

Helen Rodrigues Martins

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

Universidade Federal de Ouro Preto
Ouro Preto, MG - 2008

Helen Rodrigues Martins

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

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

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

Universidade Federal de Ouro Preto
Ouro Preto, MG - 2008

Helen Rodrigues Martins

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

Artigo Publicado

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

Artigo Aceito Para Publicação

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

Apoio Financeiro: UFOP, UFMG, CNPq, FAPEMIG.

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

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

HRM

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À Viviane Michelline Veloso pela cuidadosa revisão do português.

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

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

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

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS NA AMÉRICA LATINA	2
1.2 TRATAMENTO ESPECÍFICO DA DOENÇA DE CHAGAS	4
1.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	6
1.4 QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL COM OS NITRODERIVADOS.....	8
1.5 O <i>Trypanosoma cruzi</i> : DIVERSIDADE GENÉTICA E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	12
1.5.1 Organização do Genoma.....	12
1.5.2 Estrutura Populacional do <i>T. cruzi</i>	14
1.5.3 Correlação entre a Genética do <i>T. cruzi</i> e as Propriedades Biológicas	17
1.5.4 Os Genótipos Principais do <i>T. cruzi</i> e suas Propriedades Biológicas	18
1.6 INFECÇÕES MISTAS.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 CLONES DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.2 ANIMAIS	26
3.3 INFECÇÃO DOS ANIMAIS.....	27
3.4 TRATAMENTO.....	28
3.4.1 Fármaco e Esquema de Tratamento.....	28
3.5 CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO.....	29
3.5.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF).....	29
3.5.2 Hemocultura (Hc).....	29
3.6 ANÁLISE DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL EM INFECÇÕES MISTAS E MONOINFECÇÕES POR CLONES DO <i>Trypanosoma. cruzi</i> CONSIDERANDO DIFERENTES PARÂMETROS BIOLÓGICOS.....	29
3.6.1 Parasitemia.....	30
3.6.2 Mortalidade.....	30
3.6.3 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol.....	31
3.6.3.1 Testes Empregados no Controle de Cura	31
3.6.3.1.1 Avaliações Parasitológicas	31
3.6.3.1.1.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF).....	31
3.6.3.1.1.2 Hemocultura (Hc).....	31
3.6.3.1.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
3.6.3.1.1.3.1 Extração de DNA de Sangue.....	31
3.6.3.1.1.3.2 Amplificação específica do kDNA do <i>T. cruzi</i>	32
3.6.3.1.2 Avaliações Sorológicas	33
3.6.3.1.2.1 Sorologia Convencional pela ELISA (ELISA).....	33
3.6.3.1.2.2 Sorologia Não Convencional para Pesquisa de Anticorpos Antitripomastigotas Vivo pela Citometria de Fluxo (AATV).....	34
3.6.3.2 Critério de Cura	34
3.6.3.3 Comparação dos Perfis de Susceptibilidade ao BZ.....	35
3.6.4 Análise da Frequência de Positividade do kDNA nos Tecidos.....	36
3.6.4.1 Necropsia dos Animais.....	36
3.6.4.2 Extração de DNA em Tecidos e PCR.....	37
3.7 IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DO <i>Trypanosoma cruzi</i> PRESENTES NAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS POR COMBINAÇÕES DE CLONES PERTENCENTES AOS GENÓTIPOS PRINCIPAIS	37
3.7.1 Identificação dos Isolados do <i>T. cruzi</i> Recuperados pela Hemocultura	37

3.7.1.1	Análise Isoenzimática	37
3.7.1.1.1	Obtenção da Massa Úmida do T. cruzi e do Extrato Enzimático	38
3.7.1.1.2	Eletroforese de Isoenzimas e Revelação.....	38
3.7.1.2	Análise de Microssatélites	40
3.7.1.2.1	Extração de DNA Total do Sedimento Proveniente da Massa Úmida do T. cruzi	40
3.7.1.2.2	PCR de Microssatélites	40
3.7.1.2.3	Determinação do Tamanho dos Alelos de Microssatélites	42
3.7.1.2.4	Padronização da Análise de Microssatélites para os Clones do T. cruzi Pertencentes aos Genótipos Principais.....	43
3.7.1.2.4.1	Avaliação da Sensibilidade dos Locos de Microssatélites para Detecção dos Clones do T. cruzi nas Infecções Mistas	44
3.7.1.2.4.2	Análises Adicionais do Clone Cuica cl1	44
3.7.1.2.4.2.1	Clonagem de Células do Clone Cuica cl1 do T. cruzi	45
3.7.1.2.4.2.1.1	Obtenção de Células do Clone Cuica cl1 para Separação em “FASC Cell Sorter”	45
3.7.1.2.4.2.1.2	Separação das Células Únicas do Clone Cuica cl1 do T. cruzi em “FACS Vantage Cell Sorter”	45
3.7.1.2.4.2.2	PCR de Microssatélites em Células Únicas do Clone Cuica cl1 do T. cruzi	46
3.7.1.2.4.2.3	Manuseio Laboratorial do Clone Cuica.....	46
3.7.2	Identificação pelo Perfil de Microssatélites dos Isolados do T. cruzi em DNA Obtido Diretamente do Sangue ou Tecidos.....	47
3.7.3	PCR “full nested” para Detecção dos Alelos de Microssatélites	47
4.	RESULTADOS.....	50
4.1	PARASITEMIA	51
4.2	MORTALIDADE.....	55
4.3	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AO BENZONIDAZOL EM INFECCÕES MISTAS POR CLONES DO Trypanosoms cruzi PERTENCENTES AOS GENÓTIPOS PRINCIPAIS.....	56
4.3.1	Estabelecimento do Critério de Cura para Avaliação da Eficácia Terapêutica do Benzonidazol.....	56
4.3.2	Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo as Linhagens do T. cruzi	60
4.3.3	Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo os Genótipos Principais do T. cruzi	62
4.3.4	Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol Segundo as Monoinfecções e Infecções Mistas com Diferentes clones do T. cruzi	64
4.4	ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE DO kDNA DO T. cruzi NOS TECIDOS.....	68
4.4.1	Positividade Global da PCR em Diferentes Tecidos de Animais Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT).....	68
4.4.2	Positividade Global da PCR no Conjunto de Tecidos de Animais Infectados e Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT) Agrupados Segundo a Combinação Genotípica.....	71
4.4.3	Positividade da PCR em Tecidos de Animais Infectados Tratados (IT) e seus Controles Não Tratados (INT) Considerando Cada Tecido e Combinação Genotípica Individualmente.....	74
4.4.4	PCR em Tecidos em Animais Tratados Curados (TC).....	76
4.5	IDENTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DO Trypanosoma cruzi PRESENTES NAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS POR COMBINAÇÕES DE CLONES PERTENCENTES AOS GENÓTIPOS PRINCIPAIS	79
4.5.1	Análise Molecular dos Padrões de Referência dos Oito Clones do T. cruzi Pertencentes aos Genótipos Principais em Estudo	79
4.5.1.1	Padronização da Análise de Isoenzimas para os Oito Clones do T. cruzi em Estudo.....	79
4.5.1.2	Padronização da Análise de Microssatélites para os Oito Clones do T. cruzi em Estudo.....	81
4.5.2	Análises Adicionais do Clone Cuica cl1 do T. cruzi	86

