

VANJA MARIA VELOSO

**Doença de Chagas experimental em cães da
raça *Beagle*: avaliação clínica, parasitológica,
histopatológica e molecular.**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia
Belo Horizonte, MG
2007**

VANJA MARIA VELOSO

**Doença de Chagas experimental em cães da raça
Beagle: avaliação clínica, parasitológica,
histopatológica e molecular.**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Parasitologia,
Departamento de Parasitologia da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para obtenção do
grau de doutor em Ciências.*

Orientador: Prof. Egler Chiari
Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG

Co-orientadora: Profa. Maria Terezinha Bahia
Departamento de Parasitologia, DECBI/ICEB/UFOP

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte, MG
2007

VANJA MARIA VELOSO

**Doença de Chagas experimental em cães da raça
Beagle: avaliação clínica, parasitológica,
histopatológica e molecular.**

COLABORADORES

Profa. Lúcia Maria da Cunha Galvão

Depto Parasitologia/ICB/UFMG

Prof. Marcelo Vidigal Caliari

Depto Patologia/ICB/UFMG

Profa. Cláudia Martins Carneiro

Profa. Marta de Lana

Depto Análises Clínicas/Escola de Farmácia/UFOP

VANJA MARIA VELOSO

Os experimentos desta tese foram desenvolvidos em colaboração entre o Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do 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).

Artigo enviado para publicação:

Veloso VM, Guedes PMM, Andrade IM, Caldas IS, Machado-Coelho GLL, Lana M, Galvão LMC, Bahia MT, Chiari E.(2007). *Trypanosoma cruzi*: kinetic of blood parasitism and its correlation with intensity of heart parasitism during long-term infection of Beagle dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*

Ao meu marido Ariosvaldo, que tem me ensinado o verdadeiro significado de companheirismo e amizade, sem você não saberia como enfrentar tantas adversidades. E aos meus filhos Iara e Iuri que são para mim a motivação de todo meu esforço, amo vocês.

Ao meu querido pai, onde você estiver, tenho certeza que está feliz, dedico a você todas as minhas realizações. A minha mãe exemplo de garra e dedicação à família, sempre pronta para ajudar.

Aos meus irmãos, Valéria, Vanderval e Viviane e meus cunhados Eduardo e Meire pelo apoio e pela força que vocês me dão. Sempre disponíveis para me ajudar.

Aos meus sobrinhos queridos, Ana Lara, Fádua, Antônia e Lino, vocês alegam a minha vida, são muito fofos.

Ao Prof. Egler Chiari por aceitar a proposta deste trabalho, me acolher em seu laboratório e pelo apoio e crença em minha capacidade para realizar esta tarefa tão difícil. Obrigada.

À Prof.^a Maria Terezinha Bahia, agradeço pela co-orientação e pela disponibilidade. Devo a você grande parte do meu aprendizado sobre o *T. cruzi* e a doença de Chagas. Gostaria de expressar minha gratidão pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Prof. Washington Luiz Tafuri, Estudar a doença de Chagas significa estudar sua história. Sempre nos remetemos a Carlos Chagas, a Zigman Brener, a Emanuel Dias, a Egler Chiari e ao Tafuri. Obrigada professor.

À Prof.^a Marta de Lana, obrigada pela amizade e pela força para que eu continue neste caminho que foi iniciado pelo seu incentivo e entusiasmo.

À Prof.^a Cláudia Martins Carneiro, agradeço a imensa contribuição na análise histopatológica. Obrigada pela força que você sempre me deu. De uma maneira geral você foi muito importante na realização deste trabalho, obrigada de coração.

À Prof.^a Lúcia Galvão pelas facilidades oferecidas em seu Laboratório e pela grande generosidade em me ajudar.

Ao Prof Alexandre Barbosa, pelo carinho e amizade.

À Prof.^a Raquel Machado, pelo exemplo de vida e incentivo.

Ao Prof. Marcelo Caliari, ainda temos muito o que trabalhar juntos. Obrigada

Prof. André Talvani, pela simpatia e generosidade. Obrigada.

Prof. George Luiz L. Machado-Coelho, obrigada pela realização das análises estatísticas.

Ao Paulo Marcos da Matta Guedes, nunca vou me esquecer das horas agradáveis que convivemos, seja no laboratório, no biotério ou no canil, só posso dizer que foi muito legal!!! Você tem futuro, torço por você.

Ao Ivo Caldas, foi muito bom conviver com você, não vou me esquecer das brincadeiras e das piadinhas contadas por você.

Helen Martins Rodrigues, é nos caminhos tortuosos da vida que encontramos grandes amigos. Obrigada por tudo.

Daniela D'Avila, Antônia Cláudia e Helder Valadares, grandes amigos, sempre disponíveis, obrigada pelo apoio, pela ajuda na execução das técnicas de biologia molecular. Sem vocês não sei como teria sido os meus dias em BH.

Aos colegas da turma do Bico pela agradável convivência, vocês são lindos.

Afonsinho, obrigada pelo seu sorriso, pela boa vontade em me ajudar.

Orlando, convivemos pouco, mas foi muito agradável. Obrigada.

Isabel Mayer, minha primeira orientanda, obrigada pela grande ajuda na realização da PCR.

Geovan, Livia Diniz, Jaqueline, Lílian, Girley, Rodrigo, Arnaldo, e demais alunos de iniciação científica, conviver com vocês é rejuvenecer cada dia, obrigada pela alegria que vocês exalam.

Aos bons amigos Dani, Fabiane e Sérgio foi muito agradável trabalhar com vocês.

Ao Sheler M. Souza e Rodolfo Giunchetti, pela ajuda e simpatia que vocês transmitem.

As minhas colegas técnicas, Maria Chaves e Ana Salome Mendes, sempre prontas para me ajudar, obrigada.

Aos meus amigos do biotério: Cristina, Rosário, Selma, José Henrique, Cláudio, Marcos e Jorginho, bons momentos passamos juntos.

À Cida, pela simpatia que você transmite.

À Sumara, pessoa generosa, amiga e solidária, grande exemplo de dedicação e profissionalismo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, na pessoa do Prof. Linard, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Departamento de Ciências Biológicas ICEB/UFOP obrigada pela liberação para que eu pudesse concretizar esta jornada.

Ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas ICEB/UFOP e seus professores.

A Rosaly Senra, obrigada pela agradável e divertida hospedagem, valeu pelo apoio!

A todos que direta ou indiretamente participaram deste projeto.

RESUMO

Vários aspectos da história natural da doença de Chagas foram avaliados em cães *Beagle*, experimentalmente infectados com três cepas do *Trypanosoma cruzi*, com características biológicas e genéticas distintas. Para isso, 34 cães foram inoculados com 2000 ou 4000 tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas, Be-78, Y ou ABC do *T. cruzi*/kg de peso corporal. Os animais foram avaliados clinicamente durante as fases aguda e crônica da infecção e a permanência do parasito no sangue e nos tecidos desses animais foi monitorada, ao longo de 24 meses, por meio de exames parasitológicos, moleculares e imuno-histoquímico. Além de ter sido avaliada a sensibilidade das técnicas utilizadas, a positividade dos testes parasitológicos foi relacionada com a positividade da PCR em tecidos cardíacos. As alterações histopatológicas foram avaliadas pela análise semi-quantitativa da presença de infiltrado de células adiposas, inflamação e fibrose em fragmentos do coração. Além disso, os parasitos isolados na fase aguda e crônica foram avaliados geneticamente por quatro marcadores moleculares distintos.

A avaliação clínica dos animais, durante a fase aguda da infecção, mostrou alterações clínicas discretas. Nos animais inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC, o exame de sangue a fresco (ESF) apresentou 86% (19/22) de positividade. Entretanto, a frequência de testes positivos foi variável entre os animais inoculados com essas cepas. Durante a fase crônica da infecção foram realizadas 88 hemoculturas (Hc) em 22 animais, sendo observado uma taxa de positividade de 46,6% (41/88). A frequência de testes positivos, na fase crônica da infecção foi similar entre os animais inoculados com as cepas Be-78 (75%) e ABC (62,5%), e significativamente menor (6,2%) naqueles inoculados com a cepa Y. Durante a fase crônica da infecção a taxa de positividade da PCR foi de 72,7% (64/88), superior a da Hc. Nos testes de PCR realizados no sangue dos animais inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC a positividade foi de 94,4%, 41,6% e 93,7%, respectivamente. O *T. cruzi* foi demonstrado, pela análise imuno-histoquímica (IMH), nos fragmentos cardíacos de todos os animais avaliados durante a fase aguda da infecção, porém, na fase crônica foi negativa em todos os fragmentos analisados. Entretanto, a presença do parasito foi demonstrada, na fase crônica da infecção, em todos os animais infectados com as três cepas, por meio da PCR. O parasitismo tecidual médio avaliado na fase crônica, pela PCR, em seis fragmentos cardíacos, foi semelhante entre os animais inoculados com as diferentes cepas. Porém, o padrão histopatológico das lesões cardíacas, observado na fase crônica, foi relacionado com a cepa do *T. cruzi*. Os resultados das avaliações realizadas nos animais inoculados com 2000 TS foram similares aos inoculados com 4000 TS.

