nitroreductases, resultando na formação de radicais livres intermediários bem como em metabólitos eletrofílicos, que envolve a modificação covalente de macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídios, afetando assim o metabolismo da tripanotiona do *T. cruzi* (Ribeiro *et al.*, 2009). Dessa forma, esta geração de radicais livres promove danos oxidativos no parasito, que necessita de um sistema antioxidante adequado (Boveris *et al.*, 1980).

Segundo Castro *et al.* (2006), tal interação de metabólitos reativos que danificam biomoléculas importantes, são responsáveis por suas ações quimioterápicas contra o parasito e os efeitos secundários tóxicos no hospedeiro.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o fármaco ideal para o tratamento da DC deve:

- promover a cura parasitológica para casos agudos e crônicos,
- ser eficaz em dose única ou em poucas doses,
- ser de baixo custo para o paciente,
- não apresentar efeitos teratogênicos ou efeitos colaterais,
- internação hospitalar desnecessária,
- não induzir resistência.

Desta forma, como o fármaco ideal para o tratamento etiológico da DC ainda não existe (Pupulin *et al.*, 2005), a busca por um tratamento que elimine o parasito do hospedeiro humano, tem como base, o estudo da fisiologia e da bioquímica do *T. cruzi* na tentativa de identificar alvos terapêuticos promissores (Atwood *et al.*, 2005). Como exemplo de alvos moleculares em estudo destacam-se as enzimas como a tripanotiona redutase, a cruzipaína, a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, a diidrofolato redutase, a farnesilpirofosfato sintase e DNA topoisomerases (Coura e Castro, 2002).

Além desses estudos, destacam-se aqueles que vêm testando em pacientes chagásicos alguns fármacos utilizados para outras enfermidades. Assim, em um estudo com pacientes crônicos, Galleano *et al.* (1990) trataram quatro grupos: no primeiro grupo utilizou o esquema terapêutico de 600 mg/kg/dia de Alopurinol, no segundo a dose utilizada foi 900 mg/kg/dia de Alopurinol ambos por 60 dias. No terceiro e quarto grupo foram utilizados Bz e Nif, respectivamente, em esquemas terapêuticos convencionais. O Alopurinol mostrou-se tão eficaz quanto as terapêuticas convencionais para eliminar a parasitemia. Porém, as reações adversas ocorreram em 11% dos pacientes que receberam Alopurinol e em 30% daqueles que recebem nitrofuranos. Além disso, as reações com a terapia convencional foram mais frequentes e de natureza mais grave.

Por meio da mesma metodologia descrita para o tratamento com o Alopurinol, Apt *et al.* (1998) trataram 135 pacientes crônicos com Itraconazol (6mg/Kg/dia durante 120 dias). Os autores observaram cura parasitológica e normalização do ECG em 36,5% dos pacientes tratados, porém novas anormalidades no ECG surgiram em 48,2% dos pacientes após o tratamento.

Benaim *et al.* (2006) demonstraram que a amiodarona, um composto antiarrítmico, possui efeito anti-*T. cruzi* e tal atividade é potencializada quando este fármaco é associado ao posaconazol, um inibidor da síntese de ergosterol.

O posaconazol foi registrado em 2005 na União Européia e, em 2006, nos E.U.A. para o tratamento e profilaxia de infecções fúngicas invasivas e para o tratamento de candidíase azole-resistentes.

Outros triazóis (Figura 2), como o TAK-187 (Takeda Chemical Company) (Urbina *et al.*, 2003c; Corrales *et al.*, 2005), UR-9825 (Uriach e Company) (Urbina *et al.*, 2000, Guedes *et al.*, 2004) e ravuconazol (ER-30346, Eisai Co., BMS 207147, Bristol-Myers Squibb) (Urbina *et al.*, 2003b) também apresentam atividade tripanomicida *in vitro* e *in vivo*.

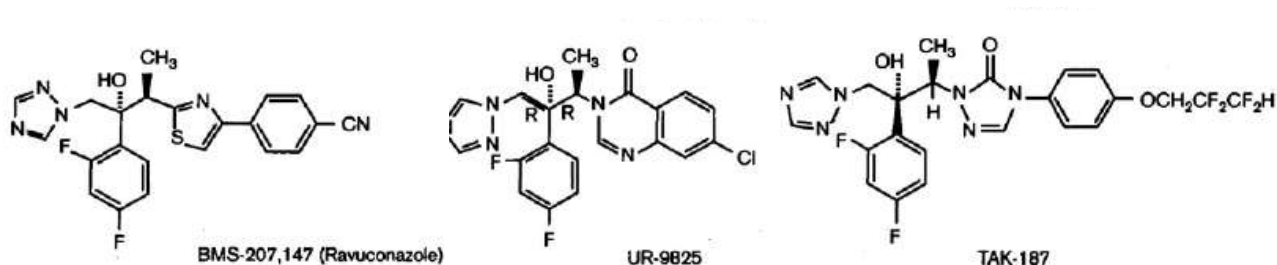


Figura 2 - Fórmula estrutural de novos derivados triazólicos com atividade tripanomicida.

Além desses compostos sintéticos abordados anteriormente, existem ainda grupos de pesquisa que avaliam a atividade de substâncias isoladas de fontes naturais, os chamados fitoterápicos, sobre as diferentes formas do *T. cruzi*.

Em estudos com alcalóides foi observado que a principal atividade destes compostos é a inibição da respiração celular das formas epimastigotas sendo a apomorfina o composto mais ativo (Coura e Castro, 2002).

O taxol, uma substância isolada de *Taxus brevifolia*, uma árvore do Pacífico apresentou atividade sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas alterando de forma significativa a morfologia dos parasitos (Dantas, 2000).

Os extratos brutos etanólicos das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) e *Caryocar brasiliensis* (pequi) foram testados *in vivo* e demonstraram uma significativa interferência sobre a curva de parasitemia, reduzindo o número de parasitos no sangue (Herzog-Soares *et al.*, 2002)

A naftoquinona β -lapachona, presente em várias espécies vegetais da família Bignoniaceae, apresentou atividade contra as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota do parasito (Saúde-Guimarães, 2007).

Do extrato clorofórmico de *Moquinia kingii* foi obtida a apigenina que apresentou ação contra tripomastigotas *in vitro* (Schinor *et al.*, 2004).

Assim, conforme abordado anteriormente, diversas estratégias vêm sendo utilizadas por pesquisadores e todas elas apresentam um objetivo comum: obter um esquema terapêutico para a DC mais eficaz e menos agressivo ao paciente. Contudo, sabe-se que o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos contra a DC necessita de investimentos elevados por parte da indústria farmacêutica, fato que inevitavelmente reflete nos valores de comercialização destes produtos. Logo, nem sempre um fármaco novo que é introduzido no mercado torna-se acessível à população visto que o poder aquisitivo dos indivíduos acometidos por esta doença, na maioria dos casos, é baixo. Desde a concepção de uma nova entidade química até sua introdução no mercado farmacêutico são necessários entre 12 a 16 anos, com investimentos da ordem de US\$ 800-880 milhões (Dimasi, 2003; Giaccotto, 2005). Uma característica marcante deste processo é a alta taxa de insucessos, muitas vezes superior a 90%, considerando-se todas as etapas de pesquisas básicas e desenvolvimento clínico (Yu e Adedoyin, 2003). Dentre as causas de insucesso destacam-se as propriedades farmacocinéticas inapropriadas (Park *et al.*, 2006).

Portanto, deve-se ressaltar que a parceria entre grupos de pesquisas das instituições de ensino e indústria farmacêutica torna-se imprescindível visto que funciona como uma pré-seleção de possíveis ativos direcionando assim a descoberta de novos agentes quimioterápicos.

1.5- Níveis de ferro do hospedeiro e seu impacto na doença de Chagas

Na análise do perfil epidemiológico da DC, pode-se observar que a infecção pelo *T. cruzi* ocorre principalmente, entre populações pobres, residentes em áreas rurais da América Central e do Sul, onde a desnutrição poderia representar um co-fator de impacto sobre o curso da infecção.

O ferro, dentre todos os micronutrientes, é o metal pesado mais abundantemente encontrado nos tecidos e fluidos corporais (Crichton e Ward, 1992), essencial para a sobrevivência de praticamente todas as células vivas, sendo requerido

para o crescimento e proliferação das mesmas. Em um indivíduo adulto há aproximadamente 3 a 5g de ferro e estima-se que sua distribuição seja em torno de 2g como hemoglobina e 8mg como enzimas. Aproximadamente 90% é recuperado e reutilizado extensivamente. Além disso, possui papel importante no transporte de elétrons, síntese de DNA e reações redox essenciais (Taylor e Kelly, 2010)

Dietas não balanceadas, infecções parasitárias ou uso terapêutico de agentes quelantes podem induzir a deficiência de micronutrientes no organismo prejudicando a função de vários compostos que estão ligados a ele.

Estima-se que há mais de dois bilhões de pessoas no mundo com anemia ferropriva, o que representa 1/3 da população mundial sendo a prevalência maior em países em desenvolvimento. Este agravo não é problema exclusivo de populações carentes, sendo considerado uma endemia em expansão em todos os segmentos sociais (Heijblom e Santos, 2007). Assim, ao desenvolver um quadro de anemia ferropriva supõe-se que estes indivíduos podem desenvolver um curso distinto por infecções diversas se comparados a indivíduos com níveis de ferro dentro dos limites considerados normais. Isso porque há redução da atividade da ribonucleotídeo redutase, requerida para a síntese de DNA (Bergeron, 1986), diminuição da atividade das desidrogenases contendo ferro-enxofre, do ciclo do ácido cítrico (Davies *et al.*, 1982), diminuição da concentração de mioglobina e hemoglobina (Siimes *et al.*, 1980).

Em relação aos agentes infecciosos, as alterações nos níveis de ferro podem afetar a relação parasito-hospedeiro, se uma quantidade suficiente de ferro não for disponível para um patógeno, pois sua propagação poderá se tornar dificultada e a infecção atenuada (Payne e Finkelstein, 1978).

Os primeiros trabalhos correlacionando o *T. cruzi* com as alterações nos níveis de ferro e infecção foram realizados por Lalonde e Holbein (1984) e por Loo e Lalonde (1984). Eles observaram que os camundongos infectados com (10^3 ou 10^4) formas sanguíneas da cepa Brasil do *T. cruzi* e com estoques intracelulares de ferro aumentados pela injeção de ferro-dextran (5mg/5 dias dpi) apresentaram maior mortalidade.

Tem-se investigado o papel das proteínas dos hospedeiros, principalmente, a transferrina no transporte destes micronutrientes para as diferentes formas parasitárias. Lima e Villalta (1989) mostraram que as formas amastigotas apresentam receptores para esta proteína sendo o ferro, essencial para o seu crescimento. O mecanismo básico pelo qual a forma amastigota do *T. cruzi* obtém os micronutrientes do

hospedeiro mamífero para sua multiplicação intracelular ainda precisa ser completamente elucidado. Entretanto, supõe-se que esse seja obtido da transferrina através da endocitose mediada por receptores.

O Desferal (DFA) apresenta o mesilato de desferrioxamina como princípio ativo e foi lançado no mercado em 1963 como um medicamento no tratamento do excesso de alumínio e ferro decorrente da talassemia e no tratamento de envenenamentos auxiliando na normalização de estoques deste metal (Keberle, 1964). Por este motivo o DFA (Figura 3) pertence ao grupo farmacoterapêutico denominado agente quelante apresentando um sideróforo hexadentado natural que contém tihidroxamato produzido por *Streptomyces pylosis* (Keberle, 1964; Barry *et al.*, 1974). Quase todos os quelantes identificados pertencentes à função sideróforos contém pelo menos um ácido hidroxâmico, um catecol e/ou um ácido α -hidroxicarboxílico como sítios ligantes (Benite *et al.*, 2002).

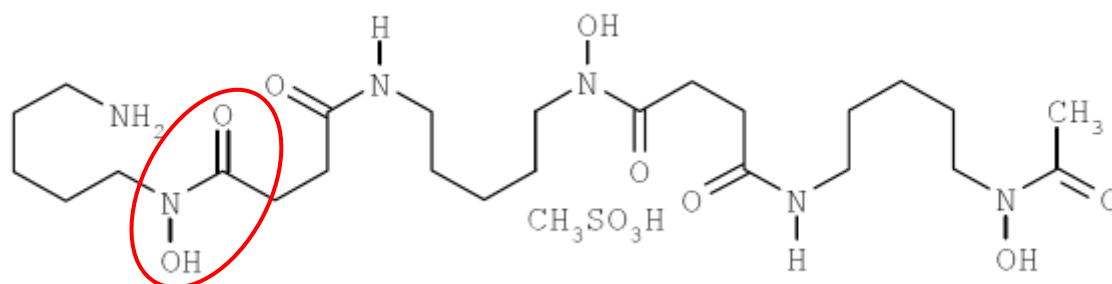


Figura 3 - Fórmula estrutural do Desferal (Mesilato de desferrioxamina). O grupo destacado em vermelho refere-se ao grupo ligante do sideróforo denominado hidroxamato.

Os sideróforos desempenham a função de solubilizar especificamente ferro, em presença de outros íons metálicos, e incorporá-lo ao metabolismo celular. Este processo é acompanhado por quelação seletiva de Fe(III). Algumas características importantes, apresentadas pelo íon Fe(III), que garantem sua seletividade são a dureza, o tamanho, a configuração dos elétrons d, a alta densidade de carga, e a alta eletronegatividade. Tais características conferem ao Fe(III) o caráter de um poderoso ácido de Lewis, um cátion duro, que formará, desta forma, ligações mais estáveis com átomos fracamente polarizáveis (ânions duros), como por exemplo, o oxigênio (Benite *et al.*, 2002).

Em relação às suas propriedades farmacocinéticas, o DFA apresenta curto período de meia-vida no plasma(5-10min) (Taylor e Kelly, 2010) e sua administração deve ser lenta por um determinado tempo (Summers *et al.*, 1979; Lee *et al.*, 1993). É uma droga hidrofílica com elevado peso molecular (Porter *et al.*, 2005) sendo estes os fatores que dificultam sua absorção pelas células.

Sua farmacodinâmica envolve formação de complexos com os íons trivalentes do ferro dando origem ao complexo Ferrioxamina que apresenta características lipofílicas. Posteriormente, é eliminado do organismo através da urina, por meio de filtração glomerular, ou ainda por meio das fezes. Assim, uma vez ligado ao quelante, o ferro é inativado metabolicamente não resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Este quelante tem sido empregado em estudos que buscam avaliar a relação entre infecção e *status* de ferro (Dhur *et al.*, 1989) e atua tanto no meio intracelular quanto no extracelular. Dois mecanismos são propostos para esta ação: indução da

deficiência de ferro por limitar sua disponibilidade dentro da célula ou interferência direta com a aquisição de ferro pelo parasito (Hershko e Peto, 1988).

Estudos realizados por Arantes *et al.* (2007) demonstraram que a deficiência de ferro induzida pelo uso de DFA poderia ser um fator favorável ao hospedeiro, reduzindo a parasitemia, a mortalidade, bem como as lesões decorrentes da fase aguda, possivelmente pelo desenvolvimento de uma resposta imune mais precoce, sugerida pelo aumento do peso relativo dos órgãos linfóides.