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

- Figura 1. Dendograma mostrando a divergência filogenética entre os 8 clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais em estudo.. 19
- Figura 2. Perfis representativos das curvas de parasitemia obtidos em monoinfecções e infecções mistas por estoques de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais. 54
- Figura 3 Perfil sorológico de camundongos BALB/c infectados com diferentes clones e combinações dos genótipos principais do *Trypanosoma cruzi*. 548
- Figura 4. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol dos clones do *T. cruzi* e suas diferentes combinações segundo as linhagens do *T. cruzi* (*T. cruzi* I, *T. cruzi* e *T. cruzi* II)..... 62
- Figura 5. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol dos clones do *T. cruzi* e suas diferentes combinações segundo os genótipos principais do *T. cruzi* (20, 1, 39 e 32).. 63
- Figura 6. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol de monoinfecções e infecções mistas com estoques do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos diferentes genótipos. 66
- Figura 7. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48), coletados na FA e FC. 69
- Figura 8. Comparação entre a positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em diferentes tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48), coletados na FA e FC. 70
- Figura 9. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados com esse parasito e tratados com BZ (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48) agrupados por combinação genotípica e coletados na FA e FC. 72
- Figura 10. Comparação entre a positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48) agrupados segundo a combinação genotípica e coletados na FA e FC..... 73
- Figura 11. Comparação entre a positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* no conjunto de tecidos de animais infectados tratados com Benzonidazol (IT, n = 48) e de seus respectivos controles infectados não tratados (INT, n = 48), coletados na FA e FC..... 75
- Figura 12. Positividade global da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em tecidos de camundongos BALB/c infectados com diferentes combinações genotípicas deste parasito (20+19, 20+39, 20+32, 19+39, 19+32 e 39+32) classificados como infectados não tratados, tratados não curados e tratados curados..... 77
- Figura 13. Positividade da PCR para detecção do kDNA do *Trypanosoma cruzi* em tecidos de camundongos BALB/c infectados com diferentes combinações genotípicas deste

- parasito (20+39, 19+39, 19+32 e 39+32), tratados durante a fase aguda da infecção e considerados curados pelo critério proposto por Kretlli & Brener (1982). 78
- Figura 14. Perfis eletroforéticos das enzimas GPI, G6PD, ICD e PGM dos clones do *Trypanosoma cruzi*, pertencentes aos genótipos principais 19, 20, 39 e 32..... 80
- Figura 15. Rede de Wagner sem raiz construída pelo método de máxima parcimônia, a partir dos dados obtidos das análises para sete locos de microssatélites (TcTAC15, TcTAT20, TcAAAT8, TcAAAT6, TcATT14, TcGAG10 e TcCAA10) para os clones do *T. cruzi* utilizados neste trabalho..... 83
- Figura 16. Eletrofluorogramas obtidos a partir da análise dos alelos de microssatélites amplificados para o loco TcAAAT6 no seqüenciador automático de DNA A.L.F. feita em misturas teóricas de DNA de *Trypanosoma cruzi* (X+Y). 85
- Figura 17. Eletrofluograma obtido a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F. dos alelos do loco TAC15 de microssatélites em células únicas do clone Cuica cl1 do *Trypanosoma cruzi*.. 86
- Figura 18. Perfis eletroforéticos das enzimas GPI, G6PD, ICD e PGM observados no estoque Cuica cl1 de *Trypanosoma cruzi* em cultura acelular e em camundongos *Swiss* (5^a e 15^a passagens)..... 88
- Figura 19. Eletrofluograma obtido a partir da análise no sequenciador automático de DNA A.L.F. dos alelos de microssatélites do loco SCLE10 do clone Cuica cl1 de *Trypanosoma cruzi*, após sua manutenção em cultura acelular e em camundongos *Swiss* (5^a e 15^a passagens)..... 89
- Figura 20. Perfis eletroforéticos da enzima GPI representativos dos resultados obtidos para isolados de animais com diferentes combinações genótípicas do *Trypanosoma cruzi*... 90
- Figura 21. Eletrofluograma obtido a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F dos alelos de microssatélites amplificados para o loco SCLE10 de isolados de animais infectados com a mistura P209 cl1+Gamba cl1 de *Trypanosoma cruzi*..... 93
- Figura 22. Eletrofluograma obtidos a partir da análise no seqüenciador automático de DNA A.L.F dos alelos de microssatélites amplificados para o loco SCLE10 de isolados de animais infectados com a mistura OPS21cl11+Bug2148 cl1 de *Trypanosoma cruzi*..... 94
- Figura 23. Diagrama representativo dos perfis enzimáticos detectados na caracterização enzimática de clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais e de isolados provenientes de animais infectados com misturas desses genótipos. 96