A caracterização molecular dos isolados do *T. cruzi* obtidos de todos os cães infectados foi realizada na fase aguda (30 dias após a inoculação) e na fase crônica (até 24 meses após a inoculação). O perfil eletroforético de isoenzima foi idêntico entre as cepas parentais Be-78 ou ABC e seus respectivos isolados. Entretanto, o perfil de isoenzima da cepa Y pode ser alterado durante a fase crônica da infecção de cães, sendo esta mudança acompanhada pela alteração nos perfis de RAPD e DNA mitocondrial (CO II). O fenograma construído pela UPGMA permitiu separar as cepas Be-78, Y e ABC e os respectivos isolados em dois grupos distintos, correspondendo a *T. cruzi* II e *T. cruzi* III ou híbrido.

Os dados obtidos pelo rDNA mostraram perfil do grupo 1 (*T. cruzi* II) para todas as cepas parentais e seus isolados. Entretanto, o DNA mitocondrial (CO II) mostrou perfil de *T. cruzi* II para as cepas Be-78 e Y e de *T. cruzi* III ou híbrido para dois isolados da cepa Y e para a cepa ABC e seus isolados.

Esses dados demonstraram que a cepa do *T. cruzi* exerce um papel importante no curso da história natural da doença de Chagas em cães e reforçam a importância da presença do parasito na formação/gênese das lesões cardíacas, cujo padrão histopatológico estaria relacionado especialmente com a população do *T. cruzi* presente nos tecidos.

ABSTRACT

Several aspects of the natural history of Chagas disease were evaluated in *Beagle* dogs experimentally infected with three *Trypanosoma cruzi* strains with distinct biological and genetic characteristics. With this purpose 34 dogs were inoculated with 2,000 or 4,000 blood trypomastigotes from Be-78, Y and ABC *T. cruzi* strains/kg of body weight. Animals were clinically evaluated during the acute and chronic phases of the infection and the presence of the parasite in the blood and tissues checked throughout 24 months by parasitological, molecular and immuno-histochemistry examinations. Besides the evaluation of the sensibility of these techniques used, the positivity of the parasitological tests (fresh blood examinations, hemoculture and immuno-histochemistry) were compared with the of PCR positivity in hearth tissues. The histopathological alterations were evaluated by the semi-quantitative analysis of the presence of fatty tissue, inflammation and fibrosis in heart fragments. Moreover, parasites isolated from dogs during the acute and chronic phases of the infection were evaluated by four distinct molecular markers.

The clinical evaluation of the animals, during the acute phase of infection, revealed discreet alterations. The fresh blood examination (FBE) presented positivity in 86% (19/22) of the animals inoculated with Be-78, Y or ABC strains. However, the frequency of positive FBE tests was variable among animals inoculated with the three strains. A total of 88 hemocultures were performed during the chronic phase and 46.6% (41/88) were positive. This positivity was similar between animals inoculated with Be-78 (75%) and ABC (62.5%) strains and significantly higher than the observed in dogs inoculated with Y (6.2%) strain. PCR positivity was 72.7% (64/88), significantly higher than the observed in hemoculture. The positivity of PCR was 94.4% in animals infected with Be-78 strain, 93.7% in dogs infected with ABC strain and 41.6% in those inoculated with the Y strain. The parasite presence was demonstrated by immuno-histochemistry (IMH) examination in the cardiac fragments of animals evaluated in the acute phase of the infection. By the way, during the chronic phase the IMH was negative in all dogs. However, the parasite was detected by PCR in heart tissue in all animals 24 months after inoculation. The frequency of positive PCR in six cardiac fragments was similar among animals inoculated with the three strains. The histopathologic pattern of the cardiac lesions in the chronic phase was related with the *T. cruzi* strain. The results of all parameters evaluated were similar in dogs inoculated with 4,000 or 2,000 BT.

The molecular characterization of the *T. cruzi* isolates obtained of all infected dogs was performed in the acute (30 days after infection) and in the chronic phase (24 months after infection). The profiles of MLEE were the same among the parental Be-78 and ABC strains and theirs respective isolates. On the other hand, changes of MLEE profiles were observed in *T. cruzi* populations isolated from dogs inoculated with Y strain and the parental strain. These alterations were also in the RAPD profiles and mitochondrial DNA (COII). The phenogram constructed by the UPGMA showed two major groups correspondent to *T. cruzi* II and *T. cruzi* III or hybrid group. Data obtained by rDNA showed profiles of lineage 1 (*T. cruzi* II) for all parental strains and theirs isolates. The mitochondrial DNA (COII) showed profiles of

T. cruzi II for Be-78 and Y strains and their respective isolates, III or hybrid profiles of *T. cruzi* for two isolates from the Y and ABC strains and their isolates.

Data suggest that *T. cruzi* strain has an important role in the course of the natural history of Chagas disease in dog model and reinforce/strengthen the importance of the parasite on the genesis of the cardiac lesions. Apparently the histopathologic pattern of the lesions was related with *T. cruzi* population present in the tissues.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1- <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	1
1.2- DOENÇA DE CHAGAS HUMANA	2
1.3- DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA.....	3
1.4- RELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DO PARASITISMO E DAS LESÕES TECIDUAIS.....	5
1.5- VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA	8
1.6- O CÃO COMO MODELO EXPERIMENTAL	13
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1- OBJETIVO GERAL.....	19
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
5. MATERIAL e MÉTODOS.....	21
5.1- CEPAS DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	21
5.2- ANIMAIS	21
5.2.1 - Inoculação dos animais.....	21
5.2.2 - Necropsia e coleta do material	22
5.3- EXAMES CLÍNICOS (SINAIS CLÍNICOS, TEMPERATURA RETAL E VARIAÇÃO DE PESO CORPORAL).....	22
5.4- AVALIAÇÃO DO PARASITISMO SANGÜÍNEO E TECIDUAL	23
5.4.1- Exame de sangue a fresco	23
5.4.2- Hemocultura.....	23
5.4.3- Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	24
5.4.3.1- Coleta das amostras de sangue e de tecido cardíaco	24
5.4.3.1.1- Amostras de sangue.....	24
5.4.3.1.2- Amostras de tecidos cardíacos.....	24
5.4.3.2- Extração do DNA	24
5.4.3.2.1- Amostras de sangue (Extração fenólica)	24
5.4.3.2.2- Amostras de tecidos cardíacos (Método da Lise Alcalina seguido de Extração fenólica)	25
5.4.3.3- Amplificação do fragmento de 330pb (Amostras de sangue e fragmentos de tecido cardíaco)	25
5.4.4- Análise imuno-histoquímica (IMH)	26
5.5- AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS DO CORAÇÃO POR MEIO DAS TÉCNICAS DE HEMATOXILINA-EOSINA E TRICRÔMICO DE MASSON	27
5.5.1- Preparação dos cortes histológicos.....	27
5.5.2- Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)	28
5.5.3- Técnica de Tricrômico de Masson	28
5.6- AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DOS ISOLADOS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> OBTIDOS DE CÃES INOCULADOS COM AS CEPAS BE-78, Y OU ABC PELAS TÉCNICAS DE ISOENZIMAS, RAPD, rDNA, E DO GENE MITOCONDRIAL CO II.....	29
5.6.1- Perfil eletroforético de isoenzimas (Zimodema).....	29
5.6.2- Caracterização molecular (RAPD, rDNA, gene mitocondrial CO II).....	29
5.6.2.1- Extração do DNA	29
5.6.2.2- RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).....	30
5.6.2.3- Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α	31
5.6.2.4- PCR - gene Mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II (CO II).....	31
5.7- ANÁLISE DOS DADOS.....	32
6. RESULTADOS.....	34
6.1- DADOS CLÍNICOS DOS CÃES AVALIADOS DURANTE 24 MESES APÓS A INFECÇÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	34