Dados da literatura demonstram que a cepa Y é letal em murinos ainda no início da infecção. Entretanto, Francisco *et al.* (2008) demonstraram que a utilização do DFA associado ou não ao tratamento etiológico da DC permitiu maior sobrevivência de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, até 40 dias após a infecção. Por este motivo, esses animais foram mantidos no CCA (Centro de Ciência Animal) da Universidade Federal de Ouro Preto, durante o período de 18 meses, quando então foram eutanasiados com o objetivo de avaliar a influência da alteração dos níveis de ferro associada ou não ao tratamento com Bz no curso crônico da infecção de camundongos pela cepa Y do *T. cruzi* e seu impacto na biologia dos parasitos resistentes ao tratamento.

Uma vez que a infecção pelo *T. cruzi* ocorre principalmente, entre populações pobres, residentes em áreas rurais da América Central e do Sul torna-se relevante avaliar as alterações no balanço de micronutrientes sobre o curso da DC bem como na resposta terapêutica ao Bz visto que muitos agentes infecciosos dependem do estado nutricional do hospedeiro para sua própria sobrevivência no organismo.

A indução da deficiência de micronutrientes pode ser obtida por diversos fatores, incluindo dietas deficientes, infecções parasitárias ou uso terapêutico de agentes quelantes. Trabalhos recentes realizados pelo nosso grupo (Arantes *et al.*, 2007 e Francisco *et al.*, 2008) sugerem que, no âmbito da interação *T. cruzi*/hospedeiro em modelo murino, a deficiência de ferro poderia ser um fator favorável ao hospedeiro, reduzindo a parasitemia, a mortalidade, bem como as lesões decorrentes da fase aguda. Por este motivo, com o intuito de elucidar a relação *status* de ferro *versus* infecção pelo *T. cruzi*, o objetivo deste trabalho foi avaliar o curso crônico da infecção de animais pela cepa Y tratados ou não com Bz, associados ou não a DFA bem como verificar possíveis mudanças no comportamento biológico e bioquímico de populações de parasitos reisolados desses animais.

3.1 - Objetivo geral

Avaliar a cura parasitológica e as alterações histopatológicas em camundongos infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* submetidos ou não à redução dos estoques de ferro pelo uso da DFA, tratados ou não com Bz, bem como caracterizar as populações do parasito reisoladas por hemocultura.

3.2 - Objetivos específicos

Primeira etapa:

Nos animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* tratados com DFA e/ou Bz, 18 meses após a infecção, avaliar os níveis de anticorpos da classe IgG e o parasitismo sanguíneo; Após a eutanásia, avaliar o parasitismo tecidual e a inflamação cardíaca e hepática.

Segunda etapa:

Nas populações do *T. cruzi* isoladas dos animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* tratados com DFA e/ou Bz, após 18 meses de infecção, caracterizar o comportamento biológico e bioquímico.

4- Animais, materiais e métodos

4.1 - Etapas previamente realizadas

Utilizaram-se, 80 camundongos Swiss, machos, 30 dias de idade, distribuídos em quatro grupos experimentais como representado na Figura 4: (1) INT - infectado e não tratado; (2) BZ - infectado e tratado com Bz por 21 dias; (3) DFA-35 - infectado e tratado com DFA por 35 dias e (4) DFA/BZ-35 - infectado e tratado com DFA por 35 e Bz por 21 dias.

Os animais dos grupos DFA-35 e BZ/DFA-35 receberam a DFA pela via intraperitoneal (0,05 mL) durante 14 dias que precederam à infecção e nos 21 dias pós-infecção.

Os camundongos pertencentes aos grupos somente infectados receberam a mesma quantidade do diluente do medicamento (água para injeção).

O tratamento com Bz foi realizado utilizando-se a seguinte metodologia: o comprimido foi macerado liberando 100mg do princípio ativo, que foi ressuspenso em 10 mL de água destilada em goma arábica obtendo-se uma concentração final de 10 mg/mL. Os animais dos grupos BZ e BZ/DFA-35 receberam por via oral, através de gavagem utilizando agulha especial para tratamento, 100mg/Kg/dia cada, em dose única, por 21 dias consecutivos começando pelo primeiro dia de parasitemia. Os camundongos eram pesados semanalmente para que recebessem a dose individualizada, de acordo com seu peso corporal.

Nesse estudo foi utilizado um inóculo de 500 formas sanguíneas da cepa Y. Camundongos não infectados foram utilizados para determinação do número de núcleos celulares no coração e fígado para fins de determinação do processo inflamatório no grupo dos animais infectados.

Os animais foram acompanhados até 18 meses após a infecção. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética da UFOP sob número de protocolo 2008/11.

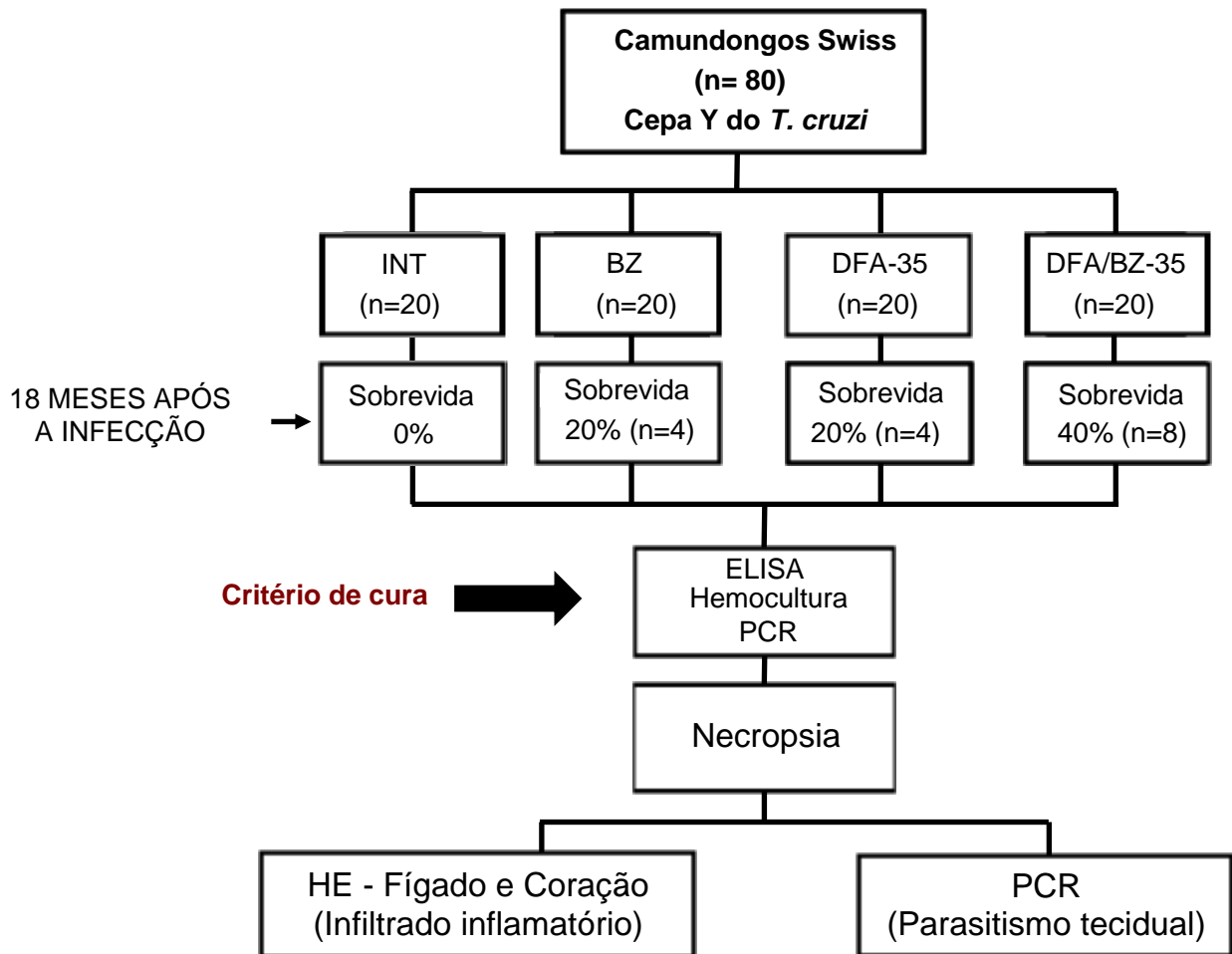


Figura 4 - Delineamento experimental da primeira etapa. Camundongos Swiss machos (n=80), infectados com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, infectados e não tratados (INT, n=20), tratados com Bz por 21 dias (BZ, n=20), tratados com DFA por 35 dias (DFA, n=20), infectados e tratados com DFA por 35 e Bz por 21 dias (DFA/BZ-35, n=20).

4.2 - Etapas realizadas neste trabalho

4.2.1- Primeira etapa

Avaliação da cura parasitológica e da inflamação hepática e cardíaca

4.2.1.1 - Animais, eutanásia e coleta de amostras

Na primeira etapa foram utilizados 16 camundongos Swiss machos que sobreviveram a fase aguda da infecção no trabalho realizado por Francisco *et al.*, 2008 (Figura 4). Para confirmar a cura parasitológica foi coletado sangue (600µL) para realização das técnicas imunológica (ELISA), parasitológica (Hemocultura) e molecular (PCR).

Os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico após 18 meses de infecção sendo coletados fragmentos do fígado, baço, esôfago, coração, pulmão, músculo esquelético, cérebro, cólon e linfonodo abdominal. As amostras do fígado, baço, esôfago, coração, pulmão, músculo esquelético, cérebro, cólon e linfonodo abdominal utilizadas para posterior extração de DNA foram lavadas exaustivamente em tampão fosfato (pH 7,2), secas em papel de filtro e congeladas a -70°C. As amostras do fígado e coração destinadas a confecção de lâminas histológicas foram cortadas transversalmente para a obtenção de fragmentos com aproximadamente 2mm de espessura, fixadas em formol tamponado a 10% (pH 7.2) por 24 horas.

*4.2.1.2 - Pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* pela ELISA*

Foram coletados 200µL de sangue do plexo venoso retro-orbital dos animais para realização dos testes de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Posteriormente, as amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro que foram diluídos a 1:80 em PBS. Foi utilizado antígeno alcalino obtido de cultura em crescimento exponencial da cepa Y do *T. cruzi* em meio LIT (Vitor e Chiari, 1987) e conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase.

A ELISA foi realizada segundo a técnica de Voller *et al.* (1976) utilizando-se microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, previamente sensibilizados com 3µg de proteína por poço e diluída em solução tampão carbonato, pH 9,6. Após incubação por 18h, a 4°C, o excesso de solução antigênica foi removido por quatro

lavagens sucessivas com solução salina contendo Tween 20 a 0,05%. Após a lavagem, os soros foram incubados a 37°C por 45 min.

A seguir, foi adicionado o conjugado anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase. As placas foram incubadas por 45 min, a 37°C, posteriormente adicionou-se o substrato (ofenilodiamino - OPD - Sigma). Entre as etapas da reação, as placas de ELISA foram submetidas a quatro lavagens com PBS-Tween 20. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N (32µl por poço) e as leituras realizadas no leitor de microplaca (BIO RAD, Modelo 3550) com filtro de 490nm.

A ELISA foi considerada positiva quando a leitura, em densidade ótica, for maior do que a média, somada a duas vezes o desvio padrão do valor obtido de 10 soros de animais não infectados pelo *T. cruzi*, testados em paralelo aos soros avaliados (Gusmão *et al.*, 1984). Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações.

4.2.1.3 - Hemocultura

A hemocultura foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Filardi e Brener (1987). Para este exame, 200µL de sangue foram coletados assepticamente do seio venoso retro-orbital com pipeta de Pasteur dos animais (n=16). O sangue foi distribuído em dois tubos (A e B) contendo 3mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964).

Os tubos foram incubados em estufa a 28°C e uma gota do sedimento foi examinada ao microscópio para detectar o parasito aos 30, 60 e 90 dias após incubação.

4.2.1.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.2.1.4.1- Extração do DNA

Sangue (Extração fenólica)

Foram coletados assepticamente 200µL de sangue do plexo venoso retro-orbital dos animais. O sangue foi conservado em 200µL de guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M (*Sigma Chemical Co*, USA) pH 8,0 (Ávila *et al.*, 1991). Esta mistura,

sangue/guanidina/EDTA, foi fervida sete dias após a coleta, a 100°C, durante sete minutos, com o objetivo de promover a linearização dos minicírculos concatenados na rede de kDNA (Britto *et al.*, 1993) permitindo assim, uma distribuição homogênea das sequências alvo presentes na amostra. O lisado foi estocado à temperatura ambiente. A extração do DNA foi processada após homogeneização de cada amostra empregando a técnica proposta por Sambrook *et al.* (1989) modificada por Gomes *et al.* (1998). Alíquotas de 200µL do lisado de sangue foram transferidas para tubos de microcentrífuga 1,5mL e submetida a desproteíntização em igual volume de uma mistura de fenol-clorofórmio (100µL de fenol Tris pH 8,0 e 100µL de clorofórmio). Essa mistura foi homogeneizada lentamente por 2 minutos e centrifugada a 6.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e ao sedimento foram adicionados 150µL de H₂O milli-Q estéril e novamente centrifugado a 6.000 rpm por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 320µL de clorofórmio ao sobrenadante, que foi centrifugado na mesma rotação anterior. A precipitação do DNA presente no sobrenadante foi realizada em banho de gelo, por 15 minutos, com 10 mM de acetato de sódio e dois volumes de etanol absoluto. Após centrifugação, a 13.000 rpm, por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e após volatilização do etanol, o DNA foi resuspenso em 20µL de água milli-Q estéril. Durante este estágio, um controle negativo e um positivo foram processados em paralelo.

Tecidos (Kit Wizard – Promega)

Os fragmentos congelados à - 70°C foram transferidos para uma placa de Petri estéril onde foram totalmente picotados com auxílio de uma lâmina de bisturi. A seguir, foram transferidos com auxílio de palitos de madeira estéril para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL, adicionado 600 µL da solução de lise nuclear seguindo-se a homogeneização. As amostras foram então levadas ao banho-maria a 56°C por 30 minutos. A seguir, adicionou-se 200µL da solução de precipitação protéica e homogeneizou-se vigorosamente a mistura, no vortex, por 20 segundos. A centrifugação foi realizada a 14000 rpm, por 3 minutos, a temperatura ambiente, na qual foi observada a formação de um pellet. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo contendo 600µL de isopropanol (CH₃CHOHCCH₃) e misturado delicadamente por inversão por 5 minutos. Novamente, realizou-se a centrifugação a 14000 rpm, a temperatura ambiente, por 6 minutos sendo observada a formação de um pellet claro. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 600µL de

etanol 70% (ETOH) a temperatura ambiente misturando por inversão por 5 minutos. O etanol foi então vertido e as quantidades remanescentes evaporadas.

Por fim, adicionou-se 100µL da solução de re-hidratação de DNA e as amostras foram deixadas *overnight* a temperatura ambiente.

4.2.1.4.2- Amplificação específica do *T. cruzi* (sangue e tecidos)

Após a extração, o DNA foi amplificado utilizando-se os iniciadores específicos para *T. cruzi* (S35 = 5'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA 3' e S36 = 5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT 3'), que são capazes de amplificar um fragmento de 330 pb da região variável do minicírculo. Em síntese: 2µL da solução de DNA de cada amostra foi adicionada a solução contendo 10mM de Tris-HCL (pH 9,0); 75 mM de KCL; 1,5 Mm de Mg CL₂; 0,1% de Triton 100x; 0,25mMm de cada dNTP (Sigma Company Ltda, USA); 10pmol de cada iniciador (S35 e S36), 0,5U de taq DNA polimerase (Platinum, Invitrogen, SP; Brasil) e água suficiente para completar 11µL. Esta mistura foi coberta com 30 µL de óleo mineral e submetida ao seguinte programa de amplificação: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos contendo um passo de desnaturação a 94°C por 1 minuto, um de anelamento a 64°C por um minuto e um passo de extensão a 72°C por 1 minuto. Para finalizar, uma de extensão a 72° C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e visualizados após coloração pela prata (Santos *et al.*, 1993).