Tabela I. Alvos e fármacos promissores para o tratamento da doença de Chagas	8
Tabela II. Características dos clones do <i>Trypanosoma cruzi</i> empregados nesse estudo.....	27
Tabela III. Misturas do clones <i>Trypanosoma cruzi</i> pertencentes aos genótipos principais utilizados na infecção de camundongos BALB/c combinados segundo o padrão de virulência e susceptibilidade ao Benzonidazol.....	28
Tabela IV. Condições eletroforéticas e de revelação usadas para os sistemas enzimáticos estudados.....	39
Tabela V. Seqüência de iniciadores usados para amplificar os locos de microssatélites do <i>T.cruzi</i>	42
Tabela VI. Misturas teóricas de clones de <i>Trypanosoma cruzi</i> pertencentes a genótipos distintos utilizadas na padronização da análise de microssatélites.....	44
Tabela VII. Comparação entre o percentual de positividade dos testes sorológicos e parasitológicos em amostras biológicas provenientes de camundongos BALB/c infectados com diferentes combinações genótípicas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
Tabela VIII. Perfil de susceptibilidade ao Benzonidazol de infecções mistas com clones do <i>Trypanosoma cruzi</i> pertencentes aos genótipos principais que apresentaram mudança em relação ao resultado esperado considerando as monoinfecções com cada clone presente na mistura.....	67
Tabela IX. Tamanho dos alelos em pares de base identificados nos clones do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos oito locos de microssatélites analisados.	82
Tabela X. Tamanho dos alelos de microssatélites em pares de base identificados para as populações C1 e C2 presentes no clone Cuica cl1 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	87
Tabela XI. Identificação de isolados do <i>Trypanosoma cruzi</i> provenientes de camundongos BALB/c infectados com diferentes misturas dos genótipos principais.....	92
Tabela XII. Perfis de microssatélites inesperados detectados em isolados provenientes de camundongos BALB/c com infecções mistas por clones do <i>Trypanosoma cruzi</i> pertencentes aos genótipos principais.....	96

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

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

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Doença de Chagas na América Latina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Tratamento Específico da Doença de Chagas

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

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

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

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

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

1.3 Desenvolvimento de Novos Fármacos

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

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

Alvos	Importância	Mecanismo de ação e fármaco disponíveis
Biossíntese de esteróis	O <i>T. cruzi</i> requer em todos os estágios de seu ciclo de vida esteróis específicos para a viabilidade celular e proliferação. Inibição de sua biossíntese leva à perda da viabilidade celular por depleção de esteróis essenciais e acúmulo de intermediários tóxicos.	Inibição da enzima citocromo P-45-dependente de C14 α esterol demetilase: Cetoconazol e Itraconazol (McCabe <i>et al.</i> , 1984; Moreira <i>et al.</i> , 1992; Brener <i>et al.</i> , 1993; Toledo <i>et al.</i> , 2003), Albaconazol (Guedes <i>et al.</i> , 2004), Posoconazol (Urbina <i>et al.</i> , 1998; Molina <i>et al.</i> , 2000) e Ravuconazol (Urbina <i>et al.</i> , 2003).
Cisteíno-proteases	Participam de importantes funções no crescimento e sobrevivência do parasito, sendo responsável pela maior atividade proteolítica do <i>T. cruzi</i> em todos os estágios de vida.	Inibição enzimática: Thiocarbazina (Du <i>et al.</i> , 2002).
Biossíntese de esteróides e polisoprenóides	Parasitas protozoários contêm uma variedade de esteróides e polisoprenóides essenciais a sua sobrevivência, cuja síntese está ligada à atividade da enzima farnesil-pirofosfato sintase.	Inibição da enzima farnesilpirofosfato sintase envolvida na síntese de esteróides e polisoprenóides: Pamidronato e Risedronato (Urbina <i>et al.</i> , 1999; Szajnman <i>et al.</i> , 2003; Montalvetti <i>et al.</i> , 2001; Martin <i>et al.</i> , 2001).
Mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo	As enzimas tripanotiona redutase e glutathiona sintase participam dos mecanismos de proteção celular contra o estresse oxidativo (Turrens, 2004).	Inibição enzimática: fenotiazinas como a clomipramina e Thiordidazina, nitrofuranos e nafiltilquinonas (Rivarola <i>et al.</i> , 2002; D'Silva <i>et al.</i> , 2002; Lo Presti <i>et al.</i> , 2004).

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Quimioterapia Experimental com os Nitroderivados

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.1 Organização do Genoma

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.2 Estrutura Populacional do *T. cruzi*

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

em cada um dos 15 locos analisados, fossem combinados randomicamente, o número total de genótipos esperados seria de 7×10^{15} e, todos poderiam ocorrer em baixa frequência. Entretanto, foram encontrados apenas 43 zimodemas, dos quais 16 diferem por um único alelo. Além disso, alguns zimodemas foram amostrados repetidamente em diferentes regiões geográficas e períodos de tempo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