6.2- PARASITISMO SANGÜÍNEO	36
6.2.1- Exame de Sangue a Fresco.....	36
6.2.2- Hemocultura.....	37
6.2.3- Reação em Cadeia da Polimerase	44
6.2.4- Comparação entre os resultados obtidos pelas técnicas de hemocultura (Hc) e PCR.	47
6.3- PARASITISMO TECIDUAL	49
6.3.1- PCR em tecidos cardíacos	49
6.3.2- Avaliação do parasitismo cardíaco por meio da reação de imuno-histoquímica (IMH) anti- <i>T. cruzi</i>	52
6.3.3- Comparação entre os resultados obtidos pela Hemocultura, PCR em amostras de sangue e de tecidos cardíacos (24 meses após a inoculação).....	56
6.4- AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS DO CORAÇÃO POR MEIO DAS TÉCNICAS DE HEMATOXILINA-EOSINA (HE) E DE TRICRÔMICO DE MASSON	58
6.4.1. Fase aguda.....	58
6.4.2. Fase crônica	66
6.5- AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE INTRAESPECÍFICA DOS ISOLADOS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> DE CÃES INOCULADOS COM AS CEPAS Be-78, Y OU ABC PELAS TÉCNICAS DE ISOENZIMAS, RAPD, rDNA, E GENE MITOCONDRIAL CO II	72
6.5.1- Análise do perfil eletroforético de isoenzimas (Zimodema).....	72
6.5.2- Perfil de RAPD	75
6.5.3- Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α	80
6.5.4- PCR gene Mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II (CO II).....	81
7. DISCUSSÃO	83
7.1- Sinais e sintomas observados em cães infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	83
7.2- Parasitismo sangüíneo e tecidual	84
7.3- Aspectos histopatológicos	92
7.4- Caracterização molecular	97
7.4.1. Cepa Be-78.....	98
7.4.2. Cepa Y.....	100
7.4.3. Cepa ABC	102
8. CONCLUSÕES	104
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gel de poliacrilamida 6% representativo de amostras amplificadas pela PCR do kDNA do *Trypanosoma cruzi* realizada em amostras de sangue de cães *Beagle* (Bg) infectados experimentalmente com 4000 formas tripomastigotas sangüíneas (TS) da cepa Y durante as fases aguda e crônica da infecção.....46

Figura 2 – Gel de poliacrilamida 6% com os perfis dos produtos da PCR específica realizada com os iniciadores S35 e S36 em tecidos do coração de cães *Beagle* (Bg) infectados experimentalmente com 2000 formas tripomastigotas sangüíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, pela via intraperitoneal. Os fragmentos do coração foram obtidos após a necropsia realizada na fase crônica da infecção (24 meses). A banda de 330pb corresponde a amplificação do kDNA do parasito.51

Figura 3 – Fotomicrografias do miocárdio de cães *Beagle* infectados com 4000 formas tripomastigotas sangüíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi* e eutanasiados na fase aguda. *Parasitismo*: A: ninhos de amastigotas ou amastigotas isoladas (setas) com ausência de processo inflamatório; B: processo inflamatório intenso e ausência de parasitismo; C: processo inflamatório moderado e amastigotas isoladas; D: amastigotas isoladas e discreto processo inflamatório; E: ninho de amastigotas próximo a foco inflamatório; F: ninho de amastigotas no contexto de um foco inflamatório; G: ninho de amastigotas e ausência de inflamação; H e I: amastigotas isoladas e inflamação em torno. Imuno-histoquímica Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP). A, B e C: X 160; E: X300; D, F, G, H e I: X1000.....55

Figura 4 – Fotomicrografias padrão do miocárdio de cães *Beagle* controle e infectados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. A: presença de células adiposas com distribuição periférica, observada principalmente nos átrios e células adiposas distribuídas de forma: B: discreta, C: moderada e D: intensa, no contexto do processo inflamatório. Hematoxilina-Eosina. A, B e C: X600; D: X160.60

Figura 5 – Fotomicrografias padrão do miocárdio de cães *Beagle* controle e infectados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. A: Miocárdio normal; B: com processo inflamatório discreto constituído predominantemente por células mononucleadas, C: moderado e D: intenso. Hematoxilina-Eosina, X600.62

Figura 6 – Fotomicrografias padrão do miocárdio de cães *Beagle* controle e infectados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. A: Padrão de distribuição de colágeno considerado normal observado em azul escassamente distribuído em torno dos vasos e entre as fibras cardíacas,; B: aumento discreto, C: moderado e D: intenso. Tricrômico de Masson, X160; “insert”: X600.64

Figura 7 – Fotomicrografias representativas do miocárdio de cães *Beagle* infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase crônica. (A) Cepa Be-78: foco inflamatório perivascular, Hematoxilina-Eosina, X600; (B) Cepa Y: fibrose, Tricrômico de Masson, X600; (C) Cepa ABC: degeneração hialina, Hematoxilina-Eosina, X600.68

Figura 8 – Perfil eletroforético da enzima GPI, para as cepas parentais: (A) Be-78 - 2000 TS, (B) Be-78 - 4000 TS, (C) Y - 2000 TS e 4000 TS e (D) ABC - 4000 TS do *Trypanosoma cruzi* e dos respectivos isolados de cães *Beagle*, experimentalmente inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou 2000 TS. Os isolados foram obtidos na fase aguda (30 dias após a inoculação) e na fase crônica (entre 9 e 24M após a inoculação).74

Figura 9 – Gel de poliacrilamida 5% com os perfis de RAPD obtidos com o iniciador (λ gt-11F) determinados para as cepas parentais Be-78, Y e ABC do *Trypanosoma cruzi* e para os respectivos isolados de cães *Beagle* (Bg), inoculados com 4000 ou 2000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS). Os isolados foram obtidos na fase aguda (30 dias (D) após a inoculação) e na fase crônica (entre 9 a 24 meses (M) após a inoculação).75

Figura 10 – Fenograma correspondente aos perfis de RAPD, obtidos com os iniciadores (M-13, 3302, λ gt-11F e λ gt-11R), das cepas Be-78, Y e ABC do *Trypanosoma cruzi* e dos respectivos isolados de cães *Beagle* (Bg), inoculados com 4000 ou 2000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS). Os isolados foram obtidos na fase aguda (30 dias (D) após a inoculação) e na fase crônica (entre 9 a 24 meses (M) após a inoculação).77

Figura 11 – Gel de poliacrilamida 6% representativo da amplificação, pela PCR, da região 3' do gene rDNA 24 S α das cepas parentais Be-78, Y e ABC do *Trypanosoma cruzi* e dos respectivos isolados de cães *Beagle* (Bg), inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) dessas cepas. Populações do *T. cruzi* utilizadas: cepa Be-78 e o isolado Bg 8(24M); cepa Y e o isolado Bg 15(21M); cepa ABC e o isolado Bg 20(24M).80

Figura 12 – Gel de poliacrilamida 6%, mostrando os padrões de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) gerados a partir de produtos amplificados por PCR do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II das cepas parentais Be-78, Y e ABC do *Trypanosoma cruzi* e dos respectivos isolados de cães *Beagle* (Bg), inoculados com 4000 e 2000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) dessas cepas, depois da digestão enzimática empregando *AluI*. Os isolados foram obtidos na fase aguda (30 dias (D) após a inoculação) e na fase crônica (entre 9 a 24 meses (M) após a inoculação).82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados dos exames de sangue a fresco realizados durante a fase aguda da infecção de 22 cães <i>Beagle</i> inoculados com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
Tabela 2 – Resultados das hemoculturas realizadas durante a fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> em cães <i>Beagle</i> inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y.....	39
Tabela 3 – Classificação dos 22 cães da raça <i>Beagle</i> infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> , avaliados durante 24 meses de infecção, de acordo com o nível parasitêmico.....	43
Tabela 4 – Resultados das reações de PCR realizadas durante a fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> em cães <i>Beagle</i> inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y.....	45
Tabela 5 – Comparação entre os resultados das hemoculturas (Hc) e das PCR em amostras de sangue (S-PCR) realizadas durante as fases aguda e crônica da infecção de 12 cães <i>Beagle</i> inoculados com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
Tabela 6 – Comparação entre os resultados das hemoculturas (Hc) e das PCR em amostras de sangue (S-PCR) realizadas durante as fases aguda e crônica da infecção de 18 cães <i>Beagle</i> inoculados com 4000 ou 2000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78 ou Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
Tabela 7 – Resultados das reações de PCR realizadas em diferentes áreas cardíacas (átrios e ventrículos direito e esquerdo, septo interventricular e ponta) de cães <i>Beagle</i> infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e eutanasiados após 24 meses da inoculação.....	50
Tabela 8 – Distribuição da positividade da técnica de imuno-histoquímica, realizada nos diferentes fragmentos cardíacos de cães infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do <i>Trypanosoma cruzi</i> , durante a fase aguda da infecção.....	52
Tabela 9 – Distribuição da intensidade do parasitismo tecidual, observado após a realização da técnica de imuno-histoquímica, nos diferentes fragmentos cardíacos de cães inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do <i>Trypanosoma cruzi</i> , durante a fase aguda da infecção.....	54