4.2.1.5 - Processamento do material para avaliação histopatológica

Os fragmentos dos tecidos coletados e fixados em formol foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em parafina e, posteriormente, submetidos a microtomia para a obtenção de 3 cortes seriados com espessura de 4µm. A partir desse ponto, foram desparafinizados em dois banhos de xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente por 5 minutos.

4.2.1.5.1- Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)

Os cortes obtidos foram corados pela hematoxilina, lavadas em água corrente e diferenciadas rapidamente em álcool acidulado; novamente lavadas em água corrente e corados pela eosina. Após o último processo de lavagem em água corrente, as lâminas foram levadas até a estufa a 56°C para secagem e, posteriormente, montadas com Entellan e lamínula.

4.2.1.5.2- Quantificação da inflamação no coração e fígado

Todos os núcleos celulares presentes nos fragmentos do coração e fígado foram quantificados em 20 imagens aleatórias (área total percorrida = $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva de 40x foram digitalizadas através do microscópio Leica DM5000B com uma microcâmera acoplada e do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.1 R1) ambos pertencentes ao Laboratório Multiusuário do NUPEB. Para a análise das imagens obtidas foi utilizado o programa Leica QWin V3. O processo inflamatório foi determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não infectados, acrescido de um desvio padrão. Os animais infectados pelo *T. cruzi* com valores da quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca ou hepática.

4.2.2- Segunda etapa

*Caracterização biológica e bioquímica das populações do *T. cruzi* isoladas durante a avaliação da cura parasitológica*

4.2.2.1 - Inoculação dos animais

As populações do *T. cruzi* obtidas das hemoculturas, foram mantidas em meio LIT para diferenciação até a obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas para inoculação em camundongos Swiss. Após duas passagens, formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas para inoculação dos grupos experimentais. A contagem dos parasitos para a preparação do inóculo foi realizada segundo a técnica descrita por Brener (1962), sendo o inóculo de 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas.

Utilizaram-se camundongos Swiss machos com 30 dias de idade e peso de aproximadamente 20g (n=90), divididos em seis grupos experimentais, com 15 animais em cada grupo, como representado na Figura 5: (1) infectado com a cepa Y; (2) infectado com o isolado 1A; (3) infectado com o isolado 1B; (4) infectado com o isolado 2A; (5) infectado com o isolado 2B e (6) infectado com o isolado 3. Para determinação da curva de parasitemia foram utilizados seis desses animais enquanto nove foram utilizados para avaliação histopatológica. Nove animais não infectados foram utilizados para avaliação histopatológica e determinação do padrão de normalidade em cada tempo de necropsia.

4.2.2.2 - Parâmetros avaliados

Infectividade (INF)

A infectividade foi avaliada pela positividade do exame a fresco do sangue periférico dos camundongos e realização de hemocultura quando necessária. A pesquisa de tripomastigotas sanguíneas iniciou-se a partir do 4º dia após a infecção (dpi) pelo exame microscópico de sangue a fresco, coletado da veia caudal do animal.

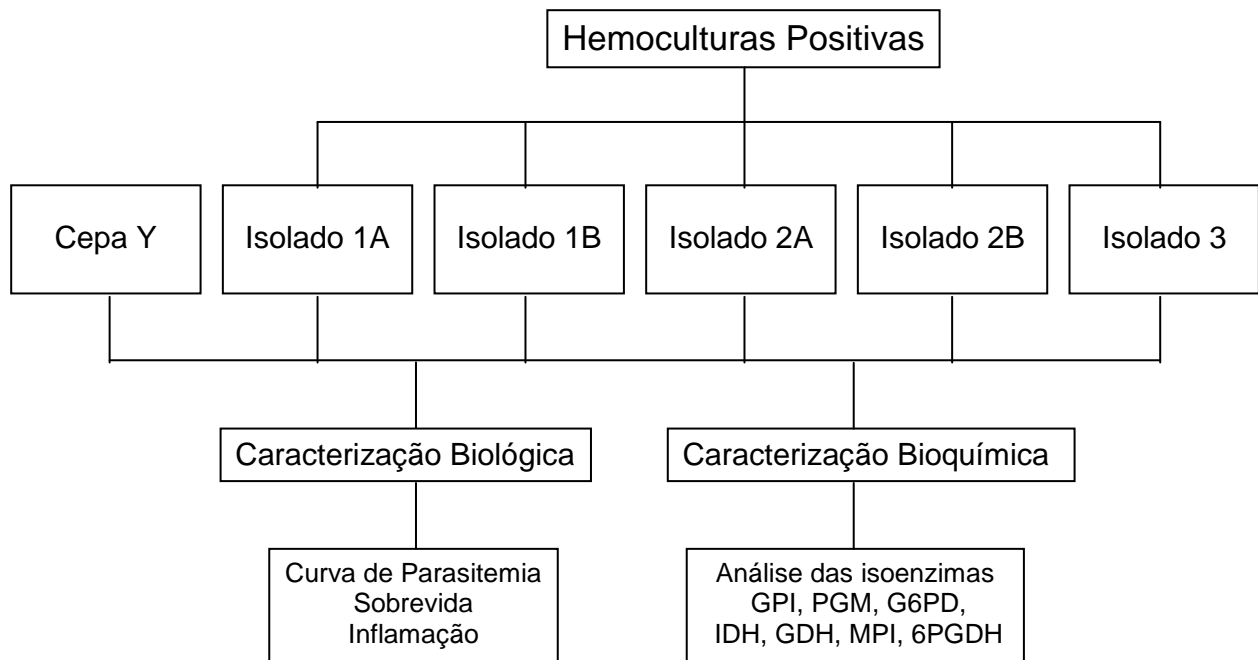


Figura 5 - Delineamento experimental da segunda etapa. Camundongos Swiss machos (n=90), infectados com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (n=15) e com as populações isoladas 1A, 1B, 2A, 2B e 3 (n=15 para cada grupo).

Parasitemia (PAR)

A contagem da parasitemia pelo exame a fresco do sangue periférico permitiu obter o perfil da curva de parasitemia dos animais ao longo da fase aguda da infecção e avaliar o nível de parasitemia, sendo essa avaliação realizada de acordo com a metodologia de Brener (1962).

A contagem dos parasitos teve início no 4^o dia após a inoculação e foi avaliada diariamente, até que não fosse observado parasito no exame de sangue a fresco por cinco dias consecutivos.

As curvas de parasitemia representam as médias diárias do número de parasitos observados no sangue periférico dos camundongos de cada grupo experimental e sua avaliação permitiu determinar os seguintes parâmetros:

Período Pré-patente (PPP)

O PPP corresponde ao período compreendido entre a inoculação e o dia anterior ao primeiro dia em que foi detectado parasito no sangue periférico do animal através do exame a fresco. O resultado foi expresso em dias.

Período Patente (PP)

O PP corresponde ao período compreendido entre o primeiro e o último dia de exame a fresco positivo e foi expresso em dias.

Pico Máximo de Parasitemia (PMP)

O PMP corresponde ao máximo de parasitemia e foi expresso em número de tripomastigotas sanguíneos/0.1mL de sangue, detectado pelo exame de sangue a fresco segundo a metodologia de Brener (1962).

Dia do Pico Máximo (DPMP)

O DPMP corresponde ao dia de ocorrência do máximo de parasitemia e foi expresso em dias.

Sobrevida

A sobrevida dos animais foi avaliada diariamente até o 30^o dpi e foi expressa em porcentagem cumulativa.

4.2.2.3 - Eutanasia, coleta, fixação, processamento e coloração do material

Foram eutanasiados três animais de cada grupo experimental no 7^o, 11^o e 15^o dpi sendo coletados fragmentos do fígado e coração como descrito anteriormente.

4.2.2.4 - Caracterização Bioquímica: Perfil Eletroforético de Isoenzimas (Zimodemas)

4.2.2.4.1- Obtenção de epimastigotas cultivadas em meio LIT (massa úmida) e do extrato enzimático

Após crescimento exponencial em meio LIT de cultura, 30mL de cada amostra (Isolado 1A, 1B, 2A, 2B e 3) foram centrifugados à 3.500rpm, 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado por inversão e o sedimento ressuspense em 10mL de PBS 1X estéril. Novamente, centrifugou-se à 3.500rpm, 4°C por 15 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se em 1mL de PBS 1X estéril e transportou-se para um tubo eppendorf 1,5mL previamente pesado. Finalmente, seguiu-se a centrifugação à 10.000rpm, 4°C por 10 minutos com posterior descarte do sobrenadante e armazenamento do sedimento (massa úmida) à -70°C.

A massa úmida de parasitos foi descongelada em banho de gelo e submetida à lise osmótica em presença de estabilizador enzimático (2,0mM Ditioneitol, 2,0mM ácido ϵ -amino capríco, 2,0mM EDTA/pH 7,0) na proporção de 1:1 (p/v=mg/ μ L) da solução. O lisado foi centrifugado a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10min (Kilgour e Godfrey, 1976). O sobrenadante (extrato enzimático) foi aliquoteado e armazenado a -70°C para ser utilizado posteriormente na análise de isoenzimas.

4.2.2.4.2- Eletroforese de Isoenzimas e Revelação

A eletroforese de isoenzimas foi realizada segundo metodologia de Ben Abderrazak *et al.* (1993), em sistema horizontal, sob refrigeração (Helena, Beaumont, Texas, EUA), utilizando membrana de acetato-celulose (Helena, Beaumont, TE, EUA). As membranas foram submersas, durante 20min, em tampão de embebeção específico para cada sistema enzimático. O extrato enzimático foi depositado sobre a superfície da membrana de celulose com auxílio de um aplicador (Helena, Texas, EUA), concentrado ou diluído, dependendo do sistema enzimático. As condições da eletroforese e os reagentes usados na reação encontram-se descritos nas Tabelas I e II.

Após a eletroforese, as bandas protéicas foram visualizadas por meio de reações bioquímicas específicas, utilizando a mistura reacional contendo todos os

reagentes necessários à atividade da enzima acrescida de agente revelador. Após a revelação, a reação foi interrompida com solução de ácido acético 5% e as membranas foram lavadas em água destilada, fotografadas e, posteriormente, analisadas.

5.1 - Primeira Etapa

Avaliação da cura parasitológica

5.1.1 - ELISA

Anticorpos da classe IgG específicos para antígenos do *T. cruzi* foram encontrados no soro dos 16 animais avaliados. Portanto, a ELISA foi 100% positiva (Tabela 3).

5.1.2 - Hemocultura

Dos dezesseis animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* três (3/16, 18,75%) apresentaram hemocultura positiva até o 90^o dia, sendo todos pertencentes ao grupo DFA/BZ-35 (Tabela 3).

5.1.3 - PCR

5.1.3.1 - PCR em sangue

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos pela PCR em sangue e a Figura 6 é de um gel representativo das reações de PCR em sangue. A PCR mostrou que 75% (12/16) dos animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* apresentaram PCR positivo. Quando esses resultados foram analisados por grupo, observou-se um índice de positividade de 50% para os animais pertencentes aos grupos BZ (2/4) e DFA-35 (2/4), e 100% (8/8) para o grupo DFA/BZ-35.

Tabela 3 - Resultados dos testes de ELISA, Hemocultura e PCR realizados no sangue de camundongos infectados por 18 meses com a cepa Y, tratados ou não com desferrioxamina associada ou não ao benzonidazol.

	ELISA (n/%)		HEMOCULTURA (n/%)		PCR (n/%)	
	+	-	+	-	+	-
BZ (n=4)	4/100%	0/0%	0/0%	4/100%	2/50%	2/50%
DFA-35 (n=4)	4/100%	0/0%	0/0%	4/100%	2/50%	2/50%
DFA/BZ-35 (n=8)	8/100%	0/0%	3/37,5%	5/62,5%	8/100%	0/0%

Nota: Grupo BZ: camundongos infectados e tratados com benzonidazol por 21 dias; Grupo DFA-35: camundongos infectados e tratados com desferrioxamina por 35 dias; Grupo DFA/BZ-35: camundongos infectados e tratados com desferrioxamina por 35 e benzonidazol por 21 dias.

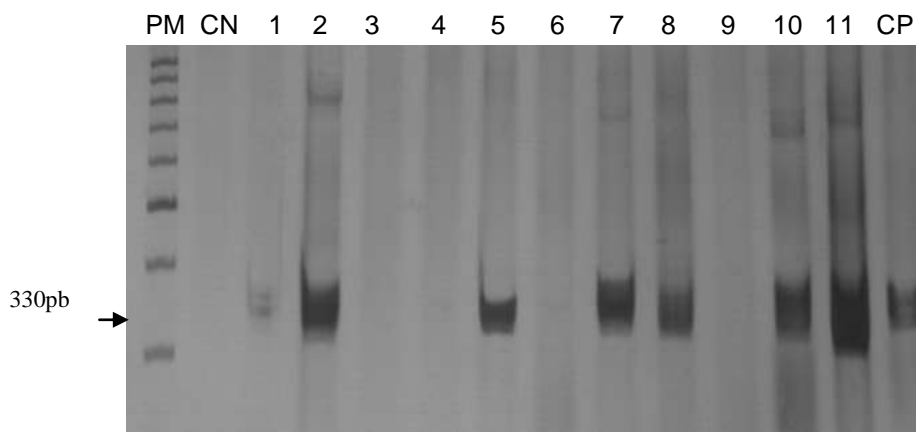


Figura 6 - Gel de poli-acrilamida representativo da amplificação, pela PCR, do kDNA do *Trypanosoma cruzi* obtido em amostras de sangue de camundongos infectados por 18 meses com a cepa Y, tratados ou não com desferrioxamina associada ou não ao benzonidazol.

Nota: PM: Marcador de Peso Molecular 100pb, CN: Controle Negativo, CP: Controle Positivo. Os números representam as amostras de sangue de 11 dos 16 animais sobreviventes sendo 4 pertencentes ao grupo BZ (camundongos infectados e tratados com benzonidazol por 21 dias), 4 animais do grupo DFA – 35 (camundongos infectados e tratados com desferrioxamina por 35 dias) e 3 animais pertencentes ao grupo DFA/BZ-35: camundongos infectados e tratados com desferrioxamina por 35 e benzonidazol por 21 dias

5.1.3.2 - PCR em tecido

Fragmentos de DNA do *T. cruzi* foram detectados em 47,5% (67/144) das reações de PCR realizadas no fígado, baço, esôfago, coração, pulmão, músculo esquelético, cérebro, cólon e linfonodo abdominal dos 16 camundongos avaliados. O tecido que apresentou a maior e menor taxa de positividade foi o cólon (12/16 -75%) e o baço (4/16 - 25%), respectivamente.

A porcentagem de PCR positiva por grupo foi 68,6; 40 e 40,8% para os grupos BZ, DFA-35 e DFA/BZ-35, respectivamente.

Os resultados obtidos pela PCR demonstraram heterogeneidade na positividade em relação aos nove tecidos avaliados. No grupo BZ os órgãos com a maior taxa de positividade (100%) foram cólon, esôfago e linfonodo abdominal enquanto que a menor taxa observada (25%) foi para o músculo esquelético.

O grupo DFA-35 apresentou maior porcentagem de positividade no músculo esquelético e cólon (75%) enquanto que fígado, baço, coração, pulmão e cérebro apresentaram 25% de positividade.