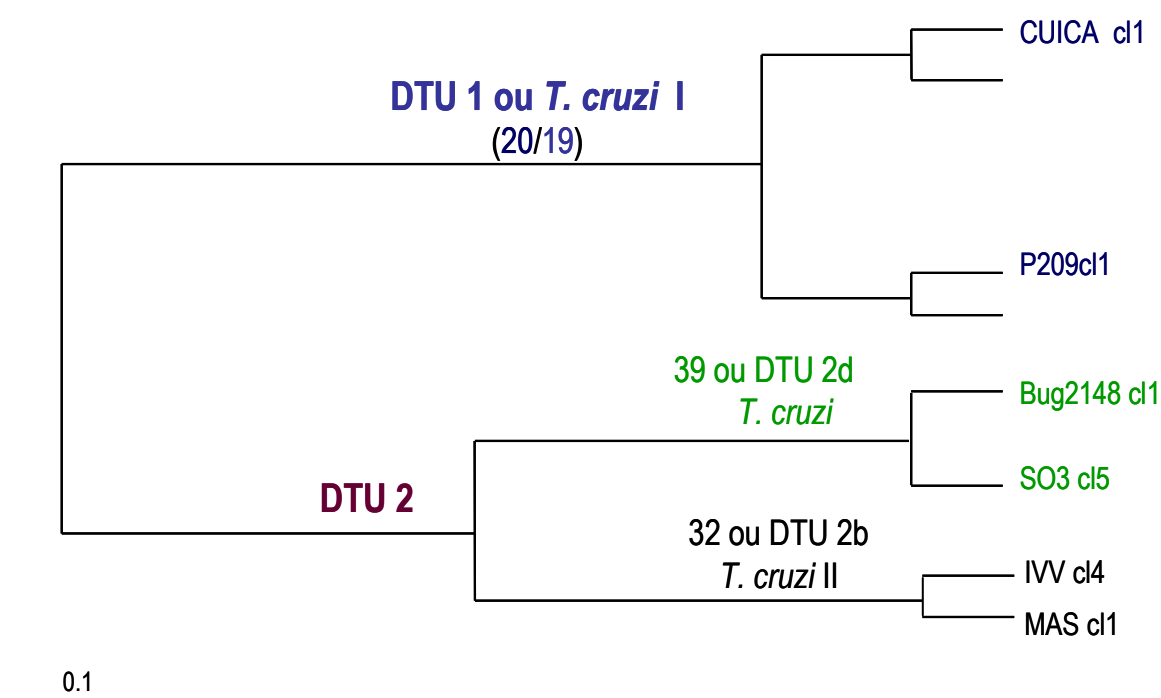


Figura 1. Dendrograma mostrando a divergência filogenética entre os oito clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais (20, 19, 39 e 32) em estudo, construído pela UPGMA usando a matriz de distância genética de Jaccard (1908) obtida pela análise isoenzimática de 22 locos genéticos (Modificada de Tibayrenc *et al.*, 1993) Os clones pertencentes a cada um dos genótipos principais são indicados em cores distintas: em azul estão indicados clones pertencentes aos genótipos 20 e 19 (DTU I e *T. cruzi* I), em verde os clones pertencentes ao genótipo 39 (DTU 2 e *T. cruzi*) e em preto estão indicados clones pertencentes ao genótipo 32 (DTU 2b e *T. cruzi* II).

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

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

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

1.6 Infecções Mistas

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

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

2.2 Objetivos específicos

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

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

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

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

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

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

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

3. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clones do *Trypanosoma cruzi*

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

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

3.2 Animais

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

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

¹ Classificação	² Genótipos	² Clones	Hospedeiros	Região, País	³ Virulência	⁴ Susceptibilidade Ao BZ
<i>T. cruzi</i> I	19	Gamba cl1	<i>Didelphis azare</i>	São Paulo, Brasil	Maior	40%
		OPS21 cl11	Homem, fase aguda	Cojedes, Venezuela	Menor	100%
<i>T. cruzi</i> I	20	P209 cl1	Homem, fase crônica	Sucre, Bolívia	Maior	0%
		Cuica cl1	<i>Opossum cuica philander</i>	São Paulo, Brasil	Menor	0%
<i>T. cruzi</i>	39	Bug2148 cl1	<i>Triatoma infestans</i>	Rio Grande do Sul, Brasil	Maior	0%
		SO3 cl5	<i>Triatoma infestans</i>	Potosi, Bolívia	Menor	100%
<i>T. cruzi</i> II	32	IVV cl4	Homem, fase crônica	Brasília, Brasil	Maior	40%
		MAS cl1	Homem, fase crônica	Santiago, Chile	Menor	100%

1 Classificação filogenética do *T. cruzi* segundo Anonymous, (1999).

2 Genótipos principais e 2' clones naturais do *T. cruzi* descritos por Tibayrenc & Brenière (1988).

3 Virulência e 4 Susceptibilidade ao BZ em camundongos BALB/c determinada por Toledo *et al.*, (2002 e 2003), respectivamente.

3.3 Infecção dos Animais

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

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

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

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

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

3.4 Tratamento

3.4.1 Fármaco e Esquema de Tratamento

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

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

3.5 Confirmação da infecção

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

3.5.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF)

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

3.5.2 Hemocultura (Hc)

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

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

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

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

3.6.1 Parasitemia

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

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

3.6.2 Mortalidade

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

3.6.3 Perfil de Susceptibilidade ao Benzonidazol

3.6.3.1 Testes Empregados no Controle de Cura

3.6.3.1.1 Avaliações Parasitológicas

3.6.3.1.1.1 Exame de Sangue a Fresco (ESF)

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

3.6.3.1.1.2 Hemocultura (Hc)

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

3.6.3.1.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

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

3.6.3.1.1.3.1 Extração de DNA de Sangue

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

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

3.6.3.1.1.3.2 Amplificação específica do KDNA do *T. cruzi*

A amplificação foi processada de acordo com o protocolo de Gomes *et al.* (1998) modificado. A mistura reacional continha 10mM de cloridrato de hidroximetilaminometano (Tris-HCl)/pH 9,0; 0,1% de Triton X-100 (Tampão 10x, Invitrogen São Paulo, SP, Brasil); 75mM de cloreto de potássio (KCl - Tampão 10x, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 3,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂ – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma, St. Louis, MO, EUA); 0,5U de *Taq* Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 10pmoles de cada iniciador S35 (5'AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA3') e S36 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA3'), descritos por Ávila *et al.*, 1991 e sintetizados pela Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil); 2,0µL da amostra extraída do sangue; e, água Milli-Q suficiente para 11µL. A mistura foi coberta com 20µL de óleo mineral para evitar evaporação e a amplificação foi processada em um termociclador PTC-150 (MJ Research, Ramsey, MA, EUA) nas seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 95°C por 5min, seguida de 35 ciclos de amplificação constituídos de um passo de desnaturação a 95°C por 1min, um de anelamento a 65°C por 1min e um de extensão a 72°C por 1min, finalizando com uma etapa de extensão a 72°C por 10min. O DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelado com NaOH e formaldeído após a coloração pela prata (Santos *et al.*, 1993).

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

3.6.3.1.2 Avaliações Sorológicas

3.6.3.1.2.1 Sorologia Convencional pela ELISA (ELISA)

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

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

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

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

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

3.6.3.2 Critério de Cura

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

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

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

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

3.6.3.3 Comparação dos Perfis de Susceptibilidade ao BZ

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

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

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

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

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

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

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

3.6.4 Análise da Freqüência de Positividade do kDNA nos Tecidos

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

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

3.6.4.1 Necropsia dos Animais

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

3.6.4.2 Extração de DNA em Tecidos e PCR

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

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

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

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

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

3.7.1.1 Análise Isoenzimática

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

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

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

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

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

3.7.1.1.2 Eletroforese de Isoenzimas e Revelação

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

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

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

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

Descrição dos Tampões

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

§ Kreutzer II: 0,2M fosfato/pH 7,0

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

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

3.7.1.2 Análise de Microssatélites

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

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

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

3.7.1.2.2 PCR de Microssatélites

A reação de PCR foi realizada segundo a metodologia descrita por Valadares *et al.* (2008) em um volume total de 15µL, contendo 10mM Tris-HCl/pH 9,0; 50mM de KCl, 0,1% de Triton X-100 (Tampão B, Promega, Madison, WI, EUA); 2,5mM de MgCl₂ (Promega, Madison, Wiscosin, EUA); 0,5U *Taq* DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EUA);