Tabela 10 – Comparação entre os resultados obtidos pela hemocultura (Hc), PCR em amostras de sangue (S-PCR) e tecidos (T-PCR) realizados após 24 meses da inoculação de 12 cães <i>Beagle</i> com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC.	57
Tabela 11 – Perfis de Zimodemas apresentados pelas cepas Be-78, Y e ABC e pelas populações isoladas de cães experimentalmente infectados com 4000 ou 2000 TS do <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
Tabela 12 – Compartilhamento de bandas das assinaturas gênicas (RAPD) obtidas utilizando quatro iniciadores (λ gt-11F, λ gt-11R, 3302, M-13) nas amostras de DNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> isoladas de cães inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC. Avaliação inter-grupo (Be-78 x Y, Be-78 x ABC, Y x ABC).....	78
Tabela 13 – Compartilhamento de bandas das assinaturas gênicas (RAPD) obtidas utilizando quatro iniciadores (λ gt-11F, λ gt-11R, 3302, M-13) nas amostras de DNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> isoladas de cães inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC. Avaliação intra-grupo (Be-78 x Be-78, Y x Y e ABC x ABC).....	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise comparativa da variação de peso registrada após: A) 30 dias e B) 24 meses da inoculação de 24 cães *Beagle* com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, e dos oito controles não-infectados. No gráfico A, os dados circulados em vermelho representam os animais avaliados por 24 meses também mostrados em B.35

Gráfico 2 – Percentagem cumulativa da positividade das hemoculturas realizadas durante a fase crônica da infecção em cães da raça *Beagle*, inoculados experimentalmente com 4000 ou 2000 Tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*.39

Gráfico 3 – Percentagem cumulativa da positividade dos tubos contendo leucócitos e hemácias, realizados em 22 cães *Beagle* inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi* e avaliados por 24 meses..40

Gráfico 4 – Frequência de tubos e de hemoculturas positivas realizadas durante a fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em cães *Beagle* inoculados com (A) 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC, ou com (B) 2000 TS das cepas Be-78 ou Y.42

Gráfico 6 – Comparação entre os resultados obtidos pela hemocultura (Hc), PCR em amostras de sangue (S-PCR) e tecidos (T-PCR) realizados após 24 meses da infecção de 12 cães *Beagle* com 4000 tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC, ou 10 cães *Beagle* inoculados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y.57

Gráfico 7 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram presença de infiltrado de células adiposas nos diferentes fragmentos do coração, A: grupos controle e B, C e D: infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase aguda da infecção.61

Gráfico 8 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram processo inflamatório nos diferentes fragmentos do coração, A: grupos controle e B, C e D: infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase aguda da infecção.63

Gráfico 9 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram presença de colágeno nos diferentes fragmentos do coração, A: grupos controle e B, C e D: infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase aguda da infecção.65

Gráfico 10 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram processo inflamatório nos diferentes fragmentos do coração, (A) grupos controle e (B), (C) e (D) infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase crônica da infecção.69

Gráfico 11 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram fibrose nos diferentes fragmentos do coração, (A) grupos controle e (B), (C) e (D) infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase crônica da infecção.....70

Gráfico 12 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram presença de infiltrado de células adiposas, inflamação e fibrose nos diferentes fragmentos do coração dos animais infectados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi*. Os animais foram eutanasiados na fase crônica da infecção.71

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Átrio Direito
AE	Átrio Esquerdo
Be-78	Cepa Berenice-78
Bg	<i>Beagle</i>
caCD4	Anticorpo monoclonal (IgG) anti-CD4 canino
caCD8	Anticorpo monoclonal (IgG) anti-CD8 canino
CO II	Citocromo oxidase subunidade II
CNI	Controle não infectado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
D	Dias após a infecção
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ESF	Exame de sangue a fresco
FA	Fase aguda
FC	Fase crônica
HE	Hematoxilina-Eosina
Hc	Hemocultura
kDNA	DNA do cinetoplasto
LSSP-PCR	<i>Low-Stringency Single Specific Primer</i> PCR
LMCo	Lise mediada pelo complemento
LIT	Liver infusion tryptose
M	Meses após a infecção
mitCOII	Gene mitochondrial Citocromo Oxidase subunidade II
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PTA	Ponta do coração
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic</i> DNA
rDNA	gene ribossômico 24S α
S-PCR	Reação em cadeia da polimerase em amostras de Sangue
TCD4 ⁺	Linfócito T auxiliar
TCD8 ⁺	Linfócito T citotóxico

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
T-PCR	Reação em cadeia da polimerase em amostras de Tecido
TS	Tripomastigota sanguíneo
SI	Septo Interventricular
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
VI	Via Intraperitoneal

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1- *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (CHAGAS, 1909), agente etiológico da doença de Chagas, ocorre na natureza como uma população heterogênea e complexa (DVORAK, 1984; TIBAYRENC, 2003). É um protozoário flagelado da Ordem Kinetoplastida, caracterizado por ter uma região especializada na matriz de sua mitocôndria única, denominada de cinetoplasto. O cinetoplasto é composto de duas classes de moléculas de DNA circulares (maxicírculos e minicírculos), que estão concatenadas e condensadas em uma estrutura em forma de disco, e é responsável por aproximadamente 20-25% do DNA celular (SIMPSON, 1972; STUART, 1983). Os maxicírculos são funcionalmente equivalentes ao DNA mitocondrial de outros eucariotas e contem genes que codificam proteínas envolvidas na respiração celular. A população de minicírculo é altamente variável entre as cepas permitindo a diferenciação de cepas altamente relacionadas (SANCHEZ *et al.*, 1984; WESTENBERGER *et al.*, 2006).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é alternado entre hospedeiros invertebrados e vertebrados de diversas ordens, caracterizando os diferentes ciclos epidemiológicos da doença: doméstico, peridoméstico e silvestre. O ciclo silvestre envolve a interação entre hospedeiros invertebrados (triatomíneos) e vertebrados (marsupiais, carnívoros, roedores, primatas, mamíferos silvestres dentre outros animais), em ecótopos naturais do continente americano (DIAS, 1992; FERNANDES *et al.*, 1998). Os ciclos doméstico e peridoméstico são resultantes do contato entre o homem e o vetor, como consequência de modificações sociais e ecológicas provocadas pelo próprio homem, permitindo assim a colonização de ecótopos artificiais pelos triatomíneos (DIAS, 1992). A caracterização molecular de isolados do parasito de diferentes hospedeiros dos ciclos doméstico e silvestre no Brasil tem demonstrado que estes ciclos podem ocorrer de maneira independente, podendo algumas vezes se sobrepor (MILES *et al.*, 1977; MILES & CIBULSKIS, 1986; SOUTO *et al.*, 1996; ZINGALES *et al.*, 1998).

O *T. cruzi* é transmitido ao hospedeiro vertebrado, em condições naturais, estritamente por insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae, os quais albergam em seu intestino posterior as formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas juntamente com as fezes e urina do inseto durante e após o repasto sangüíneo. Essa forma evolutiva infecta o hospedeiro vertebrado, dentre eles o homem, por contaminação de lesões de pele ou mucosa intacta. Esse parasito pode ser transmitido também, por transfusão sangüínea (DIAS & BRENER, 1984), transmissão congênita (CHAGAS, 1911; BITTENCOURT, 1984; AZOGUE *et al.*, 1985), acidente de laboratório (BRENER, 1984), transplante de órgãos e por via oral (CHOCAIR *et al.*, 1984; MARCONDES *et al.*, 1991; DIAS, 2006). Uma vez o indivíduo infectado, estabelece-se uma relação entre o hospedeiro e o parasito que pode durar por toda a vida, embora dados clínicos, parasitológicos e sorológicos sugestivos de autocura em humanos já tenham sido relatados por Zeledón *et al.* (1988) na Costa Rica e, mais recentemente, por Francolino *et al.* (2003) no Uruguai.

1.2- Doença de Chagas humana

A doença de Chagas humana é uma enfermidade com características peculiares, sendo caracterizada por uma fase aguda (FA) geralmente assintomática. Nos casos sintomáticos podem ser observados febre, edema, enfartamento ganglionar e sinais da porta de entrada dos parasitos (sinal de Romaña e chagoma de inoculação), além de apresentarem miocardite severa ou envolvimento neurológico, principalmente, em crianças menores de dois anos de idade (BRENER, 1992). A fase aguda corresponde a um período de parasitemia patente, no qual o parasito é encontrado com facilidade no sangue periférico e nos tecidos. Na maioria dos casos agudos, os sintomas desaparecem espontaneamente, sendo acompanhados da recuperação da miocardite (BRENER, 1987).