O grupo DFA/BZ-35 apresentou 71,4% e 0% de positividade nas análises realizadas em linfonodo abdominal e esôfago, respectivamente.

A PCR realizada em esôfago apresentou diferença significativa na positividade quando comparada aos grupos BZ e DFA/BZ-35 (Figura 7).

Considerando os diferentes tecidos avaliados, a PCR foi negativa em pelo menos uma das amostras de cada animal. Em apenas um camundongo pertencente ao grupo DFA/BZ-35 não foi detectada a presença do fragmento de 330pb em nenhum dos tecidos avaliados.

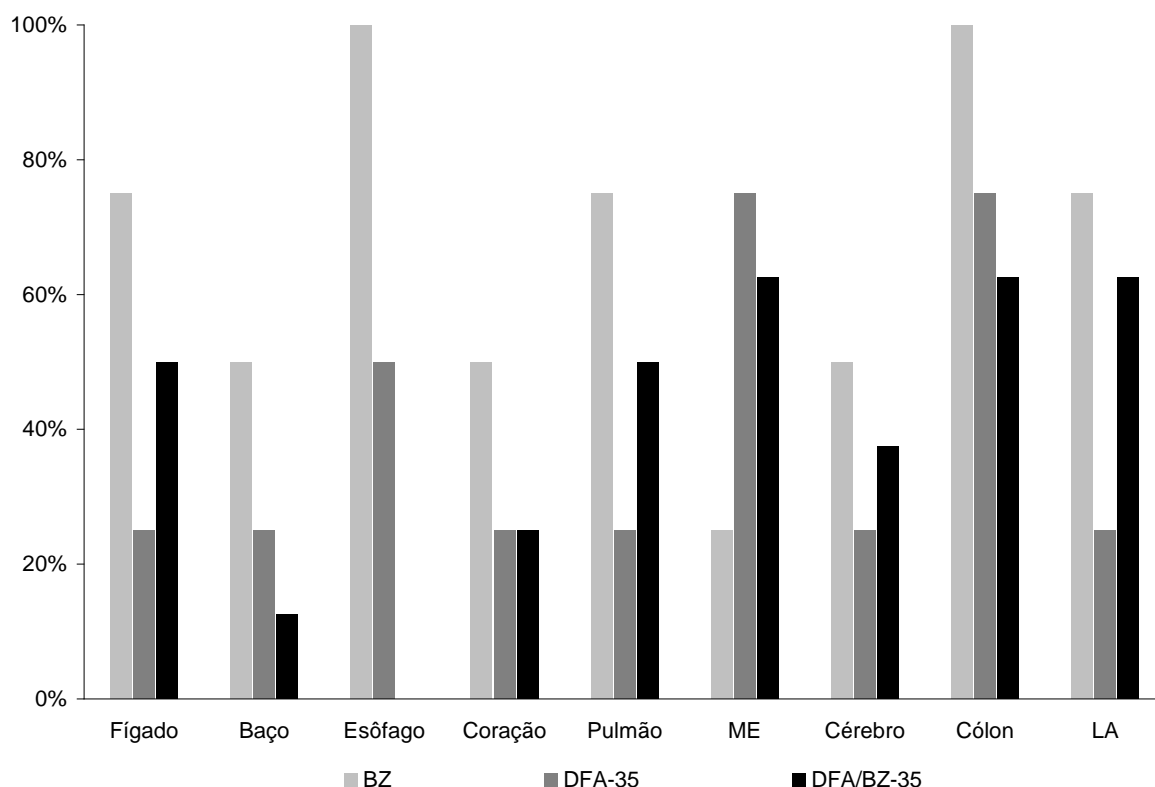


Figura 7 - Percentagem de PCR positiva no fígado, baço, esôfago, coração, músculo esquelético (ME), cérebro, cólon e linfonodo abdominal (LA) de camundongos infectados por 18 meses com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, tratados ou não com desferrioxamina, associada ou não ao benzonidazol.

Nota: Grupo BZ: camundongos infectados e tratados com benzonidazol por 21 dias; Grupo DFA-35: camundongos infectados e tratados com desferrioxamina por 35 dias; Grupo DFA/BZ-35: camundongos infectados e tratados com desferrioxamina por 35 e benzonidazol por 21 dias.

5.1.4 - Avaliação Histopatológica

Fragmentos do coração e fígado dos 16 animais foram avaliados histologicamente por HE. Nos animais controle, as secções histológicas mostraram estruturas sem alterações histopatológicas.

No coração, o processo inflamatório foi significativamente maior nos animais do grupo BZ quando comparado aos grupos NI, DFA-35 e DFA/BZ-35 (Figura 8A). Nos grupos DFA-35 e DFA/BZ-35 não foi observada diferença significativa em relação ao grupo NI. Portanto, os animais desses grupos, estatisticamente, não apresentaram inflamação e qualitativamente apresentaram um processo inflamatório discreto, de aspecto morfológico semelhante àquele observado no grupo BZ, onde predominavam

as células de padrão mononuclear. Degeneração hialina intensa foi observada no grupo BZ sendo discreta nos demais grupos.

No fígado, os grupos BZ e DFA/BZ-35 apresentaram inflamação em relação ao grupo NI e DFA-35. Entretanto, nos animais do grupo BZ, a inflamação também foi significativamente maior àquela observada no grupo DFA/BZ-35 (Figura 8B). O infiltrado inflamatório também era constituído predominantemente por células mononucleadas em focos no parênquima hepático.

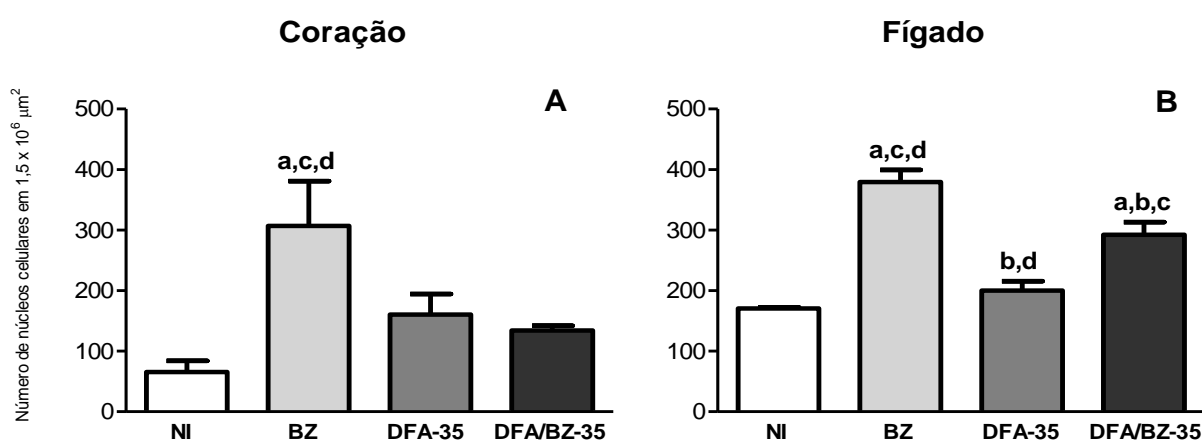


Figura 8 - Análise morfométrica do processo inflamatório cardíaco (A) e hepático (B) de animais infectados por 18 meses com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Nota: Grupo NI: animais não infectados; Grupo BZ: infectados e tratados com benznidazol por 21 dias; Grupo DFA-35: infectados e tratados com desferrioxamina por 35 dias; Grupo DFA/BZ-35: camundongos infectados e tratados com desferrioxamina por 35 e benznidazol por 21 dias. As letras a, b, c, d representam diferenças significativas entre os grupos NI, BZ, DFA-35 e DFA/BZ-35, respectivamente.

5.1.4 - Avaliação da cura parasitológica

Considerando os resultados obtidos na ELISA, Hemocultura e PCR, não houve cura parasitológica.

5.2 - Segunda Etapa

Caracterização biológica e bioquímica das populações do *T. cruzi* isoladas durante a avaliação da cura parasitológica

5.2.1 - Parâmetros relacionados às curvas de parasitemia

Infectividade (INF)

A taxa de infectividade (INF) observada nos camundongos infectados com as populações do *T. cruzi* (1A, 1B, 2A, 2B e 3) isoladas por hemocultura e da cepa Y foi de 100%. Tais populações foram provenientes dos animais pertencentes ao grupo DFA/BZ-35.

Parasitemia (PAR)

As curvas de parasitemia obtidas em camundongos inoculados com as cinco populações isoladas (1A, 1B, 2A, 2B e 3) e a cepa Y do *T. cruzi* estão apresentadas na Figura 9. A área sob a curva de parasitemia foi significativamente menor em todas as as populações isoladas quando comparadas a cepa Y. Entretanto, a comparação até o 15^o dia entre os isolados não mostrou diferença significativa entre eles. De todos os isolados, apenas o 1B apresentou níveis parasitêmicos maiores em relação aos demais isolados a partir do 15^o dpi.

Período pré-patente (PPP)

Os animais infectados com a cepa Y apresentaram um PPP médio significativamente menor em relação a todos os animais infectados com os diferentes isolados. Além disso, o grupo infectado com o isolado 1A também apresentou um PPP médio significativamente menor quando comparado ao grupo infectado com o isolado 1B (Tabela 4).

A cepa Y apresentou PPP médio de $3,01 \pm 0,04$ dias; para o isolado 1A e 2B este foi de $5 \pm 1,1$ dias, para o 2A foi de $5,3 \pm 0,82$ dias, para o 3 foi de $5,7 \pm 0,82$, e para o isolado 1B foi de $7,83 \pm 2,41$ dias.

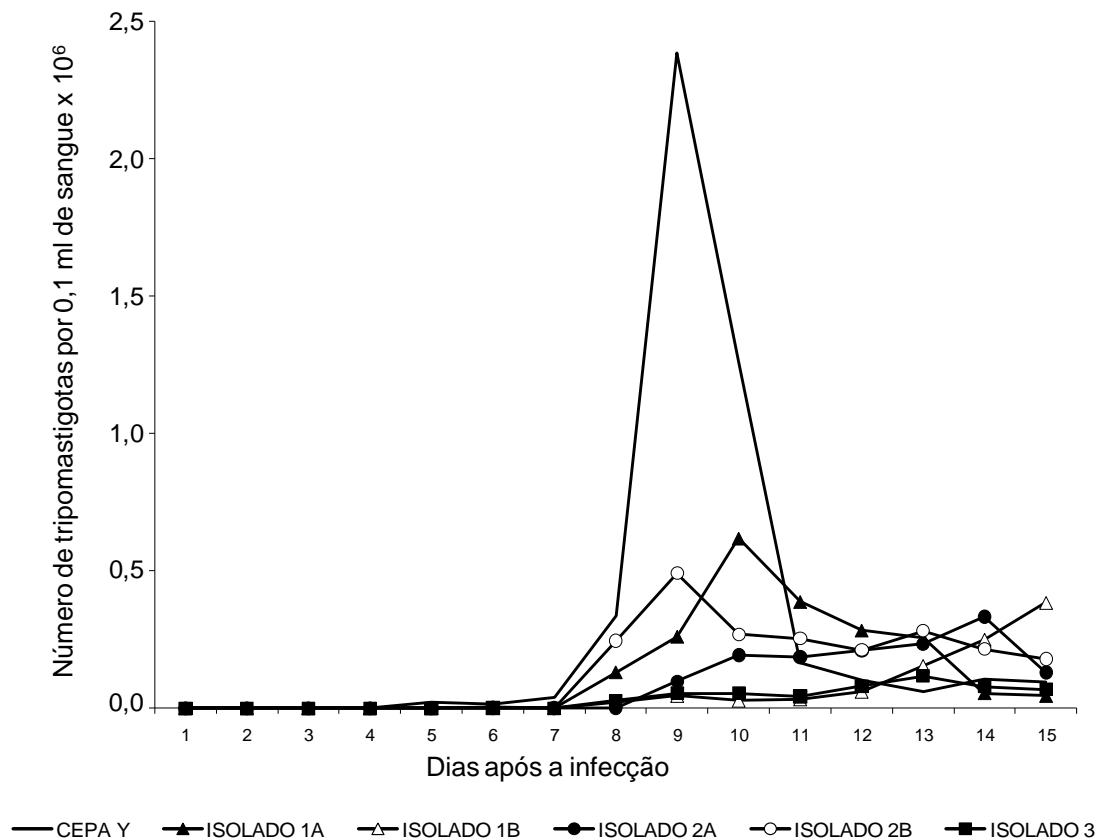


Figura 9 - Curvas de parasitemia observadas até o 15^o dia após a infecção em camundongos inoculados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.

Período patente (PP)

O PP foi o parâmetro que apresentou o menor número de diferenças significativas ($p \leq 0,05$), sendo esta observada apenas na comparação entre a cepa Y e o isolado 1A (Tabela 4).

Os animais inoculados com a cepa Y apresentaram uma elevação súbita nos níveis de parasitemia seguidos de redução. Nos animais inoculados com os isolados os picos foram irregulares, seguidos de discretas alterações na parasitemia durante todo o PP (Figura 10).

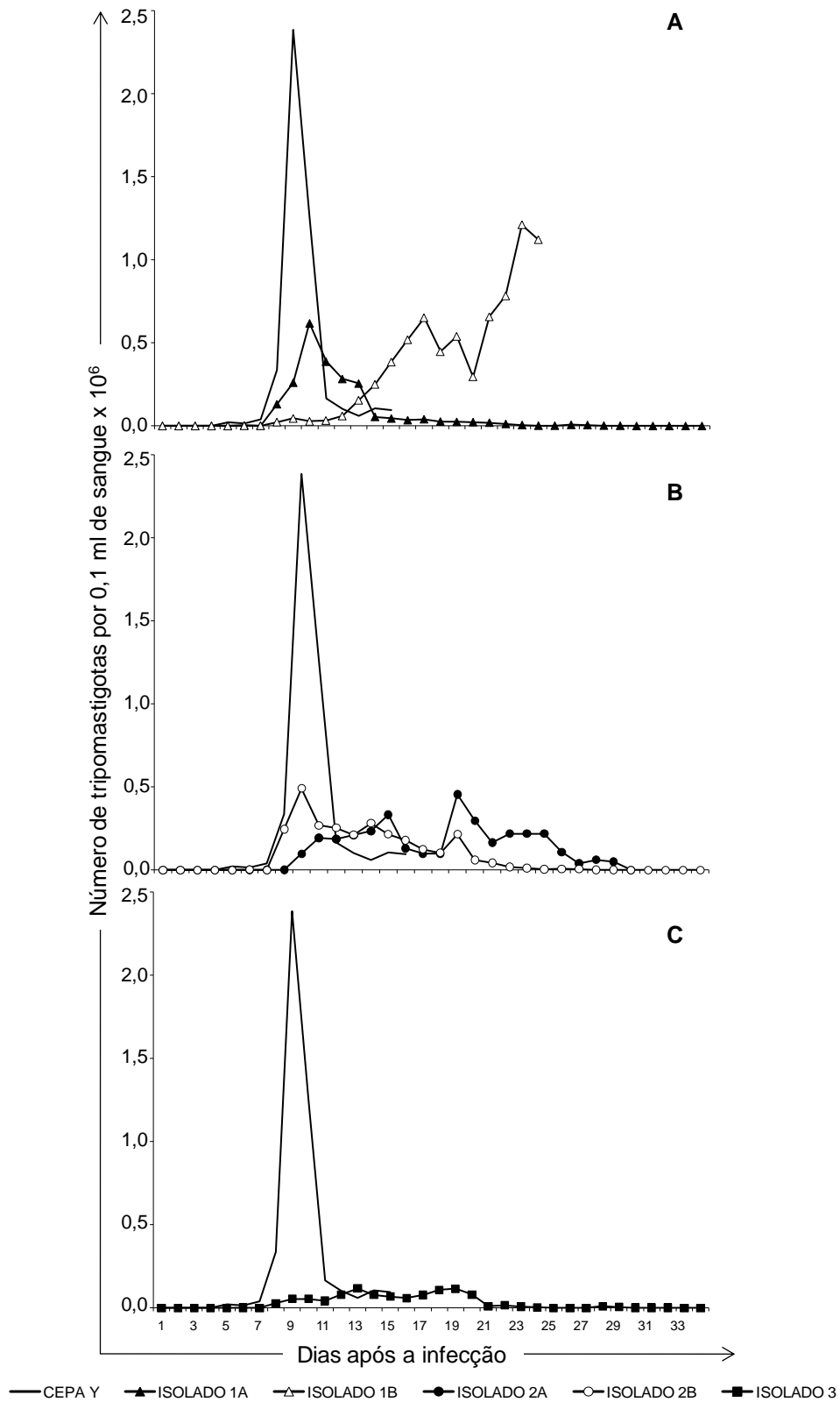


Figura 10 - Curvas de parasitemia de camundongos inoculados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* observadas durante o período patente (34 dias).. Em **A** cepa Y e dos isolados 1A, 1B; Em **B** cepa Y e dos isolados 2A, 2B e em **C** cepa Y e isolado 3

Pico Máximo de Parasitemia (PMP) e Dia do Pico Máximo (DPMP)

O pico máximo de parasitemia (PMP) foi significativamente maior nos animais inoculados com a cepa Y, em relação àqueles inoculados com os isolados.