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

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

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

Iniciador	Seqüência
TcAAT8-d	5'-FluoresceínaACCTCATCGGTGTGCATGTC-3'
TcAAT8-r	5'-TATTGTGCGCCGTGCAATTTC-3'
TcAAT8ex-d	5'-AGAGGCGCACAGTTGTATGC-3'
TcAAT8ex-r	5'-GACGCTTTATGTTGAATICA-3'
TcATT14-d	5'-FluoresceínaTTATGGATGGGGTGGGTTTG-3'
TcATT14-r	5'-AGCAATAATCGTATTACGGC-3'
TcATT14ex-d	5'-TTTGCAAATGGGACAGTTAC-3'
TcATT14ex-r	5'-ACCTATTTTGCTCCTTGGTG-3'
TcCAA10-d	5'-FluoresceínaGCACAGGGAGTCAAACCTCA-3'
TcCAA10-r	5'-TCAAATTTATCACCCGTCGA-3'
TcCAA10ex-d	5'-GGTAAGGGCGAGTATGACTG-3'
TcCAA10ex-r	5'-TAGCCAATAAAAAGTGATGCC-3'
TcGAG10-d	5'-FluoresceínaTTCTCGGCTTCTATGTGTGC-3'
TcGAG10-r	5'-GTGCCCTCCGTTTATTCCTC-3'
TcGAG10ex-d	5'-TTTCTTACTGCGAGGTGAGT-3'
TcGAG10ex-r	5'-AAGTGAAGTGAAGTGGTGCC-3'
TcTAC15-d	5'-FluoresceínaGAATTTCCCATTTCCAAGC-3'
TcTAC15-r	5'-CGATGAGCAACAATCGCTTC-3'
TcTAC15ex-d	5'-GGATATTTGTTACTGCTGGC-3'
TcTAC15ex-r	5'-CGGACATATCCCTCTAGTCG-3'
TcTAT20-d	5'-FluoresceínaGATCCTTGAGCAGCCACCAA-3'
TcTAT20-r	5'-CAAATTCCCAACGCAGCAGC-3'
TcTAT20ex-d	5'-AGGCTGATCCTTGAGCAGCC-3'
TcTAT20ex-r	5'-CGGCGGTCITCTTTTGTCTC-3'
TcAAAT6-d	5'-FluoresceínaGCCGTGTCCTAAAGAGCAAG-3'
TcAAAT6-r	5'-GGTTTTAGGGCCTTTAGGTG-3'
TcAAAT6ex-d	5'-ACGCACTCTCTTTGTTAACAG-3'
TcAAAT6ex-r	5'-CACATACACATTCCAATGGTT-3'
SCLE10-d	5'-FluoresceínaGATCCGCAATAGGAAAC-3'
SCLE10-r	5'-GTGCATGTTCCATGGCTT-3'

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

3.7.1.2.3 Determinação do Tamanho dos Alelos de Microssatélites

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.7.1.2.4.2 Análises Adicionais do Clone Cuica cl1

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

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

3.7.1.2.4.2.1.1 Obtenção de Células do Clone Cuica cl1 para Separação em “FACS Cell Sorter”

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

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

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

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

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

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

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

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

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

As placas contendo uma única célula do *T. cruzi* por orifício foram retiradas do congelador e, imediatamente, submetidas a aquecimento a 80°C, por 1 hora, em termociclador a fim de realizar a lise celular. Após a lise, foi realizada a PCR utilizando o protocolo “*full nested*” PCR descrito no item 3.9.2.1. Na primeira amplificação, foi utilizado um volume total de 25µL contendo as células do *T. cruzi* lisadas; 5µL de Triton X-100 10%; 10mM Tris-HCl pH 9,0; 50mM de KCl; 0,1% Triton X-100 (Tampão B, Promega, Madison, WI, EUA); 2,5mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, EUA); 1U *Taq* DNA Polimerase (Promega, Madison, WI, EUA); 300µM de cada dNTP (Sigma, Sto. Louis, MO, EUA); 0,3µM de cada iniciador externo (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil – Tabela V) que foram recobertos com óleo mineral. A segunda amplificação foi realizada como descrito no item 3.9.2.1.

3.7.1.2.4.2.3 Manuseio Laboratorial do Clone Cuica

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

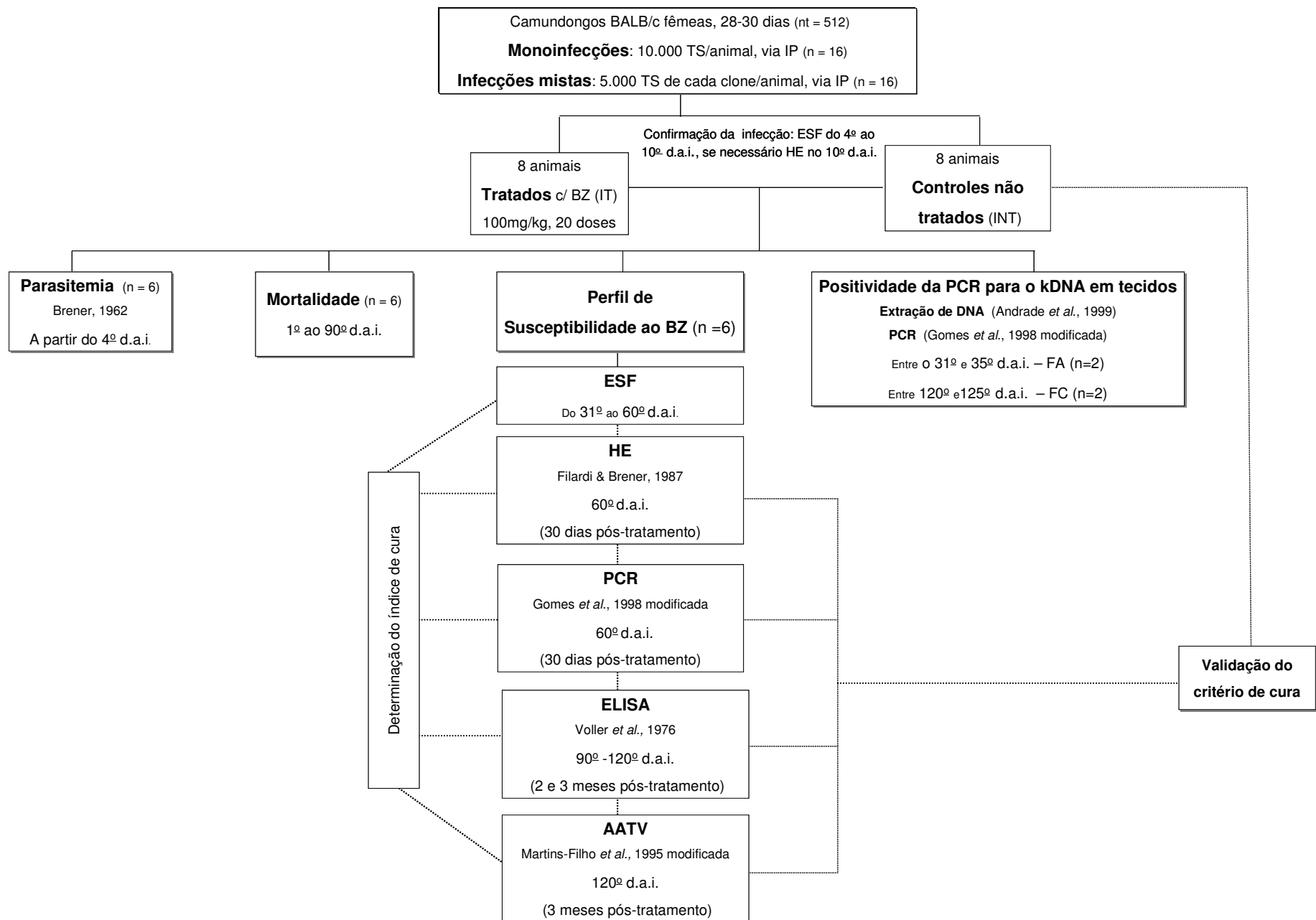
3.7.2 Identificação pelo Perfil de Microssatélites dos Isolados do *T. cruzi* em DNA Obtido Diretamente do Sangue ou Tecidos