A maioria dos indivíduos sobrevive à fase aguda e evolui para a fase crônica (FC) permanecendo infectados por toda vida. Essa fase é caracterizada por um curso clínico variável, desde ausência de sintomas até uma doença severa com envolvimento cardíaco e/ou gastrointestinal. A forma crônica

indeterminada é mais freqüente, sendo caracterizada pela ausência de sintomas e de alterações eletrocardiográficas e/ou radiológicas. Um processo inflamatório progressivo pode levar a destruição do músculo cardíaco e da inervação autônoma, culminando nas formas sintomáticas da doença (BRENER, 1994). A patologia cardíaca é caracterizada pela miocardite crônica, que freqüentemente leva à cardiomegalia, à insuficiência cardíaca congestiva e às arritmias (TANOWITZ *et al.*, 1992). As formas digestivas apresentam dilatação do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e/ou megacólon). No coração, ocorrem principalmente, fibrose e destruição de células do miocárdio (PALACIOS-PRU *et al.*, 1989) e, no esôfago e cólon, é observado com maior intensidade, degeneração neuronal com denervação (KÖBERLE, 1968). Na fase crônica, a parasitemia e o parasitismo tecidual são reduzidos e de difícil detecção.

1.3- Diagnóstico parasitológico da doença de Chagas humana

Diferentes abordagens têm sido utilizadas no diagnóstico da doença de Chagas. Testes sorológicos são utilizados regularmente para detectar anticorpos anti-*T. cruzi*. Esses testes possuem alta sensibilidade, no entanto, a ocorrência de resultados falso-positivos devido à reação cruzada antigênica com outros agentes infecciosos como *Leishmania* e *Trypanosoma rangeli* é frequentemente relatada (MARCON *et al.*, 2002). Além disso, a ocorrência de resultados positivos de hemocultura e PCR tem sido demonstrada em pacientes com testes sorológicos persistentemente negativos (ÁVILA *et al.*, 1993; GOMES *et al.*, 1999; CASTRO *et al.*, 2002). Esses dados reforçam a importância dos testes parasitológicos no diagnóstico da doença de Chagas, especialmente naqueles pacientes com sorologia duvidosa. Entretanto, a maioria dos dados na literatura tem demonstrado sensibilidade variável dos métodos parasitológicos tais como xenodiagnóstico e hemocultura (PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003). A positividade desses métodos é bastante variável em indivíduos de áreas geográficas distintas e grande esforço tem sido feito para aumentar a sensibilidade dessas técnicas (CHIARI *et al.*, 1989; LUZ *et al.*, 1994). A realização de testes seriados aumenta a positividade proporcionalmente ao número de exames realizados (LUQUETTI & RASSI,

2000; PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003). Entretanto, já foi demonstrado, que alguns pacientes chagásicos não apresentam xenodiagnóstico e hemocultura positivos mesmo quando realizados seriadamente (CASTRO *et al.*, 1999; CASTRO *et al.*, 2002; 2006), enquanto outros, apresentam testes repetidamente positivos (CASTRO *et al.*, 1999).

Recentemente, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vem sendo utilizada para a detecção de DNA do *T. cruzi* em amostras de sangue de pacientes chagásicos, sendo recomendada como técnica complementar de diagnóstico devido a sua maior sensibilidade em relação aos métodos convencionais (DIAZ *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 1998b; BRITTO *et al.*, 2001). Porém, de maneira similar aos testes de xenodiagnóstico e hemocultura, os resultados obtidos por esta técnica, também são bastante variáveis. Estudos realizados por diferentes autores têm mostrado variação de 45% a 100% na sensibilidade da PCR em sangue de pacientes chagásicos crônicos quando comparada aos testes sorológicos, xenodiagnóstico ou hemocultura (ÁVILA *et al.*, 1993; WINCKER *et al.*, 1994; GOMES *et al.*, 1998b; CHIARAMONTE *et al.*, 1999). Essas diferenças parecem depender dos iniciadores utilizados, do volume de sangue coletado, da origem geográfica da população estudada, faixa etária, níveis parasitêmicos e também das características genéticas das cepas do parasito (CASTRO *et al.*, 2002).

Em relação à variabilidade nos níveis parasitêmicos, podem-se citar como exemplo, as observações realizadas por Borges-Pereira *et al.* (1996). Estes autores observaram que pacientes chagásicos oriundos de Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil, apresentavam níveis parasitêmicos, avaliados por xenodiagnóstico, mais altos quando comparados com os de indivíduos de outras áreas geográficas. Além disso, tem sido observada uma correlação entre os resultados dos exames parasitológicos e da PCR. Desta maneira, foi observado que pacientes de Virgem da Lapa, MG apresentaram uma positividade de xenodiagnóstico (43%) e PCR (96,5% a 100%) maior (BORGES-PEREIRA *et al.*, 1985; WINCKER *et al.*, 1994; ÁVILA *et al.*, 1993), quando comparada com a positividade destes testes realizados em pacientes da Paraíba, Brasil, onde somente 13% dos pacientes avaliados tiveram xenodiagnóstico positivo e 45% a 59.4% PCR positiva (BORGES-PEREIRA & COURA, 1987; BRITTO *et al.*,

1995; JUNQUEIRA *et al.*, 1996). Esses dados mostraram níveis de parasitemia bastante variáveis em indivíduos de diferentes áreas endêmicas (PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003). Uma questão que surge dessas observações seria relacionada a uma possível correlação entre os níveis de parasitemia detectados no sangue periférico e os níveis de parasitismo tecidual, que poderiam estar relacionados à patogênese da doença de Chagas crônica.

1.4- Relação entre a intensidade do parasitismo e das lesões teciduais

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* penetram nas células nucleadas dos hospedeiros vertebrados e se transformam em formas amastigotas que multiplicam no citoplasma das mesmas. Esse aspecto essencial do ciclo de vida do *T. cruzi* resulta em um relacionamento íntimo e prolongado entre o hospedeiro e o parasito, podendo gerar reações imunopatológicas complexas.

Os processos patológicos gerados têm sido associados, desde a descoberta da doença de Chagas, à presença de infiltrados inflamatórios focais ou difusos, acompanhados de necrose ou fibrose, destruição de células não parasitadas e escassez ou ausência do parasito, sugerindo o envolvimento de reações de hipersensibilidade (VIANNA, 1911; CHAGAS, 1934; HIGUCHI *et al.*, 1993a; HIGUCHI *et al.*, 1997) ou de mecanismos auto-ímmunes (SCHMUÑIS, 1987, GIRONÈS & FRESNO, 2003). Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar o processo de formação das lesões cardíacas, como por exemplo, o resultado de reações de auto-ímmunidade envolvendo auto-anticorpos ou linfócitos T auto-reativos derivados do mimetismo molecular entre epitopos antigênicos do parasito e do hospedeiro, ou a ativação *bystander* que não envolve antígenos do parasito e sim antígenos procedentes de lesões teciduais (ANSELMINI *et al.*, 1966; COSSIO *et al.*, 1974; TEIXEIRA *et al.*, 1978; LEON *et al.*, 2001; KIERSZENBAUM, 1999). Essas hipóteses são corroboradas pelas observações de que os parasitos são escassos na fase crônica da doença, contrastando com a severidade das lesões cardíacas encontradas em grande número de pacientes chagásicos (GIRONÈS & FRESNO, 2003). Todavia, com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, capazes de detectar o parasito e/ou seus antígenos (ADAD *et al.*, 1991; HIGUCHI *et al.*, 1993a e b) ou

fragmentos do seu genoma em tecidos (JONES *et al.*, 1993; VAGO *et al.*, 1996a; AÑEZ *et al.*, 1999), a importância da participação do parasito como estimulador de processos envolvidos na gênese das lesões da fase crônica da doença de Chagas tem sido resgatada. Tarleton (2001) demonstrou que a redução dos parasitos com o tratamento específico, diminui a intensidade das lesões, enquanto o seu aumento, induzido por imunossupressão, exacerba as manifestações clínicas. A presença do parasito associada principalmente, às lesões no tecido cardíaco foi encontrada em 94,7% de pacientes chagásicos com cardiopatia grave, em amostras adjacentes aos focos inflamatórios (JONES *et al.*, 1993). Lages-Silva (2001) demonstrou uma elevada frequência (98%) do parasito, tanto no sangue como no tecido esofágico de pacientes portadores de megaesôfago, associada principalmente com as formas avançadas, demonstrando a importância do parasito como indutor dos processos patológicos. Na maioria dos casos, não é possível fazer uma correlação entre a intensidade da lesão e a quantidade de antígeno e/ou DNA do *T. cruzi*, sugerindo que o parasito pode ser responsável pelo desencadeamento e manutenção do processo de patogênese no miocárdio, e que este seria amplificado por mecanismos auto-ímmunes que dependeriam da predisposição genética do hospedeiro (GIRONÈS & FRESNO, 2003; AÑEZ *et al.*, 1999; BELLOTTI *et al.*, 1996; HIGUCHI, 1995; JONES *et al.*, 1993).