Além disso, pode-se observar que o dia do pico máximo de parasitemia (DPMP) foi mais precoce nos animais infectados com a cepa Y (8^odia), Isolado 1A (9^odia), Isolado 2B (8^odia) do que com o Isolado 3 (12^odia), o 2A (13^odia) e Isolado 1B (22^odia).

Estas variações foram significativas em relação a cepa Y quando esta foi comparada aos isolados 1B, 2A e 3. Além disso, o isolado 1A foi significativamente menor em relação ao isolado 1B, para este parâmetro (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros biológicos avaliados em camundongos Swiss inoculados com a cepa Y e com as populações isoladas por hemocultura (1A, 1B, 2A, 2B e 3) do *Trypanosoma cruzi*.

Grupos	Período pré-patente (dias)	Período patente (dias)	Dia do pico de parasitemia	Pico de parasitemia
Cepa Y	3	10	8	2.385.000
Isolado 1A	5 [#] *	18 [#]	10 *	875.000 [#]
Isolado 1B	8 [#]	12	18 [#]	1.109.000 [#]
Isolado 2A	5 [#]	14	14 [#]	610.000 [#]
Isolado 2B	5 [#]	15	11	752.000 [#]
Isolado 3	6 [#]	14	15 [#]	188.000 [#]

[#]diferença significativa em relação a cepa Y

* diferença significativa em relação ao Isolado 1B

5.2.2 - Sobrevida

A Figura 11 mostra as taxas de sobrevida dos animais inoculados com os diferentes isolados estudados. Os animais pertencentes ao grupo infectado com a cepa Y e 1B vieram a óbito, respectivamente, no 15^o e 24^o dpi e apresentaram taxa de sobrevida de 0%. Por outro lado, os animais inoculados com os isolados 1A, 2A, 2B e

3, apresentaram taxa de sobrevivência de 83, 17, 67 e 50%, respectivamente, até o 30^o dpi.

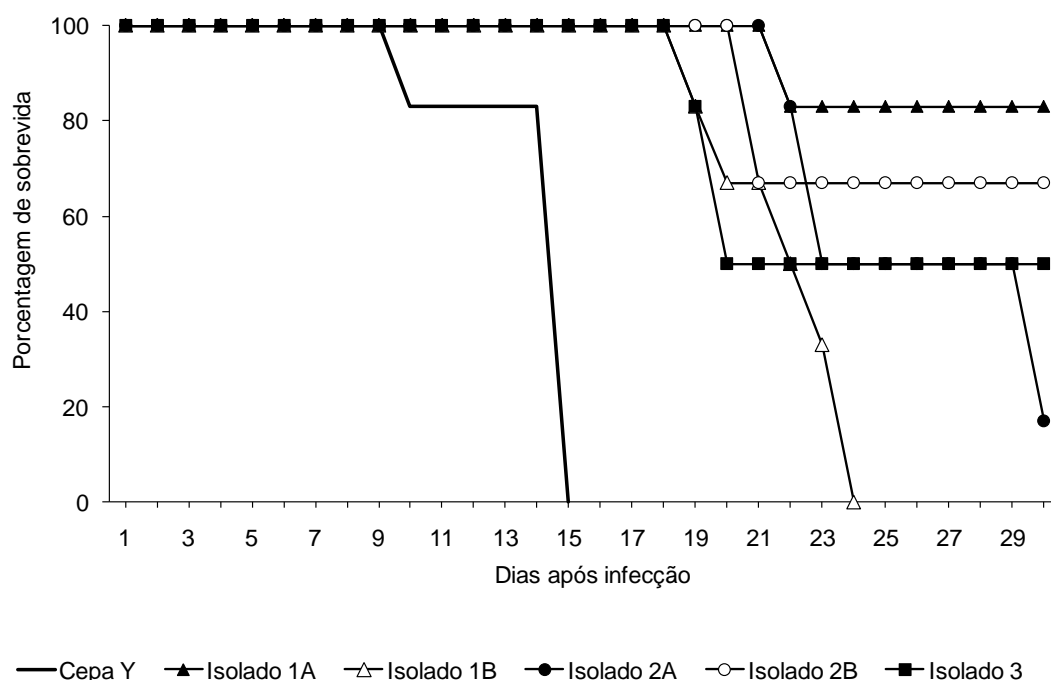


Figura 11 - Taxa de sobrevivência dos animais inoculados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.

5.2.3 - Análise morfométrica do processo inflamatório cardíaco e hepático

Os camundongos infectados com a cepa Y e com os isolados (1A, 1B, 2A, 2B e 3) foram eutanasiados durante a fase aguda da infecção (7^o, 11^o e 15^o). O número de núcleos celulares observado no grupo de animais não infectados em cada tempo representa o número de células constitutivas de cada tecido, sendo considerado como processo inflamatório quando o número de núcleos nos grupos infectados foi superior a esse.

Na Figura 12 estão apresentados os resultados da avaliação morfométrica realizada no coração no 7^o, 11^o e 15^o DPI. No 7^o DPI apenas os animais infectados com a cepa Y e o isolado 3 apresentaram inflamação. Os animais infectados com a cepa Y também apresentaram processo inflamatório em relação àqueles infectados

com o isolado 1A. Nos grupos 1B e 2B, apesar do maior número de núcleos celulares em relação ao grupo não infectado, esta diferença não foi significativa.

No 11^o DPI os animais infectados com a cepa Y e com os isolados 1A e 1B apresentaram inflamação. O isolado 1B foi o que apresentou maior processo inflamatório, sendo este superior ao observado nos animais infectados com a cepa Y e com os isolados 1A, 2A e 2B. O grupo infectado com a cepa Y também apresentou-se inflamado em relação aos grupos infectados com os isolados 1A, 2A e 2B.

No 15^o DPI os animais infectados com a cepa Y e com os isolados 1A, 2A e 2B apresentaram inflamação. Os animais infectados com os isolados 2A e 2B também apresentaram maior processo inflamatório quando comparado àqueles infectados com o isolado 3.

Na Figura 13 estão apresentados os resultados da avaliação morfométrica DO processo inflamatório realizado no fígado no 7^o, 11^o e 15^o DPI. No 7^o DPI apenas os animais infectados com os isolados 1B e 3 apresentaram inflamação, sendo esta superior a observada na cepa Y. Nos animais infectados com o isolado 1B o processo inflamatório também foi maior quando comparado aos animais infectados com o isolado 1A.

No 11^o DPI não foi observado processo inflamatório em nenhum dos grupos avaliados enquanto no 15^o DPI apenas os animais infectados com a cepa Y e com o isolado 1A apresentaram processo inflamatório. Nos demais grupos, apesar do número de núcleos celulares ser maior que no grupo de animais não infectados, não foi detectada diferença significativa.

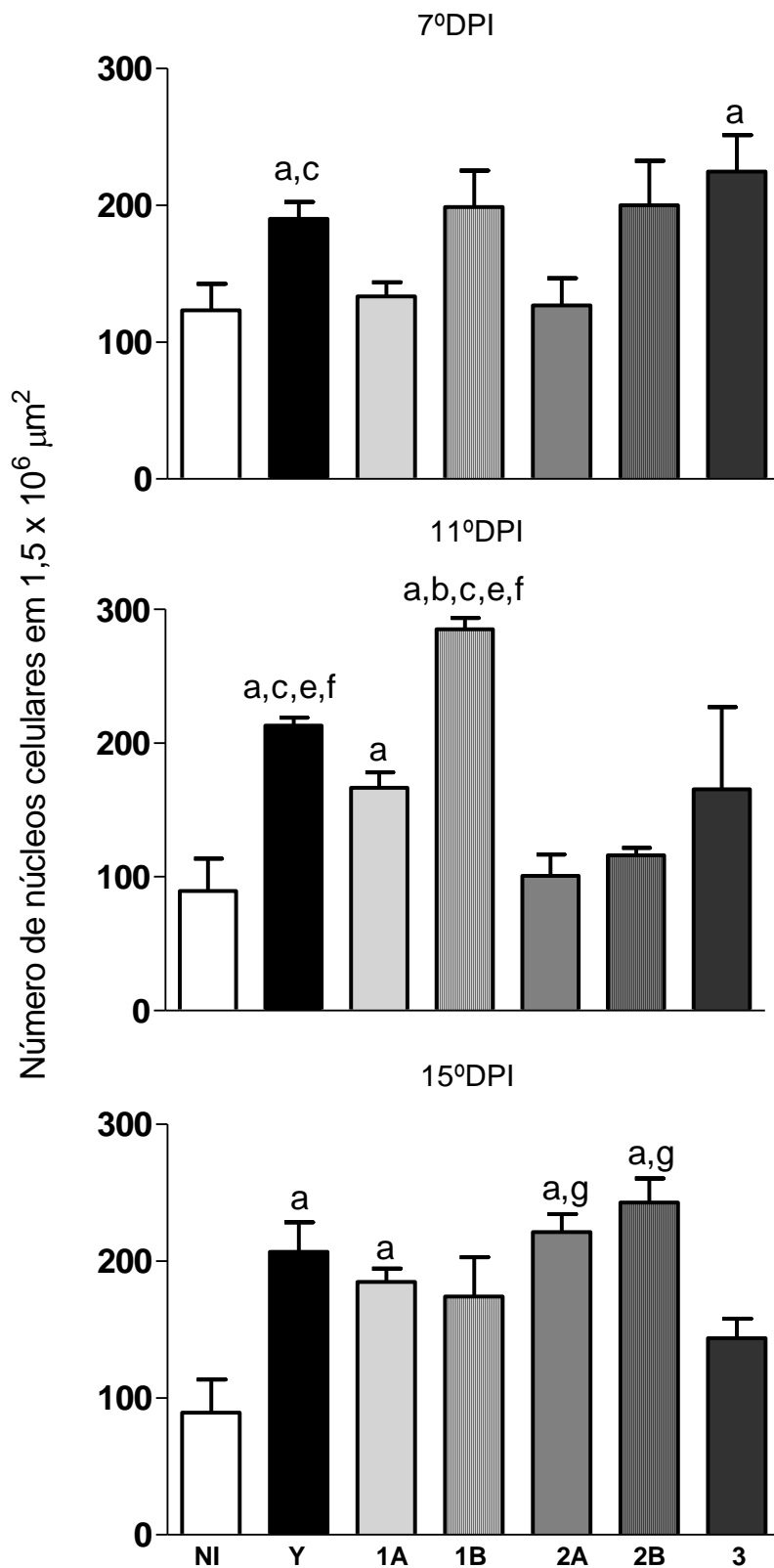


Figura 12 - Análise morfométrica do processo inflamatório cardíaco no 7^o, 11^o e 15^o dia após a infecção de camundongos com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.

Nota Grupo NI: animais não infectados.

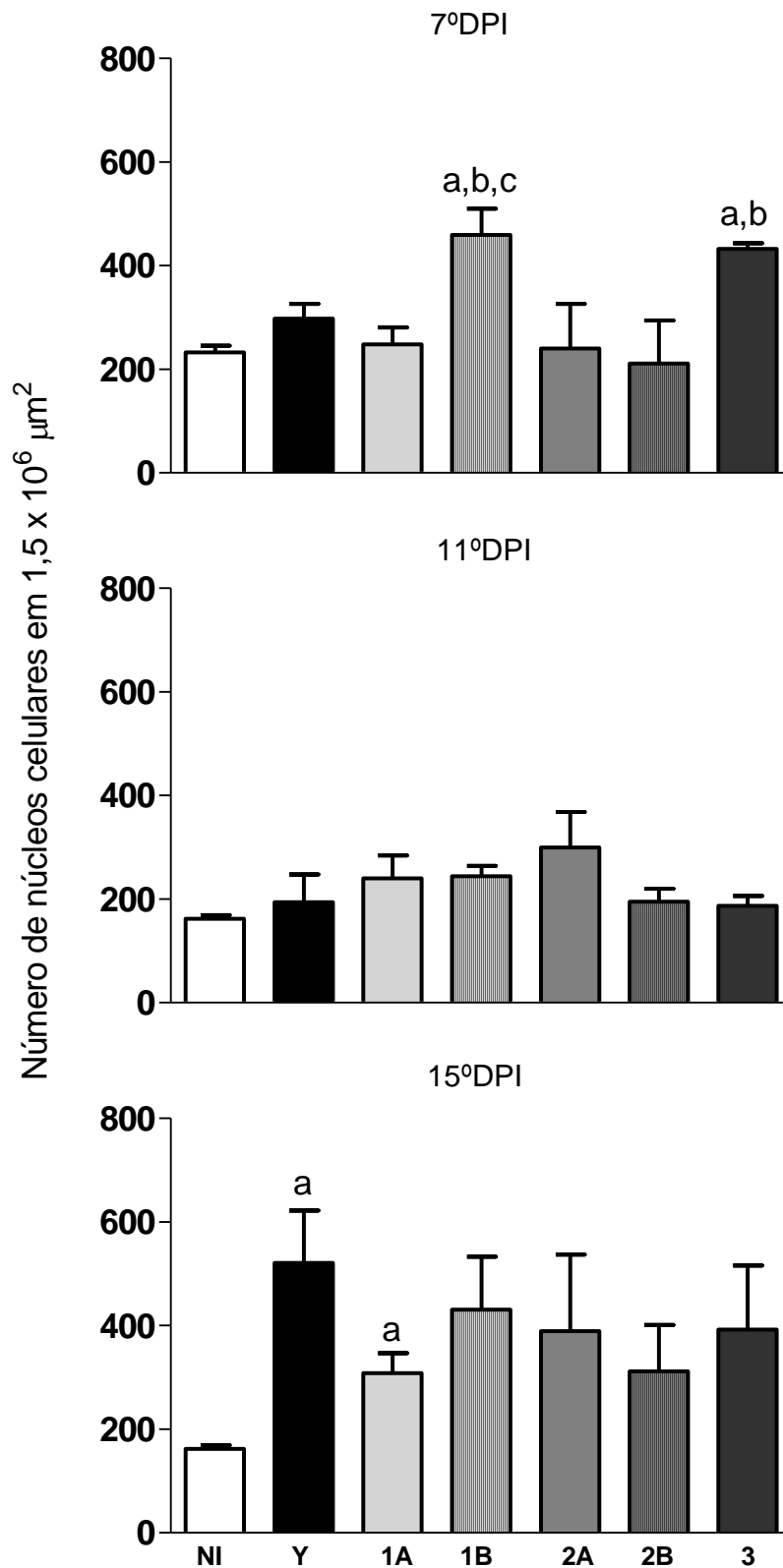


Figura 13 - Análise morfométrica do processo inflamatório hepático no 7^o, 11^o e 15^o dia após a infecção de camundongos com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.