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

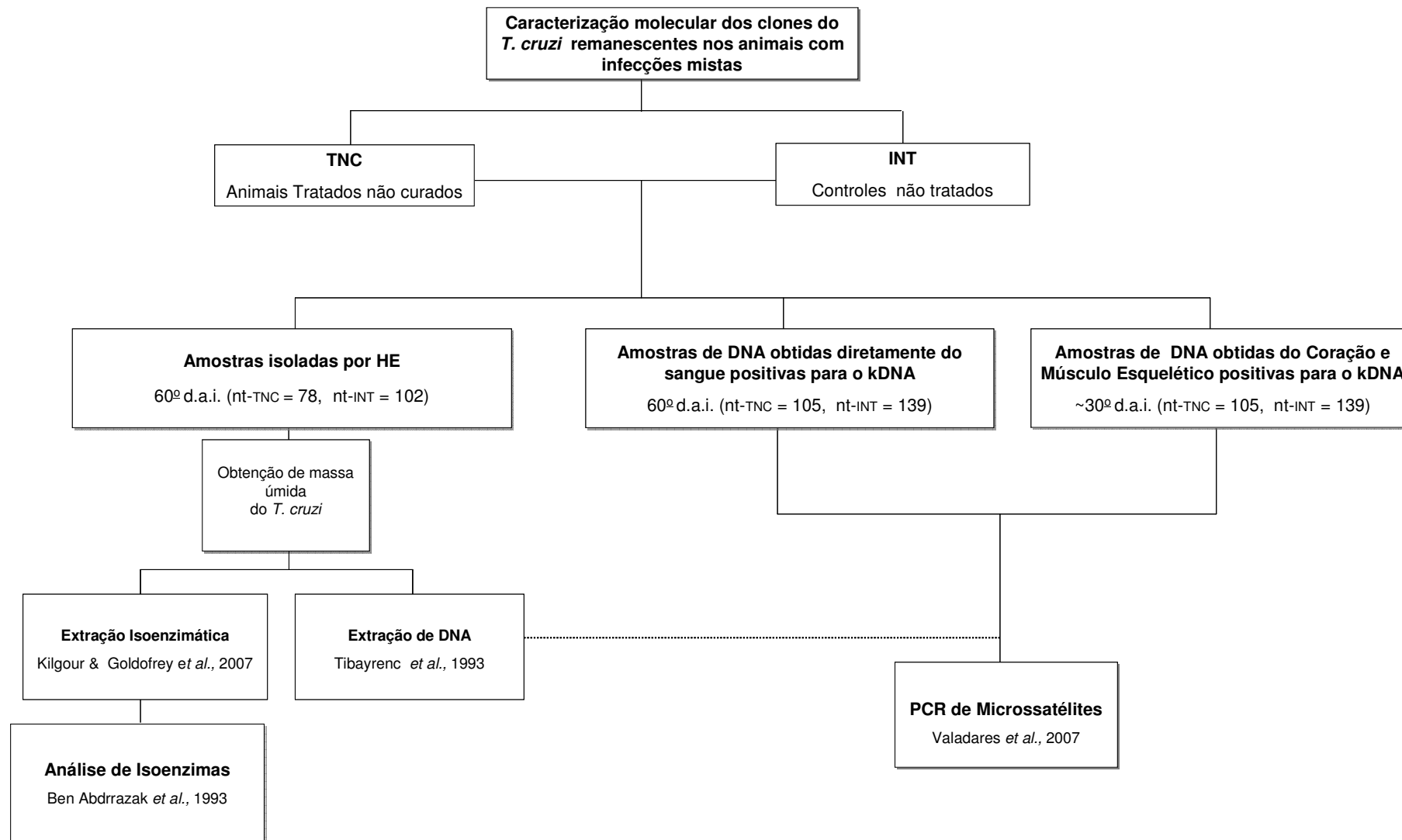
Os lisados provenientes de amostras do coração e músculo esquelético coletados entre os 30-35º dias após infecção, positivos para o fragmento de 330pb do kDNA do *T. cruzi* (metodologia descrita no item 3.6.4.2 e 3.6.3.1.1.3.2), também foram analisados em relação ao perfil de microssatélites.