Neste contexto, a identificação de fatores intrínsecos do hospedeiro responsáveis pelos mecanismos de formação de lesão cardíaca na doença de Chagas é de grande importância e tem sido amplamente investigada (HIGUCHI *et al.*, 1993b; TARLETON *et al.*, 1994; REIS *et al.*, 1997; CALIARI, 2001). A idade, o sexo e a constituição genética do hospedeiro são fatores que podem influenciar no perfil da resposta imunológica e, conseqüentemente, na determinação dos mecanismos de proteção contra o *T. cruzi*. A resposta imune do hospedeiro tem um papel fundamental no controle da multiplicação do parasito durante as fases aguda e crônica da doença. Além disso, vários mecanismos dependentes do hospedeiro podem estar envolvidos no processo de distribuição tecidual diferenciado do *T. cruzi* e conseqüentemente, na formação de lesões cardíacas e/ou digestivas na doença de Chagas. Russo *et al.* (1996) observaram que camundongos tratados com anticorpo monoclonal, anti-CD4

e/ou anti-CD8, apresentam um controle do parasitismo no coração, dependente de células T CD4+. No fígado, essa proteção foi relacionada a células T CD4+ e T CD8+ sugerindo que o tropismo tecidual poderia ser determinado pelas subpopulações de linfócito T. Andrade *et al.* (2002) estudaram o papel da genética do hospedeiro na distribuição tecidual de populações clonais do *T. cruzi*. Foram comparadas infecções experimentais em camundongos das linhagens BALB/c, DBA-2, C57BL/6 e SWISS com o clone Col1.7G2 e a cepa monoclonal JG. Os autores demonstraram uma distribuição do parasito diferenciada para BALB/c e DBA-2 versus C57BL/6 e SWISS indicando a importância da genética do hospedeiro no padrão de distribuição tecidual na infecção pelo *T. cruzi*.

Por outro lado, vários estudos têm demonstrado que o *T. cruzi* apresenta uma estrutura multiclonal, ou seja, suas populações poderiam ser compostas por diferentes clones (MOREL *et al.*, 1980; DEANE *et al.*, 1984; MACEDO *et al.*, 1992; VELOSO *et al.*, 2005) cujas propriedades biológicas e bioquímicas determinariam o tropismo tecidual diferenciado na evolução das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Brener (1977) e Melo & Brener (1978), estudaram o tropismo tecidual em camundongos inoculados com diferentes cepas (Y, Berenice, ABC e CL) e demonstraram parasitismo preferencial para dois sistemas de células: fagocitárias do baço, fígado e medula óssea; e células musculares lisa, esquelética e cardíaca. Tais autores postularam que o tropismo poderia ser influenciado pela interação entre diferentes componentes da membrana ou receptores do parasito e da célula hospedeira. Posteriormente, Vago *et al.* (1996b; 2000) avaliaram o tropismo tecidual por meio da técnica de LSSP-PCR (*Low Stringency Single Specific Primer PCR*) (PENA *et al.*, 1994), diretamente no tecido do coração e do esôfago, obtido durante a necropsia de 15 pacientes chagásicos crônicos. Desta maneira, foi demonstrada que a caracterização das populações do *T. cruzi*, presentes nos tecidos do coração e do esôfago, apresentou diferentes perfis de assinaturas gênicas nestes órgãos, sugerindo que a variabilidade genética do parasito pode determinar diferentes tropismos (VAGO *et al.*, 1996b; 2000), com conseqüente impacto na evolução das diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Por outro lado, Lages-Silva

(2001) demonstrou uma identidade dos perfis de LSSP-PCR das populações do parasito isoladas por hemocultura e/ou pelo vetor de um mesmo paciente. Esses perfis foram altamente representativos das populações sanguíneas e/ou teciduais, não sendo possível sugerir correlações entre os padrões de assinatura gênica encontrados e os diferentes tropismos.

Assim, a detecção do parasito ao longo da infecção é importante não somente para demonstrar sua presença, como também, para caracterizá-lo, uma vez que já é bem estabelecido que o *T. cruzi* apresenta uma grande variabilidade genética e essa pode estar correlacionada às suas propriedades clínicas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997; FILARDI & BRENER, 1987; TOLEDO *et al.*, 2003).

1.5- Variabilidade intraespecífica

A ampla variabilidade intraespecífica observada no *T. cruzi* é provável ser resultante do seu modo de reprodução predominantemente clonal (TIBAYRENC & AYALA, 1988; 2002), o que leva esse parasito a evoluir de forma independente em áreas geográficas isoladas, a acumular mutações e a adquirir características próprias. Alguns autores têm fornecido evidências de que eventos de hibridização ou de troca genética podem ocorrer, o que também poderia contribuir para a diversidade observada em suas populações (BOGLIOLO *et al.*, 1996; CARRASCO *et al.*, 1996; HIGO *et al.*, 2000; BRISSE *et al.*, 2003; STURM *et al.*, 2003, FREITAS *et al.*, 2006).

A heterogeneidade intraespecífica foi observada desde os primeiros estudos, realizados por Chagas (1909), sendo demonstrado um dimorfismo das formas tripomastigotas sanguínea. Os trabalhos sobre a morfologia desse protozoário foram ampliados por Brener & Chiari (1963) que estudaram diferentes isolados do parasito obtidos de diversas procedências. Os autores agruparam esses isolados em três grupos, de acordo com a predominância de formas tripomastigotas sanguíneas delgadas, largas e muito largas. Posteriormente, Brener (1965; 1969) verificou que essas diferenças morfológicas poderiam ser correlacionadas ao curso clínico da infecção experimental de camundongos. As formas delgadas penetravam mais

rapidamente nas células do hospedeiro e essas eram mais susceptíveis aos mecanismos imunes; enquanto, as formas largas persistiam por um tempo maior no sangue periférico, sendo, portanto, mais resistentes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro. (BRENER, 1969). Guedes *et al.* (2007), observaram que a cepa Y possuía 91% de formas finas, enquanto as cepas Be-78 e ABC possuíam respectivamente 90% e 84% de predomínio de formas largas. Essas características foram correlacionadas à infectividade dessas cepas em células VERO, sendo demonstrada alta taxa de infectividade para a cepa Y e intermediária para a cepa ABC.

Essas diferenças morfológicas, somada às outras características biológicas (virulência e patogenicidade para animais de laboratório, tropismo tecidual e nível de parasitismo sangüíneo) foram os parâmetros utilizados por Andrade (1974) e Andrade & Magalhães (1997), para agrupar populações do *T. cruzi* que apresentavam padrões de comportamento biológico semelhantes em três grupos distintos denominados de Biodemas (I, II e III).

Posteriormente, diferentes alvos foram utilizados para o desenvolvimento de metodologias bioquímicas e moleculares capazes de demonstrar a variabilidade genética do *T. cruzi*. Dessa maneira, a caracterização de populações do *T. cruzi* passou a ser realizada tanto pela expressão fenotípica como pelo estudo do seu genoma. A eletroforese de isoenzimas permite demonstrar diferenças na estrutura primária de uma enzima mesmo entre indivíduos de uma mesma população. Os perfis eletroforéticos são expressões fenotípicas e podem ser atribuídos às diferenças genéticas do parasito (ROMANHA, 1982). Diferenças isoenzimáticas entre amostras do *T. cruzi* foram observadas pela primeira vez por Toyé (1974) utilizando as enzimas ASAT e ALAT. Posteriormente, Godfrey (1976) observou diferenças no perfil isoenzimático entre amostras do *T. cruzi* recém isoladas e amostras mantidas por um período de tempo prolongado em laboratório, sugerindo ter havido uma seleção clonal.

Miles *et al.* (1977; 1978) definiram três grupos enzimáticos ao caracterizar 17 amostras do *T. cruzi* isoladas da região de São Felipe, Bahia e seis amostras obtidas de casos agudos da doença de Chagas autóctones do estado do Pará. As amostras obtidas do ciclo doméstico foram classificadas

como Zimodema 2 (Z2) e as do ciclo silvestre, como Z1. Posteriormente, Romanha (1982), utilizou oito enzimas, para caracterizar diversas amostras do *T. cruzi* obtidas de vários hospedeiros da região de Bambuí, MG. Foram definidos quatro zimodemas (ZA, ZB, ZC, ZD), sendo Z2 e ZA similares. A ampliação do número de enzimas analisadas permitiu identificar um número maior de zimodemas. Desse modo, foram encontrados 43 zimodemas, utilizando 15 locus enzimáticos na caracterização de 154 isolados do *T. cruzi*, obtidos de diferentes hospedeiros, de diversos países endêmicos (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1988).