Nota Grupo NI: animais não infectados.

5.2.4 - Análise do perfil eletroforético de isoenzimas (Zimodema)

Na Figura 14 estão representados os perfis eletroforéticos dos sistemas GPI, G6PD, IDH e 6PGDH dos diferentes isolados e da cepa Y. A análise dos perfis eletroforéticos das amostras do *T. cruzi* reisoladas do grupo experimental DFA/BZ-35, permitiram demonstrar que todas apresentaram perfis idênticos (ZA ou Z2 segundo Romanha *et al.*, 1979 ou Miles *et al.*, 1977, respectivamente) pertencente ao grupo *T. cruzi* II (Zingales *et al.*, 2009).

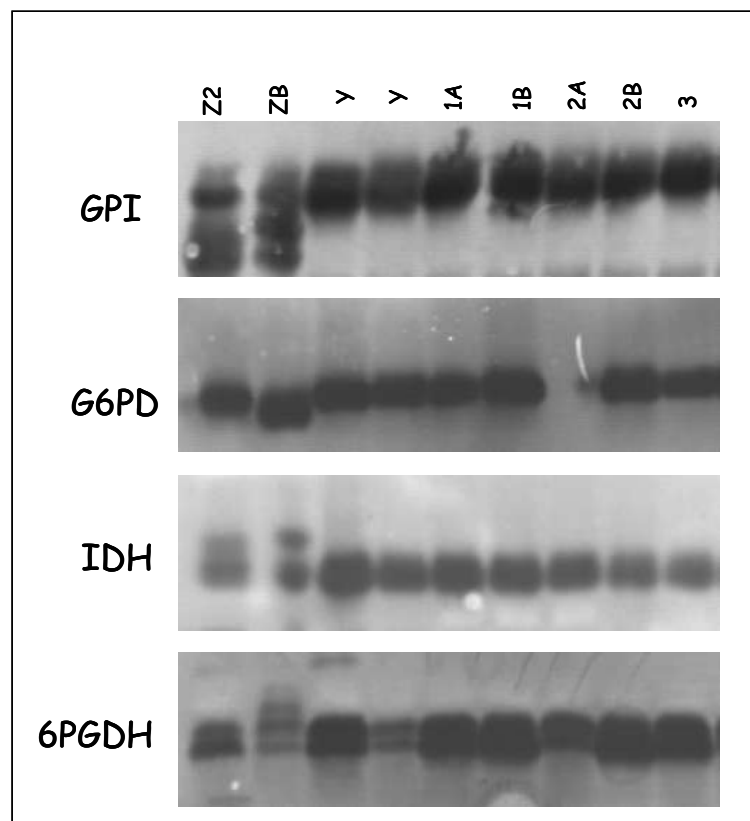


Figura 14 - Perfis eletroforéticos das enzimas GPI (A) e G6PD (B) de amostras de *Trypanosoma cruzi* de animais inoculados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y e dos isolados 1A, 1B, 2A, 2B e 3 do *Trypanosoma cruzi*.

Nota: ZA - Zimodema A (Romanha *et al.*, 1979)
Z2 - Zimodema 2 (Miles *et al.*, 1977)

6.1- Primeira Etapa

Avaliação da cura parasitológica

Quelantes de ferro, associados ou não a outros fármacos, têm sido utilizados em estudos que buscam correlacionar a deficiência de ferro em animais de laboratório e sua interferência no curso de infecções experimentais por diferentes patógenos. Diversos autores demonstraram que o tratamento da malária humana utilizando apenas o DFA ou a sua combinação com a terapia padrão para essa doença, diminuiu a carga parasitária (Traore *et al.*, 1991; Gordeuk *et al.*, 1992; Mabeza *et al.*, 1996). Nesse mesmo período, Weinberg (1994) demonstrou que o tratamento com o DFA em esquema terapêutico diário foi benéfico ao promover a redução na intensidade da infecção e alterações na morfologia do fungo *Pneumocystis carinii* (agente causador da pneumonia) em ratos e camundongos experimentalmente infectados.

Em relação à DC, existem duas correntes que mostram resultados opostos. Lee *et al.*, 1977 sugeriram que a deficiência de ferro poderia agravar a infecção pelo *T. cruzi* em roedores, enquanto Lalonde e Holbein (1984) mostraram que a depleção dos estoques de ferro do sistema retículo-endotelial pelo agente quelante DFA associado a uma dieta deficiente em ferro causava proteção contra a infecção pelo *T. cruzi* em camundongos.

No presente estudo levantou-se a hipótese de que camundongos que sobreviveram ao protocolo experimental utilizado por Francisco *et al.* (2008), infectados pelo *T. cruzi* e tratados ou não com Bz, poderiam apresentar cura parasitológica na fase crônica da infecção. Para testar esta hipótese esses animais foram eutanasiados após 18 meses de infecção sendo submetidos a análises sorológicas (ELISA) e parasitológicas (Hemocultura e PCR). Essas análises mostraram que não ocorreu cura parasitológica, pois nenhum dos animais mostrou-se negativo nos três testes realizados.

Testes sorológicos como ELISA tem sido utilizados para diagnosticar indiretamente a infecção pelo *T. cruzi*. Este método é empregado devido a sua simplicidade, baixo custo e bom desempenho. Nesse estudo, a técnica de ELISA apresentou maior sensibilidade (100%) em relação às demais técnicas, visto que nenhum dos animais avaliados foram considerados curados. A semelhança dos resultados encontrados nos grupos BZ, DFA-35 e DFA/BZ-35 pode ser justificada pelo fato de que a ELISA, para o controle de cura, apresenta limitações devido à demora na

negativação mesmo após início de sucesso terapêutico (Andrade *et al.*, 1992). Por este motivo, fez-se necessário a utilização de mais de um teste com princípios distintos, conforme recomendação para o diagnóstico e controle de cura na doença de Chagas.

A sensibilidade dos testes de diagnóstico parasitológicos como a hemocultura, varia de acordo com as regiões geográficas (Coura *et al.*, 1984) e com os níveis de parasitemia. Além disso, o período no qual se realiza a avaliação desse teste também é de extrema importância e, por este motivo, deve-se examiná-la além de 60 dias, principalmente, porque o atraso na detecção do parasito pode estar relacionado com diferentes características biológicas do *T. cruzi*, como por exemplo, a taxa de crescimento em meios artificiais (Minter-Goebloed *et al.*, 1978).

A hemocultura não detectou a presença do parasito em 81,25% dos animais, sendo a menos sensível das técnicas utilizadas. Considerando os diferentes grupos, apenas 37,5% dos animais pertencentes ao grupo DFA/BZ-35 apresentaram resultados positivos após 90 dias de avaliação da Hc. Estes resultados reforçam a hipótese de que os testes parasitológicos têm apresentado alta especificidade, mas baixa sensibilidade. Sendo assim, um exame negativo não anula a hipótese de infecção, mas um exame positivo tem valor diagnóstico absoluto.

Como os animais possuíam 18 meses de infecção, já se esperava uma baixa sensibilidade já que é na fase aguda que se encontra maior presença de parasitos circulantes. Em humanos, tem sido observado que a parasitemia, durante a fase crônica, é em geral, uma constante para cada indivíduo, desde aqueles com raros parasitos circulantes em que ocasionalmente se obtém um exame positivo, até aqueles com elevada parasitemia onde o parasito é detectado em todos os exames realizados (Schenone *et al.*, 1977; Luquetti e Rassi, 2000; Prata, 2001).

A PCR tem sido um método importante para o monitoramento da infecção por *T. cruzi* em animais de laboratório e também para a detecção de DNA do parasito em amostras de sangue de pacientes chagásicos. Esta técnica tem sido recomendada como complementar de diagnóstico devido a sua maior sensibilidade em relação aos métodos convencionais (Diaz *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 1998; Britto *et al.*, 2001). Estudos realizados por diferentes autores têm mostrado variação de 45 a 100% na sensibilidade da PCR em amostras de sangue de pacientes chagásicos crônicos quando comparada a de outros testes parasitológicos como o xenodiagnóstico ou a hemocultura (Ávila *et al.*, 1993; Wincker *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 1998b; Chiamonte

et al., 1999). Isso se deve ao fato de que nessa técnica, assim como ocorre na hemocultura, o resultado positivo é dependente da presença de um parasito em 20mL de sangue ou pelo menos 1% do minicirculo de um parasito ou ainda de 0,01% dos fragmentos do DNA do *T. cruzi* no sangue circulante de um indivíduo infectado (Ávila *et al.*, 1991; Gomes *et al.*, 1998).

Nesse trabalho, a PCR em sangue, realizada aos 18 meses após infecção, revelou que 25% dos animais apresentaram resultados negativos. De forma semelhante aos testes de xenodiagnóstico e hemocultura, os resultados obtidos por esta técnica, também podem variar. Essas diferenças parecem depender dos iniciadores utilizados, do volume de sangue coletado, da origem geográfica da população estudada, faixa etária, níveis parasitêmicos e também das características genéticas das cepas do parasito (Coura e Castro, 2002).

Entretanto, os dados obtidos pela PCR, comparados com aqueles obtidos na Hc, confirmam dados descritos na literatura que afirmam que a PCR apresenta maior sensibilidade em detectar a presença do *T. cruzi* no sangue dos animais avaliados (Lages-Silva, 2001; Castro *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2002).

Considerando que camundongos infectados pela cepa Y, na ausência de tratamento específico, não sobrevivem à fase aguda da infecção e que, nesse estudo, 16 animais sobreviveram devido aos diferentes protocolos de tratamento e que os mesmos não foram considerados parasitologicamente curados, fez-se necessário avaliar outros parâmetros que pudessem explicar essa sobrevivência.

Portanto, como o parasitismo tecidual e o processo inflamatório são determinantes do curso da infecção, estes aspectos foram avaliados em diferentes tecidos. Considerando aspectos biológicos da cepa Y, como o tropismo por órgãos do sistema retículo endotelial, e a importância do músculo cardíaco, quantificou-se o processo inflamatório no fígado e coração, sendo este significativamente maior nos animais do grupo submetido ao tratamento convencional com Bz quando comparado aos animais pertencentes aos demais grupos. Os dados da PCR em tecido também mostraram que os animais do grupo BZ apresentaram maior positividade (68,6%) enquanto que nos grupos DFA-35 e DFA/BZ-35 esses índices estavam próximos de 40%. Como sugerido por vários autores (Jones *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1993a; Lages-Silva *et al.*, 2002), o parasito deve exercer um papel importante na patogênese das lesões teciduais. Logo, o maior número de tecidos positivos observado nos órgãos dos animais do grupo BZ sugere uma correlação com a maior intensidade do processo

inflamatório nesses órgãos.

Em relação ao DFA, supõe-se que seu uso diminui o parasitismo tecidual pois foram observados menores índices de positividade para PCR em tecido nos grupos DFA-35 e DFA/BZ-35 que, conseqüentemente, apresentaram menor processo inflamatório em relação ao grupo BZ. Isso porque a forma amastigota do *T. cruzi*, presente nos tecidos, necessita do ferro para seu crescimento e proliferação e esse é obtido da transferrina por meio da endocitose, cuja mediação é feita por receptores (Lima e Villalta, 1989). Ao investigar a existência desses receptores por meio de imunofluorescência, os autores demonstraram que mais de 90% das formas amastigotas apresentam esse receptor, ao contrário das formas tripomastigotas.

Os dados observados na análise do parasitismo tecidual podem ainda ser atribuídos aos perfis de biodistribuição das drogas utilizadas. Nos animais tratados com o Bz, doses diárias foram administradas visando manter concentrações altas do fármaco na circulação e, conseqüentemente, eliminar as formas sanguíneas do parasito fato que interfere na continuação do ciclo do parasito. Entretanto, devido às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do Bz este não atinge concentrações elevadas nos tecidos afetados sendo insuficiente para eliminar as formas amastigotas intracelulares (Urbina, 2001; 2002). Sendo assim foi possível observar um maior número de tecidos positivos (68,6%) nos animais tratados apenas com o Bz.

Em relação aos demais grupos de animais tratados com protocolos experimentais utilizando o DFA (DFA-35 e DFA/BZ-35) a positividade dos tecidos avaliados foi 40 e 40,8%, respectivamente. Este resultado provavelmente deve-se ao fato de que o quelante tem uma maior distribuição nos tecidos sendo mais eficaz sobre as formas amastigotas do parasito.

Portanto o DFA, devido às suas propriedades quelantes, minimizou a disponibilidade de ferro no hospedeiro, fato que pode ter interferido na replicação das formas amastigotas do *T. cruzi*.

6.2 - Segunda Etapa

Caracterização biológica e bioquímica das populações do *T. cruzi* isoladas durante a avaliação da cura parasitológica

O estudo do comportamento biológico e da relação parasito-hospedeiro tem sido essencial para evidenciar a importância das diferentes cepas do parasito na

determinação das manifestações clínico-patológicas da DC (Andrade, 1974). Além disso, estudos bioquímicos e moleculares têm revelado grande variabilidade genética nessa espécie (Macedo e Pena, 1998; Momen, 1999). Seguindo este princípio, nesta etapa do trabalho, considerou-se a hipótese de que as populações reisoladas por hemocultura durante a primeira parte deste trabalho poderiam apresentar modificações em seu perfil biológico e bioquímico, devido a pressões exercidas pelos fármacos que foram utilizados no tratamento dos camundongos.

A avaliação do comportamento biológico das populações resistentes ao tratamento com DFA/BZ-35 e que foram isoladas por hemocultura consistiu na observação da evolução da infecção em camundongos, incluindo parâmetros relacionados à curva de parasitemia e a taxa de sobrevivência nesses animais, comparativamente a cepa Y.

O exame de sangue a fresco revelou que todos os animais inoculados com a cepa Y e populações isoladas se infectaram. Em relação aos parâmetros PPP e DPMP foi observado que as populações isoladas foram significativamente distintas quando comparadas à cepa Y. Assim, foi possível relacionar a demora na confirmação da infecção dos camundongos com os diferentes isolados com dias de pico mais tardios. Além disso, diferenças significativas foram observadas nos níveis parasitêmicos, sendo esse um dos mais importantes parâmetros de virulência. A parasitemia apresentou um aumento lento, com picos irregulares e níveis inferiores àqueles observados nos camundongos infectados com a cepa Y.