3.7.3 PCR “full nested” para Detecção dos Alelos de Microssatélites

A amplificação de microssatélites do DNA do *T. cruzi* presentes no sangue e nos tecidos dos animais infectados foi realizada diretamente desses materiais biológicos, utilizando um protocolo de PCR denominado “full nested”. Esse método consiste em uma etapa inicial de amplificação empregando os iniciadores externos para cada loco estudado, seguida de uma PCR que utiliza o produto da primeira amplificação como DNA molde para ser amplificado pelos iniciadores internos (Tabela V). Na primeira amplificação foram utilizados 12µL da mistura de reação composta de 10mM Tris-HCl/pH 9,0; 50mM KCl; 0,1% de Triton X-100 (Tampão B, Promega, Madison, WI, EUA); 2,5mM de MgCl₂ (Promega, Madison, WI, EUA); 250µM de cada dNTP (Sigma, Sto. Louis, MO, EUA); 0,3µM de cada iniciador externo (ALPHA DNA, Montreal, Quebec, Canadá – Tabela V) e 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA); acrescidos 1,5µL da amostra e 20µL de óleo mineral. Na segunda amplificação foram utilizados 10% do volume de reação obtido na etapa anterior e a mistura da reação foi semelhante à descrita acima, com exceção dos iniciadores. Nessa etapa, foram empregados iniciadores internos para cada loco de microssatélite na concentração de 0,3µM (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Os ciclos de amplificação da PCR em ambas as etapas e a determinação dos alelos de microssatélites foram realizados segundo o protocolo “stepdown” descrito no item 3.7.1.2.2 e a metodologia descrita no item 3.7.1.2.3, respectivamente.



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



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

4. RESULTADOS

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

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

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

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

4.1 Parasitemia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

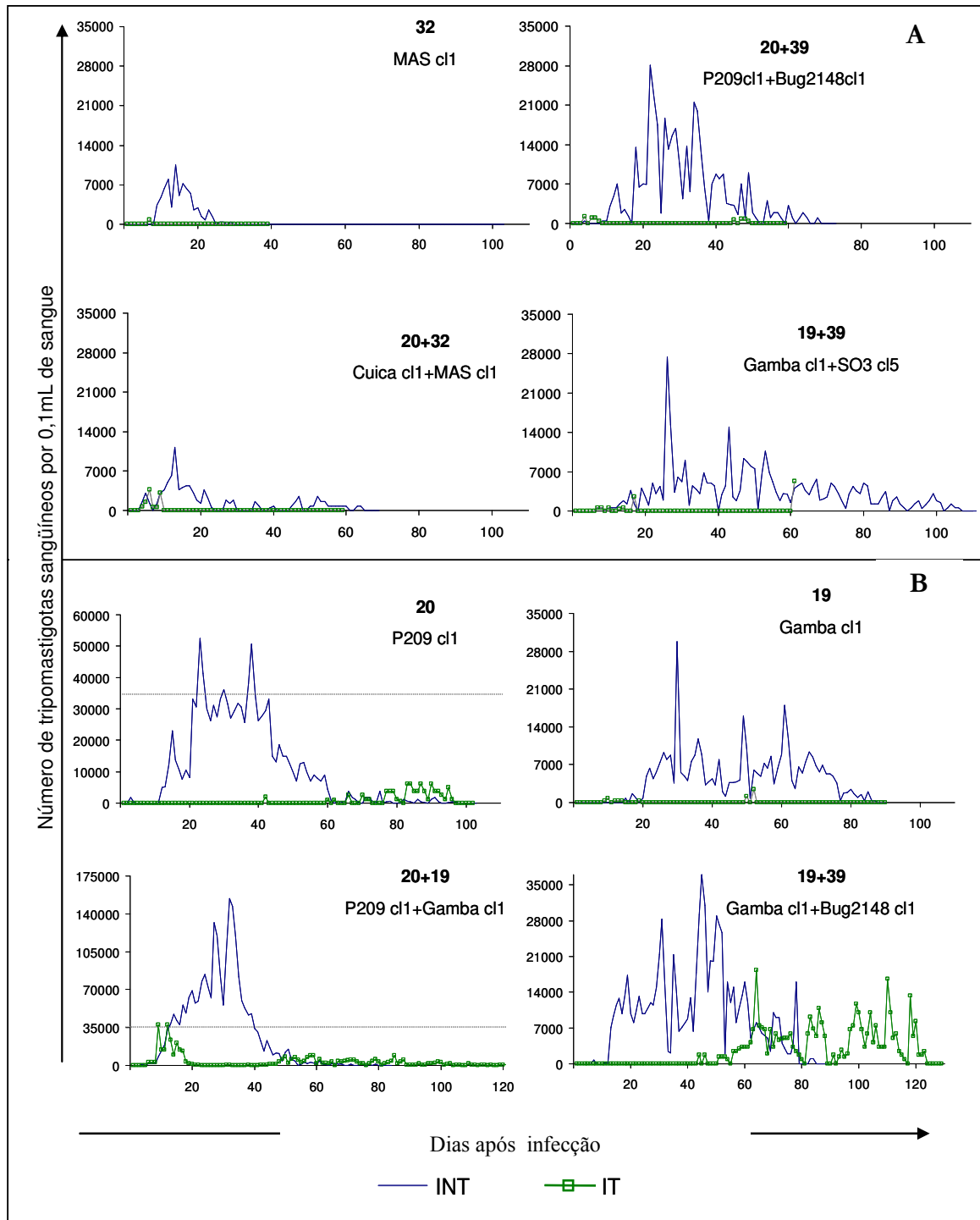


Figura 2. Perfis representativos de curvas de parasitemia média obtidos em monoinfeções e infecções mistas por clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais em que o tratamento com benznidazol reduziu significativamente os níveis de parasitemia (A) e em que ocorreu reativação da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