Mattei *et al.* (1977) demonstraram, pela primeira vez, variabilidade do tamanho de fragmentos do kDNA, gerados pela digestão com endonucleases de restrição (RFLP), em diferentes cepas do *T. cruzi*. Trabalhos posteriores, realizados por Morel & Simpson (1980) utilizando essa técnica, demonstraram diferentes perfis eletroforéticos para as cepas Y e CL, sendo estes perfis de banda cepas-específicos, denominados de esquizodemas. Por meio da utilização da técnica de análise do padrão restrição do kDNA, Morel *et al.* (1980) demonstraram que uma única cepa do *T. cruzi* poderia conter dois ou mais genótipos clonais distintos. A existência de cepas policlonais do *T. cruzi* foi confirmada posteriormente por vários grupos de pesquisadores, usando diferentes metodologias (DEANE *et al.*, 1984; MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988; CARNEIRO *et al.*, 1991; MACEDO *et al.*, 1992; TIBAYRENC & AYALA, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1998; 1999). Sturm *et al.* (1989), simplificaram a técnica RFLP, onde a digestão do kDNA foi realizada diretamente no fragmento de 330 pares de bases (pb) gerado pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esse fragmento contém as regiões variáveis do minicírculo do kDNA.

Outras técnicas moleculares têm sido utilizadas na caracterização genética de populações do *T. cruzi*. Na análise do DNA nuclear, a utilização de sondas multilocais, isoladas de mini-satélites humanos (DNA *fingerprinting*), permitiram demonstrar um poder de discriminação entre cepas e clones de *T. cruzi* semelhante ao esquizodema (MACEDO *et al.*, 1992). Com a crescente evolução das técnicas de biologia molecular, diferentes metodologias fundamentadas na PCR surgem a cada dia. A amplificação por PCR

empregando um único iniciador de seqüência aleatória capaz de ligar em sítios dispersos do genoma gerando fragmentos de DNA de tamanho e intensidade variáveis e padrões polimórficos de bandas, foi denominada de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*). Essa técnica representa uma alternativa mais simples em relação às técnicas que necessitam de informações prévias de seqüências de DNA para o desenho de iniciadores. As informações obtidas podem ser utilizadas como marcadores de genética de populações e de relações filogenéticas (TIBAYRENC *et al.*, 1993; STEINDEL *et al.*, 1993; FERNANDES *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1998a; STURM *et al.*, 2003).

O uso de marcadores, derivados de seqüências gênicas conservadas, permitiu o agrupamento das populações do *T. cruzi* em dois grandes grupos principais. Iniciadores específicos, desenhados para amplificar a região 3' do gene rRNA 24S α , mostraram o polimorfismo do tamanho do produto de amplificação entre cepas e isolados do parasito (SOUTO & ZINGALES, 1993). A partir deste resultado, os autores propuseram a classificação do *T. cruzi* em dois grupos: grupo 1, que apresenta o fragmento de 125pb, e o grupo 2 que apresenta o fragmento de 110pb. Com o aumento do número de amostras foi observada a existência de um grupo de cepas que apresenta as duas bandas do produto de amplificação da região 3' do gene rDNA 24S α , sendo denominado grupo 1/2 (SOUTO *et al.*, 1996).

Através da comparação de variações dos produtos de amplificação do mini-exon, de diferentes cepas do *T. cruzi*, também foi possível agrupar cepas e isolados do parasito em dois grupos. As cepas que apresentaram um produto de 300pb foram designadas como pertencentes ao grupo 1 (ou linhagem genética 1) e aquelas que apresentaram um produto de 350pb foram designadas como pertencentes ao grupo 2 (ou linhagem 2). Os autores encontraram uma excelente correlação entre a classificação fundamentada no rRNA e no mini-exon (SOUTO *et al.*, 1996).

Diante de tantas classificações, realizadas por diferentes pesquisadores, utilizando marcadores biológicos, bioquímicos e moleculares, tornou-se necessário a utilização de uma nomenclatura comum para a classificação intraespecífica desse parasito. Desta maneira, em 1999 no Simpósio Internacional realizado no Rio de Janeiro para comemorar os 90 anos da

descoberta da doença de Chagas ficou estabelecido em consenso a divisão do *T. cruzi* em dois grupos principais denominados de *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. As cepas híbridas e aquelas com caracterização incerta foram denominadas apenas *T. cruzi* até a realização de novos estudos (ANONYMOUS, 1999).

Atualmente, vários genes que codificam proteínas e rRNA mitocondriais, localizados nos maxicírculos do kDNA, têm sido utilizados como alvos para o estudo da estrutura e evolução de populações do *T. cruzi*. (WESTENBERGER *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2006). Esses marcadores têm permitido identificar variações intraespecíficas neste protozoário. Freitas *et al.* (2006) utilizando estes marcadores mitocondriais, sugeriram a existência de um terceiro grupo ancestral denominado *T. cruzi* III, o qual por eventos de hibridização com *T. cruzi* II teria resultado nos isolados de caráter híbrido, que são observados atualmente. Desta maneira, a população de *T. cruzi* apresentaria a seguinte subdivisão em TcI, TcII, TcIII e híbridos.

Um dos objetivos de caracterizar populações do *T. cruzi* está na necessidade de obter algum tipo de correlação entre as propriedades biológicas e genéticas do parasito e as manifestações clínicas da doença. Dessa maneira, a variabilidade intraespecífica do *T. cruzi* tem sido estudada também por meio de técnicas capazes de detectar sua presença ou fragmentos de seu DNA diretamente do sangue ou dos tecidos infectados. A técnica de LSSP-PCR foi a primeira capaz de detectar a variabilidade do kDNA do *T. cruzi* diretamente de tecidos (VAGO *et al.*, 1996b; 2000). Outra abordagem para caracterizar o *T. cruzi* diretamente de amostras biológicas surgiu com a utilização da técnica de análise de microssatélites. A principal estratégia para analisar o polimorfismo dos microssatélites é a amplificação pela PCR utilizando um par de iniciadores específicos flanqueando o seguimento que contém as repetições (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Entretanto, os estudos realizados até o momento ainda não permitiram vislumbrar uma associação entre a genética do parasito e as formas clínicas da doença.

Devido a diferentes razões, dentre elas as éticas, a maioria dos estudos realizados em humanos, além de apresentar limitações, inicia-se após vários anos de infecção. São poucos os estudos longitudinais da parasitemia nessa doença e a maioria utiliza o xenodiagnóstico clássico (CASTRO *et al.*, 2005). A

correlação entre os níveis de parasitemia e o parasitismo tecidual em humanos, bem como os padrões patológicos das lesões cardíacas torna-se difícil de ser avaliada. Desse modo, a utilização de um modelo experimental que reproduza com maior fidelidade a doença de Chagas humana e que apresenta homogeneidade genética é necessário para a melhor compreensão de vários aspectos relacionados à interação parasito/hospedeiro.

1.6- O cão como modelo experimental

O cão tem sido empregado como modelo experimental desde o descobrimento desta enfermidade (CHAGAS, 1909). Diversos autores já reproduziram as fases aguda e crônica da infecção nesses animais. (ANDRADE, 1984; ANDRADE *et al.*, 1984; LANA *et al.*, 1988).

Dados de diferentes autores mostraram que cães experimentalmente infectados reproduziram cardiopatia chagásica crônica muito semelhante às lesões desenvolvidas em humanos (PELLEGRINO, 1947; LARANJA, 1953; KÖBERLE, 1958). Laranja *et al.* (1949) descreveram a fase crônica da infecção em cães inoculados com sangue de pacientes chagásicos ou com fezes de triatomíneos, com um quadro clínico-patológico e alterações eletrocardiográficas superponíveis às observadas no homem, tanto na fase aguda como crônica da infecção. Posteriormente, Anselmi *et al.* (1965) observaram 74,2% de positividade nos exames de sangue a fresco realizado em 72 cães jovens inoculados com uma cepa virulenta obtida de um caso agudo humano da doença de Chagas. Nesse experimento, não foi observada correlação entre a intensidade do parasitismo e as alterações histopatológicas.