Quanto aos índices de sobrevivência dos animais infectados com os isolados 1A, 2A, 2B e 3 estes foram superiores ao observado nos animais inoculados com a cepa Y. Entretanto, nos camundongos infectados com o isolado 1B a taxa de sobrevivência foi de 0%. É importante destacar que o pico máximo de parasitemia para os animais inoculados com a população 1B foi maior do que os valores obtidos entre as demais populações sugerindo que uma elevada parasitemia pode ocasionar uma elevada mortalidade. Porém, associação desses parâmetros (parasitemia e mortalidade) tem sido controversa na literatura. Alguns trabalhos registraram uma relação direta entre a taxa de mortalidade e os níveis de parasitemia (Lana e Chiari, 1986; Andrade, 1974; Veloso *et al.*, 2000), outros indicam uma correlação fraca entre esses parâmetros (Wrightsmann *et al.*, 1982; Wallace *et al.*, 2001; Paláu *et al.*, 2003) sugerindo ser esta característica intrínseca do parasito mais do que o nível de parasitemia propriamente dito (Bestetti, 1997).

Os períodos de análise do processo inflamatório cardíaco e hepático foram definidos baseado no comportamento da cepa Y: no 7^o DPI (início de parasitemia), no 11^o DPI (próximo ao pico de parasitemia) e no 15^o DPI (morte dos animais). O processo inflamatório no coração foi menor quando comparado ao observado no fígado fato que provavelmente pode ter contribuído para a maior sobrevivência dos animais infectados com os isolados. Entretanto, a comparação entre os isolados obtidos do mesmo animal revelou que o isolado 1B apresentou inflamação significativamente maior no coração no 7^o DPI e no fígado no 11^o DPI e no fígado no do que aquela apresentada para o isolado 1A o que pode ter contribuído para a letalidade observada.

Nesse contexto, o perfil biológico das populações isoladas por Hc durante a avaliação da cura parasitológica revelou diferenças marcantes em relação à cepa Y. Supõe-se que o protocolo experimental utilizando a associação DFA e BZ (DFA/BZ-35) possa ter exercido uma pressão seletiva sobre a cepa Y originando populações que expressaram um comportamento diferenciado. Logo, o tratamento pode ter alterado a dinâmica populacional dessa cepa ou ainda favorecido o surgimento de uma população menos patogênica, e que eventualmente esta tenha se tornado dominante na população. Quanto as diferenças observadas entre os isolados 1A e 1B supõe-se que os métodos de isolamento e de manutenção em laboratório podem ter favorecido a expansão ou a redução de determinados clones presentes na amostra natural. Nesse sentido, Veloso *et al.* (2005) demonstraram que o longo tempo de manutenção do *T. cruzi* em animais e cultura leva à alterações em suas características biológicas, tais como a infectividade que tende a diminuir em função das condições de manutenção e cultivo em laboratório.

Este trabalho objetivou também caracterizar o perfil bioquímico dessas populações avaliando diferentes sistemas enzimáticos. Isso porque alguns autores têm demonstrando correlação entre o perfil isoenzimático de diferentes cepas do *T. cruzi* e o comportamento biológico (Dvorak e Hartman 1980; Andrade *et al.*, 1983; Sanchez *et al.*, 1990; Carneiro *et al.*, 1991; Andrade *et al.*, 1992; Andrade e Magalhaes, 1997).

A análise dos resultados obtidos revelou que todas as populações reisoladas apresentaram o mesmo padrão da cepa Y sendo por este motivo classificadas como *T. cruzi* II (Zingales, 2009). Sendo assim, não foi possível correlacionar a genética do parasito com as propriedades biológicas visto que o perfil bioquímico foi mantido ao passo que o biológico não. Para confirmar esta observação torna-se necessário realizar estudos posteriores utilizando outras técnicas, como por exemplo, as moleculares.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram aos de outros autores que analisaram comparativamente as cepas parentais com populações reisoladas após diferentes métodos de manutenção e manuseio (Carneiro *et al.*, 1990; Lauria-Pires *et al.*, 1996; 1997; Veloso *et al.* 2005).

Desta maneira é razoável supor que a caracterização de cepas multiclonais apresenta um elevado grau de complexidade, pois as subpopulações presentes estão sempre sofrendo modificações sendo difícil estabelecer uma correlação definitiva entre as características genéticas de uma população do *T. cruzi* e o seu comportamento biológico.

Primeira Parte

A sensibilidade das técnicas parasitológicas (Hc e PCR) foi dependente do protocolo de tratamento empregado.

*A positividade da hemocultura nos animais do grupo DFA/BZ-35 quando comparada à negatividade observada nos grupos BZ e DFA-35, provavelmente reflete diferenças na constituição das populações do *T. cruzi* após os tratamentos.*

Os resultados obtidos sugerem que a DFA reduziu o parasitismo tecidual e favoreceu o parasitismo sanguíneo.

*Os resultados da PCR no sangue dos animais avaliados demonstram a persistência do *T. cruzi* no sangue periférico ao longo da fase crônica e também o caráter mais sensível dessa técnica em relação à hemocultura.*

Portanto, os diferentes esquemas terapêuticos não promoveram a cura parasitológica nos animais avaliados. Entretanto, a associação DFA/BZ-35 além de permitir uma maior sobrevida também minimizou a inflamação cardíaca e hepática, semelhante ao observado nos animais apenas submetidos ao tratamento com DFA.

Segunda Parte

As curvas de parasitemia obtidas em camundongos inoculados com as populações reisoladas apresentaram evolução lenta, parasitemia baixa e picos de parasitemia mais tardios;

A taxa de sobrevida foi maior para a maioria dos camundongos infectados com os isolados, exceto para o isolado 1B, relativamente mais virulento e letal para todos os animais;

Os perfis das isoenzimas não sofreram modificações em relação a cepa Y;

Logo, a associação Bz e DFA pode ter alterado a dinâmica populacional da cepa Y ou ainda, ter favorecido o surgimento de uma população menos patogênica, mas que não apresentou alteração quanto ao seu comportamento bioquímico.

- Alves, A.M., Tanuri, A., De Almeida, D.F., Von Kruger, W.M. (1993). Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, 77(2):246-253.
- Alves, A.M., De Almeida, D.F., Von Kruger, W.M. (1994). Changes in *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA minicircles induced by environmental conditions and subcloning. *J. Eukaryot Microbiol.*, 41(4):415-419.
- Alves, A.M., De Almeida, D.F., Von Kruger, W.M. (1996). Genomic variation in *Trypanosoma cruzi* clonal cultures. *Parasitol. Res.*, 82(5):410-415.
- Andrade, S.G. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev. Patol. Trop.*, 3:65-121.
- Andrade, S.G. & Magalhães J.B. (1997). Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27-35.
- Andrade, V., Brodskyn, C. & Andrade, S.G. (1983). Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77:796-799.
- Andrade, S.G., Magalhães, J.B., Pontes, A. (1985). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin of the World Health Organization*, 63:721-726.
- Andrade, A.L., Martelli, C.M., Luquetti, A.O., de Oliveira, O.S., Almeida e Silva, S., Zicker, F. (1992). Serological screening for *Trypanosoma cruzi* among blood donors in central Brazil. *Bol. Oficina Sanit. Panam.*, 113(1):19-27.
- Andrade, S.G., Rassi, A., Magalhães, J.B., Ferrioli, F.F. & Luquetti A.O. (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86, 624-626.
- Apt, W., Aguilera, X., Arribada, A; Perez, C., Miranda, C., Sanchez, G., Zulantay, I., Cortes, P., Rodriguez, J., Juri, D. (1998). Treatment of chronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. *Am. J Trop. Med. Hyg.*, 59:133-138.
- Arantes, J.M., Pedrosa, M.L., Martins, H.R., Veloso, V.M., de Lana. M., Bahia, M.T., Tafuri, W.L., Carneiro, C.M. (2007). *Trypanosoma cruzi*: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice *Exp. Parasitol.*, 117(1):43-50.
- Araújo, F. M., Bahia, M. T., Magalhães, N. M., Martins-Filho, O. A., Veloso, V. M., Carneiro, C. M., Tafuri, W. L., Lana, M. (2002). Follow-up of experimental

- chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Trop.*, 81:21-31.
- Atwood, J. A., Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R., Tarleton, R. L. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, 309:473-476.
- Avila, H.A., Sigman, D.S., Cohen, L.M., Millikan, R.C., Simpson, L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 48(2):211-21.
- Ávila, H. A., Pereira, J. B., Thiemann, O., De Paiva, E., Degraeve, W., Morel, C. M., Simpson, L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 31:2421-2426.
- Barnabe, C., Tibayrenc, M. (2004). *Trypanosoma cruzi*: long-term sub-cultures in two different culture media do not confirm the existence of highly versatile multilocus genotypes. *Int. J. Parasitol.*, 34(7):779-784.
- Barreto, P.C.A. e Lanni, M.B. (1994). A forma indeterminada da moléstia de Chagas: conceito e implicações médico-legais. *Rev. Soc. Cardiol. SP.*, 4:129-132.
- Barry, M., Flynn, D.M., Letsky, E.A., Risdon, R.A. (1974). Long-term chelation therapy in thalassaemia major: effect on liver iron concentration, liver histology, and clinical progress. *Br. Med. J.*, 909:16-20.
- Ben Younès-Chennoufi, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Tricottet, V., Eisen, H., Reynes, M., Said, G (1988). Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82(1):77-83.
- Ben Abderrazak, S., Guerrini, F., Mathieu-Daudé, F., Truc, P., Neubauer, K., Lewicka, K., Barnabe, C., Tibayrenc, M. (1993). Isozyme electrophoresis for parasite characterization. In: HYDE, J.E. (Ed.), *Methods in Molecular Biology, Protocols in Molecular Parasitology*, 21:361-382.
- Benaim, G., Sanders, J.M., Garcia-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A.R., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J.M., Leon-Rossell, A., Concepcion, J.L., Schijman, A.G., Levin, M., Oldfield, E., Urbina, J.A., (2006). Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with Posaconazole. *J. Med. Chem.*, 49:892-899.

- Benite, A. M. C., Machado, S. P; Machado, B. C. (2002). Sideróforos: “Uma resposta dos microrganismos”. *Quim. Nova*, 25(6B):1155-1164
- Bergeron, R.J. (1986). Iron: a controlling nutrient in proliferative processes. *Trends Biochem. Sci.*, 11:133-136.
- Bestetti, R. B. (1997). Should benznidazole be used in chronic Chagas Disease? (letter comment). *Lancet.*, 349, 653.
- Bittecourt AL (2000). Transmissão da doença de Chagas. In : *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Brener Z, Andrade ZA & Barral-Neto M (Orgs.), 16-20.
- Brener, Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 4:389-396.
- Brener, Z. (1965). Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Parasitol.*, 59:19-26
- Brener, Z. (1971). Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* ,13, 171-178.
- Brener, Z., Costa, C.A.G., Chiari, C. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18:450-455.
- Brener, Z. (1968). Em *Terapêutica experimental da doença de Chagas*; In JR Cançado, *Doença de Chagas*, Imprensa Oficial de Minas Gerais, Belo Horizonte, 510-516.
- Brener, Z. (1977). Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: Two types of parasite populations presenting distinct characteristics. In ‘Science Publication, Chagas Disease’. *Pan. American. Health Organization*, 347:11-21.
- Brener, Z. (1985). General Review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev. Soc. Bras. Med.*, 18:1-8.
- Brener, Z. (1987). Laboratory-acquired Chagas disease: comment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81(3):527.
- Brener, Z. (1992). Immune response and immunopathology in *Trypanosoma cruzi* infection. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E., Rassi, A. *Chagas disease (Americam Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. São Paulo ISBT BRAZIL SBHH, 31-47.
- Brener, Z. e Chiari, E. (1967). Suscetibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9:197-207.

- Boveris, A. Do Campo, R., Turrens, J.F., Stoppani, A. O. M. (1980). Effect of beta-lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.*, 175:431-439.
- Britto, C., Cardoso, M. A., Wincker, P., Morel, C. M. (1993). A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood sample and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88:171-172.
- Britto, C., Silveira, C., Cardoso, M.A., Marques, P., Luquetti, A., Macedo, V. Fernandes, O. (2001). Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodignosis and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96:823-826.
- Buscaglia, C.A e Di Noia, J.M. (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes Infect.*, 5:419-427.
- Cançado, J.R. (1991). Eficácia da Terapêutica do Benzonidazol na doença de Chagas aguda humana. *Rer. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24(supl.I):20-21.
- Cançado, J.R. (2000). Tratamento etiológico da doença de Chagas. In Z Brener, Z Andrade, M Barral-Netto (eds), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 389-405.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 12:93-100.
- Carneiro, M., Romanha, A.J. & Chiari, E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86:387-393.
- Carneiro M., Chiari, E., Gonçalves, A.M., Da Silva Pereira, A.A., Morel, C. M. & Romanha, A.J. (1990). Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Tropica*, 47:35-45.
- Castro, A. M., Luquetti, A. O., Rassi, A., Chiari, E., Galvão, L. M. (2006). Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.*, 99(4):379-383.
- Castro, A.M., Luquetti, A.O., Rassi, A., Rassi, G.G., Chiari, E., Galvão, L.M. (2002). Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 88:894-900.

- Chagas, C. (1909). Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1:159-218.
- Chiaramonte, M.G., Frank, F. M., Furer, G.M., Taranto, N.J., Margni, R.A., Malchiodi, E.L. (1999). Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. *Acta Trop.*, 72(3):295-308.
- Chiari, E., Dias, J.C., Lana, M., Chiari, C.A. (1989). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 22(1):19-23.
- Crichton, R.R. e Ward, R.J. (1992). Structure and molecular biology of iron binding-proteins and the regulation of free iron pools. In: Lauffer RB, editor. Iron and human diseases. *Boca Raton CRC Press Inc*, 10:23-75.
- Coura, J.R., Abreu, L.L., Dubois, L.E.G., Correia-Lima, F., Arruda, J.R.E., Wellcox, H.P.F., Anunzioto, N., Pestana, W. (1984). Morbidade da doença de Chagas. II – Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79:101-124.
- Coura, J.R. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39:113-117
- Coura, J.R., de Castro, S.L., (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97:3-24.
- Corsini, A.C., Costa, M.G., Oliveira, O.L.P., Camargo, I.J.B., Stelini, J.R.A. (1980). Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 22:192-196
- Corrales M, Cardozo R, Segura MA, Urbina JÁ, Basombrio MA 2005. Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 49:1556-1560.
- Dantas, A.P. (2000). *Efeito de agentes anti-microtúbulos e de derivados de naftoquinonas sobre Trypanosoma cruzi*, MSc Thesis, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, XIV, 204 p.
- Davies, K.J.A., Maguire, J.J., Brooks, G.A., Dallman, P.R., Packer, L. (1982). Muscle mitochondrial bionergetics oxygen supply, and work capacity during dietary iron deficiency and repletion. *Am. J. Physiol.*, 242:418-427.
- Dhur, A., Galan, P. e Hercberg, S. (1989). Iron status, immune capacity and resistance to infections. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94:11-19.

- Dias, J.C.P. Epidemiology of Chagas Disease. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. E. Rassi, A. (1992). Chagas disease (Americam Trypanosomiaseis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo ISBT BRAZIL – SBHH, 13-19.
- Dias, J.C.P. (2006). The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Annals of Internaltional Medicine*, 44(10):772-774.
- Dias, L.C., Dessoy, M.A., Silva, J.J.N., Thiemann, O.H., Oliva, G., Andricopulo, A.D. (2009). Quimioterapia Da Doença De Chagas: Estado Da Arte E Perspectivas No Desenvolvimento De Novos Fármacos. *Quim. Nova*, 32(9): 2444-2457
- Dimasi, J.A. (2003). The price of innovation:new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.*, 22:151-185
- Dvorak J.A. & Hartmam D.L. (1980). *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J. Protozool.*, 472-474
- Factor, S., Cho, M., Wittner, M., Tanowitz, H. (1985). Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34:246-253.
- Filardi, I.S. e Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81:755-759.
- Francisco, A.F., Vieira, P.M.A., Arantes, J.M., Pedrosa, M.L., Silva, M., Martins, H.R., de Lana, M., Bahia, M.T., Tafuri, W.L. Carneiro, C.M. (2008). *Trypanosoma cruzi*: effect of Benznidazole therapy combined with the iron chelator Desferrioxamine in infected mice. *Experimental Parasitology* 120:314-319.
- Galleano, R.H., Marr, J.J., Sosa, R.R. (1990). Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43:159-166.
- Giacotto, C., Santerre, R.E., Vernon, J.A. (2005). Drug prices and research and development investment behavior in the pharmaceutical industry. *J. L. Econ.*, 48:195-214.
- Giordanengo, L., Guinazu, N.C., Stempin, R., Fretes, F., Cerban., Gea, S. (2002). Cruzipain, a major *Trypanossoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor parasite. *Eur. J. Immunol.*, 32:1003-1011.