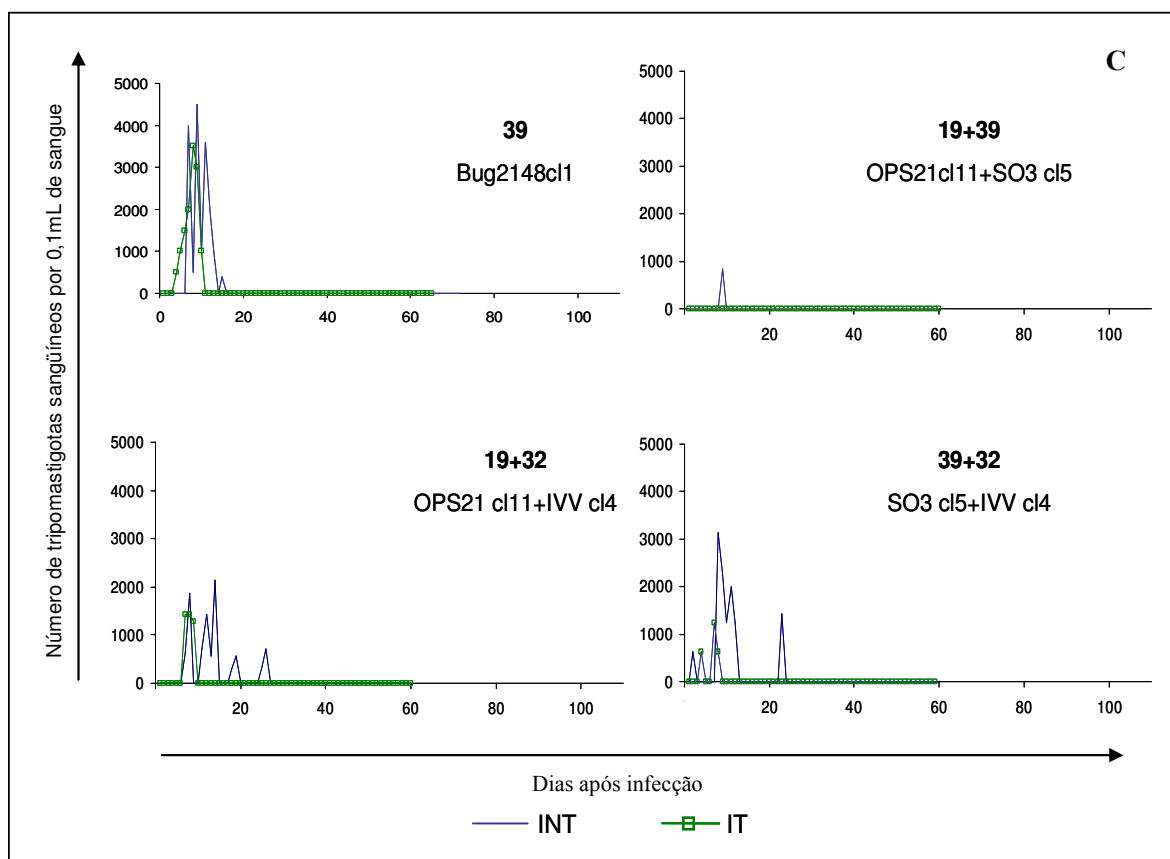


Figura 2C (continuação). Perfis representivos de curvas de parasitemia média obtidos em monoinfecções e infecções mistas por clones do *Trypanosoma cruzi* pertencentes aos genótipos principais em que o tratamento com Benzonidazol não reduziu significativamente os níveis parasitêmicos.

4.2 Mortalidade

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

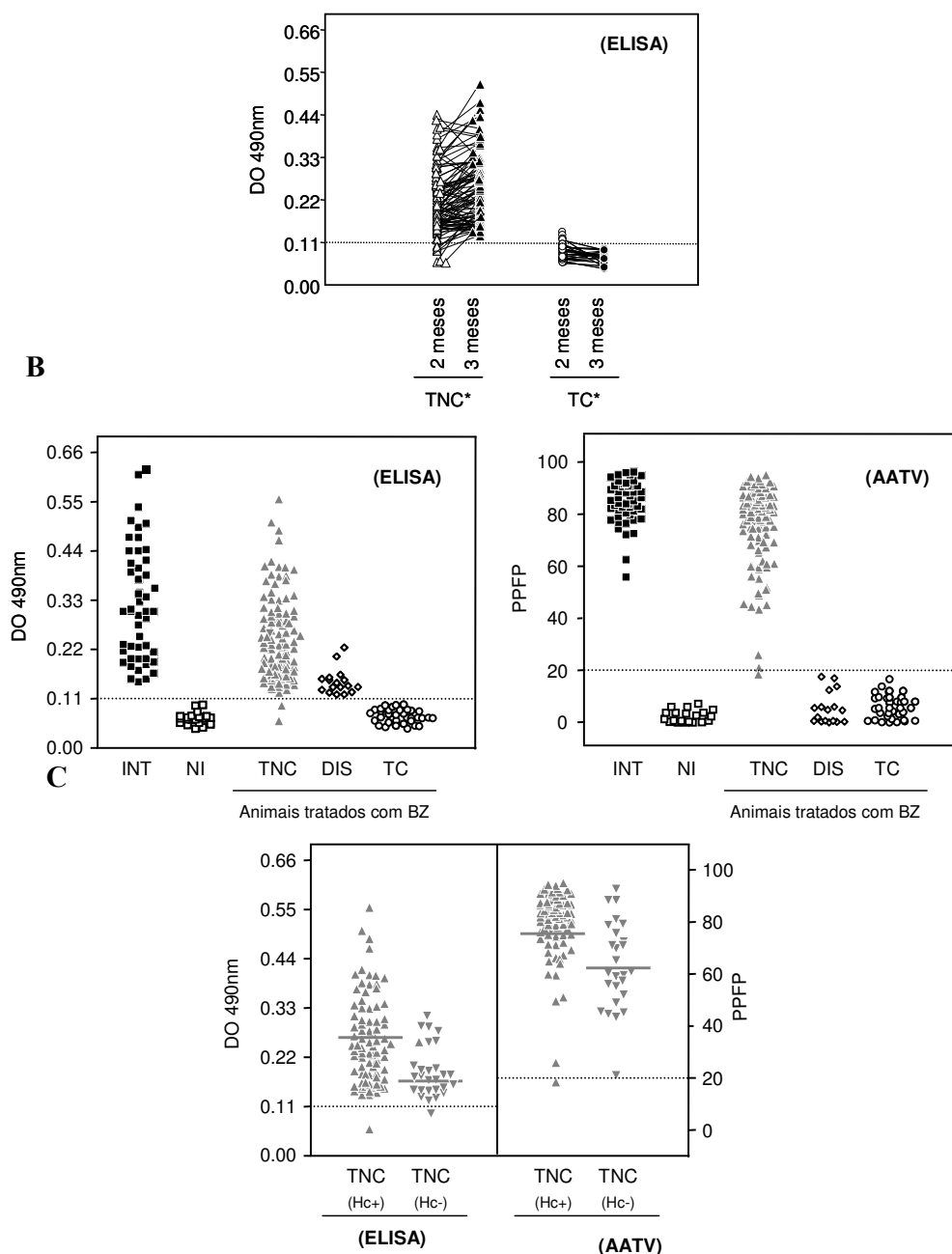


Figura 3. Perfil sorológico de camundongos BALB/c infectados com diferentes clones e combinações dos genótipos principais do *Trypanosoma cruzi*, classificados como Infectado Não Tratado (INT = ■), Não Infectado (NI=□), Tratado Não curado (TNC=▲), Dissociado (DIS=◇) e Tratado Curado (TC=●), com base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

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

ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: setlin

STACK:

1