- Gomes, M.L., Macedo, A.M., Vago, A.R., Pena, S.D., Galvão, L.M., Chiari, E. (1998b). *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp. Parasitol.*, 88:28-33
- Gordeuk, K., Thuma, P., Brittenham, G., McLaren, C., Parry, D., Backenstose, A., Biemba, G., Msiska, R., Holmes, L., McKinley, E., Vargas, L., Gilkeson, R., Polera, A.A. (1992). Effect of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. *The New England Journal of Medicine*, 327:1473-1477.
- Guedes, P.M., Urbina, J.A., de Lana, M., Afonso, L.C., Veloso, V.M., Tafuri, W.L., Machado-Coelho, G.L., Chiari, E., Bahia, M.T. (2004). Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 48:4286-4292.
- Gusmão, R.D., Rassi, A., Rezende, J.M., Neva, F.A. (1984). Specific and non-specific lymphocyte blastogenic responses in individuals infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33(5):827-34.
- Heijblom, G.S. e Santos, L.M.P. (2007). Anemia ferropriva em escolares da primeira série do ensino fundamental da rede pública de educação de uma região de Brasília, DF. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 10:258-266.
- Hershko, C., Peto, T.E.A. (1988). Deferroxamine inhibition of malaria is independent of host iron status. *J. Exp. Med.*, 168:375-387.
- Herzog-Soares, J. D., Alves, R. K., Isac, E., Bezerra, J. C. B., Gomes, M. H., Santos, S. C., Ferri, P. H (2002). Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Rev. Bras. Farmacogn.*, 12:102.
- Higuchi, M.L., Brito, T., Reis, M.M., Barbosa, A., Bellotti, G., Pereira-Barreto, A.C., Pileggi, F. (1993a). Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.*, 2:101-106.
- Jones, M.E., Colley, D.E., Tostes, S., Lopes, E.R., Vnencak-Jones, C. L., Mccurley, T. L. (1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48:348-357.
- Keberle, H. (1964). The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, 119:759-768.
- Köberle, F. (1968). Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, 6:63-116.

- Kilgour, V., Godfrey, D. G.(1976). Enzyme electrophoresis in characterising the causative organism of Gambian trypanosomiasis. *Trans R. Soc. Trop. Hyg.*, 70:219-224.
- Lages-Silva, E., Ramirez, L. E., Silva-Vergara, M. L., Chiari, E. (2002). Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Infect. Dis.*, 34(1):118-123.
- Lages-silva, E. (2001). *Caracterização do Trypanosoma cruzi nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com ênfase no megaesôfago e na reativação*. Tese (Doutorado em Ciências/Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 144 p.
- Laguens, R.P., Cabeza Meckert, P., Gelpi, R.J. (1981a). Chronic Chaga's disease in the mouse. I. Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy. *Medicina*, 41:35-39.
- Laguens, R.P., Cabeza Meckert, P., Chambo, G.J. e Gelphi, R.J. (1981b). Chronic Chagas'disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. *Medicina*, 41:40-43.
- Lalonde, R.G., Holbein, B.E. (1984). Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *J. Clin. Invest.*, 23:470-476.
- Lana M. & Chiari C.A. (1986). Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81:247-253.
- Lauria-Pires L., Bogliolo A.R. & Teixeira A.R. (1996). Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP characterizations. *Exp. Parasitol.*, 82, 182-190.
- Letendre, E.D. (1985). The importance of iron in the pathogenesis of infection and neoplasia. *Trends Biochem. Sci.*, 12:166-168.
- Lee, C.M., Glasgow, G.Y., Aboko-Cole, G.F. e George, Y.G. (1977). Interaction of nutrition and infection: Effect of iron deficiency on resistance to *Trypanosoma lewisi*. *Internacional Journal of Biochemistry* 525-529.
- Lee, P., Mohammed, N., Marshall L Abeyasinghe, R.D., Hilder, R.C., Porter, J.B., Singh, S. (1993). Intravenous infusion pharmacokinetics of desferrioxamine in thalassaemic patients. *Drug Metab. Dispos.*, 21:640-644.

- Lima, M.F. e Villalta, F. (1989). *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite adhesion molecule. *Mol. Biochem. Parasitol*, 33:159-170.
- Loo, V.G. e Lalonde, R.G. (1984). Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 45:726-730.
- Luquetti, A.O., Rassi, A. (2000). Diagnostico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Neto, M. (eds). 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 344-478.
- Mabeza, G.F., Biemba, G., Gordeuk, V.R. (1996). Clinical studies of iron chelators in malaria. *Acta Haematologica*, 95:78-86.
- Macedo, A.M., Pena, S.D.J. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today*, 14, 119-123.
- Machado, A.B.M., Machado, C.R.S., Gomes, C.G. (1975). Depletion of heart norepinephrine in experimental acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 31:1202-1203.
- MacDaniel, J. P., Dvorak, J. A. (1993). Identification, isolation and characterization of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 57:213-222.
- Marque de Araújo, S., Chiari, E. (1988). Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C₃H isogênicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83:175-181.
- Martins H.R., Figueiredo L.M., Valamiel-Silva J.C., Carneiro C.M., Machado-Coelho G.L., Vitelli-Avelar D.M., Bahia M.T., Martins-Filho O.A., Macedo A.M. & Lana M. (2008). Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 1319-1327.
- Melo, R.C. e Brener, Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, 64:475-482.
- Miles M.A., Toyé P.J., Oswald S.C. & Godfrey D.G. (1977) The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brasil. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 217-225.

- Minoprio, P., Itohara, S., Heusser, C., Tonegawa, S., Coutinho, A. (1989). Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev* 112:183-207.
- Minter-Goeldbloed, E., Minter, D. M., Marshal, T. F. C. (1978). Quantitative comparison between xenodiagnóstico and hemoculture in detection of *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) in experimental and natural chronic infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72:217-225.
- Momen, H. (1999). Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 181-184.
- Moncayo, A; Yanine, M.I.O. (2006). An update on Chagas Disease(human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*.100:663-677.
- Murta, S.M.F., Ropert, C., Alves, R.O., Gazzinelli, R.T., Romanha, A.J. (1999). In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunology*, 21:535-544.
- Oliveira, R.P., Broude, N.E., Macedo, A.M., Cantor, C.R., Smith, C.L., Pena, S.D. J. (1998). Probing the genetic population structure of *Typanosoma cruzi* with microsatélites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:3776-3780.
- Palacios-Pru, E., Carrasco, H., Scorza, C., Espinoza, R. (1989). Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41(1):29-40.
- Palau, M. T., Mejia, A. J., Vergara, U., Zuniga, C. A. (2003). Action of *Typanosoma rangeli* in infections with virulent *Typanosoma cruzi* populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98:543-548.
- Park, K.B., Dalton-Brown, E., Hirst, C., Williams, D.P. (2006). Selection of new chemical entities with decrease potential for adverse drug reactions. *Eur.J. Pharmacol.*, 549(13):1-8.
- Payne, S.M. e Finkelstein, R.A. (1978). The critical role of iron in host-bacterial interactions. *J. Clin. Invest.*, 61:1428-1440.
- Postan, M., McDaniel, J.P., Dvorak, J.A. (1983). Studies on *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparasion of infection of C3H/HeN mice with two clones isolated from a common source. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32:497-506.

- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1:92-100.
- Pizzi, T., Agosin, M., Christen, R., Hoecker, G., Neghme, A. (1949). Influencia de la constitución genética en la resistencia de la laucha a la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biológica*, 8:43-53.
- Porter, J.B., Rafique, R., Srichairatanakool, S., Davis B.A., Shah, F.T., Hair, T., Evans, P. (2005). Recent Insights into Interactions of Deferoxamine with Cellular and Plasma Iron Pools: Implications for Clinical Use. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1054:155-168
- Pupulin, A.R.T., Paludetto, A., da Silva, S.V., Bracht, A.M.K. (2005). Benznidazol effects in perfused rat liver. *RBAC*, 37(3):153-156.
- Ribeiro, C.M., Budni, P., Pedrosa, R.C., Farias, M.S., Parisotto, E.B., Dalmarco, E. M., Fröde, T.S., Oliveira-Silva, D., Colepicolo, P., Filho, D. W. (2009). Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benznidazole in chronic Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol.*, 145: 27-33.
- Romanha, A.J., Pereira, A.A.S., Chiari, E., Kilgour, V. (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.* 62:139-142.
- Romanha, A. J. (1982). *Heterogeneidade enzimática em Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110 p.
- Rottenberg, M.E., Cardoni, R.L., Titto, E.H., Moreno, M., Segura, E.L. (1988). *Trypanosoma cruzi* immune response in mice immunized with parasite antigens. *Experimental Parasitology*, 65:101-108.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. 2^a ed New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Book 01, 1989.
- Sanchez G., Wallace A., Olivares M., Diaz N., Aguilera X., Apt W. & Solari A. (1990). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: in vitro differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. *Experimental Parasitology*, 71:125-133.
- Santos, F.R., Pena, S.D.J., Epplen, J.T. (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, 90:655-656.

- Saúde-Guimarães, D.A., Faria, A.R. (2007). Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(3):455-465.
- Schlemper Jr., B.R., Avila, C.M., Coura, J.R., Brener, Z. (1983). Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. *Rev. Soc. Br. Med. Trop.*, 16:23-30.
- Schenone, H., Rojo, M., Rojas, A., Concha, L. (1977). Positividad diurnal y nocturna del xenodiagnóstico en un paciente com infección chagásica crónica de paratemia permanente. *Bol. Chil. Parasitol.*, 32:63-66.
- Schinor, E.C., Salvador, M.J., Ito, I.Y., Albuquerque, S. Dias, D.A. (2004). Trypanocidal and antimicrobial activities of *Moquinia kingii*. *Phytomedicine* 11:224-229.
- Silva, L.H.P., Nussenzweig, V., (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica*, 20, 191-203.
- Siimes, M.A., Refino, C., Dallman, P.R. (1980). Manifestations of iron deficiency at various levels of dietary iron intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33:570-574.
- Soares, M.B.P., Pontes-de-Carvalho, L., Ribeiro-dos-Santos, R. (2001). The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune response meet. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 73:547-559.
- Summers, M., Jacobs, A., Tudway, D., Perera, P., Ricketts, C. (1979). Studies in desferrioxamine and ferrioxamine in normal and iron-loaded subjects. *Br. J. Haematol.*, 42:547-555
- Tafuri, W.L. (1970). Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas's disease: light and electron microscopic studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19:405-417.
- Tarleton, R.L. (2001). Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int J. Parasitol.*, 31:550-554.
- Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V., Simon, D., Morris, S.A., Weiss, L. M., Wittner, M. (1992). Chagas' disease *Clin. Microbiol. Rev.*, 5(4):400-419.
- Taylor, M.C and Kelly, J.M. (2010). Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology Cambridge University Press.*, 137:899–917.
- Teixeira, A.R.L., Teixeira, M.L. e Santos-Busch, C.A. (1975). The immunology of Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *American Journal of Pathology*, 80:163-180.

- Tibayrenc, M., Ayala, F. J. (1988). Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, 42:277-292.
- Toledo, M.J.O. (2001) Comportamento biológico em camundongos de clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a diferentes genótipos. Tese (doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 162 p.
- Toledo, M.J.O; Tafuri, W.L., Bahia, M.T., Tibayrenc, M., Lana, M. (2004). Genetic diversity and drug reistence in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Res. Adv. In Antimicrob. Agents & Chemother.*, 4:11-20.
- Traore, O., Carnevale, P.O., Kaptue-Noche, L.O., Bede, JO., Desfontaine, M., Elion, J., Labie, D., Nagel, R.L. (1991). Preliminary reports in the use of desferrioxamine in the treatment of Plasmodium falciparum malaria. *American Journal of Hematology*, 37:206-208.
- Trischmann, T., Tanowitz, H., Wittner, M., Bloom, B. (1978). *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Experimental Parasitology*, 45:160-168.
- Urbina, J.A. (2001). Specific treatment of Chagas Disease: current status and new developments. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 14(6), 733-741.
- Urbina, J.A. (2002). Chemoterapy of Chagas Disease. *Curr. Pharm. Des.*, 8:287-295.
- Urbina, J.A., Lira, R., Visbal, G., Bartrolí, J. (2000). In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:2498-2502.
- Urbina, J.A., Payares, G., Sanoja, C., Lira, R and Romanha, A.J. (2003b). In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Intern. J. Antimicrob. Agents*, 21:27-38.
- Urbina, J.A., Payares, G., Sanoja, C., Molina, J., Lira, R., Brener, Z., Romanha, A.J. (2003c). Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21:39-48.
- Vago, A.R., Andrade, L.O., Leite, A.A., d'Avila, R.D., Macedo, A.M., Adad, S.J., Tostes, S. Jr; Moreira, M.C., Filho, G.B., Pena, S.D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with

- chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.*, 156:1805-1809.
- Veloso, V.M., Romanha, A.J., Lana, M., Murta, S.M., Carneiro, C.M., Alves, C.F., Borges, E.C., Tafuri, W.L., Machado-Coelho, G.L., Chiari, E. & Bahia, M.T. (2005). Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol. Res.*, 96:382-389.
- Veloso, V. M. (2000) Análise da variabilidade de populações do *Trypanosoma cruzi* isoladas de cães após 2 A 17 anos de infecção. Dissertação de Mestrado – NUPEB, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 124 p.
- Vitor, R.W., Chiari, E. (1987). Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction. I. Different antigenic extracts. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 29:178-182.
- Voller, A., Bidwell, D.E. e Bartlett, A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull WHO*, 53:55-65.
- Xavier, S.S., Hasslocher Moreno, A., Sousa, A.S., Albajar Viñas, P. (2006). Abordaje diagnóstico y terapéutico de la cardiopatía chagásica crónica. *Enfermedades Emergentes*, 8:28-36.
- Wallace, A., Ortiz, S., Sanchez, G., Villagra, R., Muga, M., Solari, A. (2001) Studies on parasitemia courses and mortality in mice infected with genetically distant *Trypanosoma cruzi* clonets. *Biol. Res.*, 34, 83-90.
- Weinberg, G. A. (1994). Iron chelators as therapeutic agents against *Pneumocystis carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38:997-1003.
- Wincker, P., Britto, C., Pereira, J.B., Cardoso, M.A., Oelemann, W., Morel, C.M. (1994). 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.*, 51:771-777.
- World Health Organization (2009). Sixty-Second World Health Assembly A62/17
- Wrightsmann, R., Krassner, S., Watson, J. (1982) Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect Immun.*, 36(2)637-44.
- Yu, H., Adedoyin, A. (2003). ADME-Tox in drug discovery:integration of experimental and computational technologies. *Drug Discov. Today*, 18:852-861.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbel, I.D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.J. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104(7):1051-1054

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](#)