Em estudos posteriores, vários autores testaram diferentes condições experimentais no modelo cão. Marsden & Hagstrom (1968) inocularam 11 cães *Beagle* jovens com inóculos variando de 2×10^3 a 93×10^7 formas tripomastigotas obtidas de cultura acelular, do vetor e sangüíneo, pelas vias subcutânea e conjuntival da cepa Peru. Entre os animais inoculados, apenas um, que recebeu o inóculo de 2×10^3 formas tripomastigotas do vetor, sobreviveu à fase aguda da infecção e nenhum dos inoculados com as formas de cultura se infectou. Provavelmente, a inoculação de animais com altos inóculos e cepas virulentas dificultavam a cronificação da doença. Assim, Andrade &

Andrade (1980) conseguiram induzir a infecção crônica sem utilizar o tratamento específico em apenas sete cães após inocular 40 animais com 4×10^5 a 6×10^5 formas tripomastigotas sanguíneos/animal das cepas 12SF e Colombiana. Os demais evoluíram para a fase crônica indeterminada mediante o uso de quimioterápicos e a maioria deles apresentou infiltrado inflamatório focal e rara fibrose no miocárdio e no sistema de condução. Os autores notaram alterações eletrocardiográficas superponíveis ao observado em humanos tanto na fase aguda como na fase crônica. Bambirra (1984) inoculou 21 cães jovens da raça *Pincher*, pela via intraperitoneal utilizando um inóculo menor (1000 tripomastigotas sanguíneos/Kg de peso corporal da cepa Colombiana). Esses animais desenvolveram a fase aguda com sinais clínicos superponíveis aos observados em humanos. Os animais que cronificaram permaneceram na forma indeterminada. Após oito e dezessete anos da inoculação, o parasito foi recuperado do sangue de dois desses animais por meio de xenodiagnóstico. Esses parasitos reisolados foram mantidos congelados em nitrogênio líquido e posteriormente estudados por Veloso (2000). Esse estudo revelou que a permanência da cepa Colombiana por um período de tempo prolongado (8 e 17 anos) em cães, conduziu de uma maneira geral, à redução da patogenicidade e da virulência destes parasitos para camundongos, sendo observada também uma correlação entre o tempo de infecção do cão e o grau de redução da virulência e patogenicidade da cepa Colombiana em camundongos.

Os cães apresentam vantagens sobre os outros modelos para o estudo de vários fatores envolvidos no relacionamento parasito/hospedeiro estabelecido durante a infecção. Dentre esses, o estudo das alterações eletrocardiográficas no modelo canino é muito útil, uma vez que aspectos básicos da fisiologia cardíaca e da morfologia de seu sistema de condução são muito conhecidos e bastante semelhantes ao do homem (LUMB *et al.*, 1959; MIROWSKI *et al.*, 1970). Assim, Magalhães & Freire (1945) inocularam 20 cães com idade variando de 15 a 30 dias, com uma cepa oriunda de triatomíneo capturado no município de Bambuí, MG. O eletrocardiograma avaliado na fase aguda e crônica da infecção apresentou alterações apenas em um animal na fase aguda revelando sinais de lesão do sistema de condução. Esses resultados contrastaram com os observados na avaliação histopatológica, onde se verificou

intenso parasitismo e lesões teciduais, que com freqüência destruíam as fibras cardíacas. Laranja *et al.* (1949) descreveram a fase crônica da infecção em cães inoculados com formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas detectando um quadro clínico-patológico com alterações eletrocardiográficas semelhantes às observadas em humanos. Posteriormente, Anselmi *et al.* (1967) estudaram a condução átrio ventricular de 13 cães naturalmente infectados com *T. cruzi* e que apresentavam alterações eletrocardiográficas indicativas de miocardite crônica. Os achados histopatológicos no nódulo átrio ventricular e no feixe de Hiss foram correlacionados com o período refratário de condução e com o tempo de condução no sistema de propagação AV. A condução tardia estava relacionada a processos inflamatórios e fibróticos localizados no feixe de Hiss. Andrade (1974) não encontrou correlação entre lesões e alterações eletrocardiográficas em material de cinco cães jovens que morreram durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Foi observado que o lado direito do coração (átrio e ventrículo) apresentava-se mais lesado.

Outros autores também já demonstraram que o modelo canino da doença de Chagas apresenta semelhanças nas alterações patológicas, imunológicas, parasitológicas e eletrocardiográficas observadas em pacientes chagásicos (ANSELMÍ *et al.*, 1967; ANDRADE *et al.*, 1981; 1984; LANA *et al.*, 1992; BAHIA *et al.*, 2002).

Köberle (1957) relatou o achado de megas em diversos segmentos do tubo digestivo de cães infectados naturalmente pelo *T. cruzi*. Okumura e Corrêa-Neto (1961) descreveram a forma digestiva da doença de Chagas no modelo canino, porém esses autores foram os únicos a relatar a forma digestiva da doença de Chagas no modelo canino, sendo que estes achados necessitam de maiores investigações.

Diante dos dados obtidos por diversos autores, o cão parece atender melhor os requisitos, para um modelo ideal estabelecidos pelo Comitê de Doença de Chagas do Programa Especial de Treinamento e Pesquisa de Doenças Parasitárias da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1984) por:

1. Permitir o isolamento do parasito ao longo do curso de infecção;
2. Apresentar reações sorológicas positivas indicativas da persistência da infecção;

3. Apresentar manifestações clínicas da doença de Chagas crônica;
4. Desenvolver miocardite, miosite e outras alterações patológicas que caracterizam a doença.
5. Induzir resposta imune contra tecido do hospedeiro.

Esse animal preenche a maioria dos requisitos citados acima de um modelo experimental adequado para o estudo da doença de Chagas. Além disso, pode ser somado à vantagem de utilizar-se o modelo cão, o fato de ser um animal de fácil manuseio e de sobreviver aproximadamente 15 a 20 anos. Devido a essas características o cão tem sido utilizado como modelo experimental no estudo da doença de Chagas em nosso laboratório desde a década de 80. Lana *et al.* (1988; 1992) reproduziram a cardiopatia chagásica crônica fibrosante difusa em cães, sem raça definida, inoculados com a cepa Be-78 do *T. cruzi* e eutanasiados entre 90 e 864 dias de infecção. Essa cepa apresentou baixa virulência e patogenicidade para camundongo quando comparada com a cepa Be-62, ambas isoladas da paciente Berenice (LANA, 1981; LANA & CHIARI, 1986). Ao contrário, foi demonstrada uma maior virulência e patogenicidade da cepa Be-78, em relação à cepa Be-62, quando o modelo experimental utilizado foi o cão (LANA *et al.*, 1988; 1992). Posteriormente, a diferença de patogenicidade foi verificada em estudos realizados por Bahia *et al.* (2002). Os autores observaram que a origem do inóculo (formas tripomastigotas sangüíneas ou metacíclicas) e a via de inoculação (conjuntival ou intraperitoneal) das formas infectantes das cepas Be-62 e Be-78 do *T. cruzi* em cães, sem raça definida, alteraram o curso da infecção chagásica canina. Todos os animais inoculados com a cepa Be-78 apresentaram miocardite aguda severa, e com a cepa Be-62, apenas os inoculados com formas tripomastigotas metacíclicas, pela via intraperitoneal, apresentaram lesões similares.

Posteriormente, Guedes *et al.* (2002) mostraram que o tratamento com benznidazol (Bz) foi capaz de prevenir a morte e induzir a cura parasitológica, em 68,75% dos cães infectados com as cepas Be-78, Y e Colombiana e tratados na FA da infecção; e 38,7% na FC. Esses índices de cura obtidos durante as fases aguda e crônica recente foram semelhantes aos relatados para humanos,

caracterizando o cão como um bom modelo para estudar a quimioterapia experimental na doença de Chagas.

Ainda utilizando o cão como modelo, Veloso *et al.* (2001) mostraram alterações no fenótipo de resistência ao Bz em duas populações do *T. cruzi* isoladas de cães infectados com a cepa Be-78, considerada 100% sensível a este quimioterápico. Essas variações em relação à suscetibilidade ao Bz, provavelmente ocorreram devido à permanência do parasito por um período prolongado (2 a 7 anos) nesses animais, podendo ser reflexo da plasticidade genética observada no parasito. Além disso, Veloso *et al.* (2005) isolaram quatro populações do *T. cruzi*, destes mesmos cães, com o objetivo de estudar o impacto da permanência do parasito, por um período prolongado, no hospedeiro vertebrado, sobre suas propriedades biológicas e genéticas. Os autores mostraram que a cepa Be-78 é policlonal, podendo apresentar pelo menos três subpopulações. Além dessas observações, foi mostrado que a permanência destes parasitos em cães, por diferentes períodos de tempo, e posteriormente, mantidas em camundongos, aparentemente alterou a dinâmica de suas subpopulações. Provavelmente, fatores relacionados ao hospedeiro exerceram influência sobre o parasito.

Nesta proposta, dando continuidade aos estudos realizados em cães, dentro da linha de pesquisa do laboratório, porém agora em cães da raça *Beagle*, a infecção experimental pelo *T. cruzi* foi avaliada sob vários aspectos da história natural da doença de Chagas. Diversas avaliações foram realizadas, ao longo de dois anos, centradas na cepa do parasito como fator importante nas alterações clínicas, parasitológicas, patológicas e moleculares.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que a doença de Chagas causada pelo *T. cruzi* é uma entidade polimórfica com participação e interação de fatores do parasito e do hospedeiro, o estudo das características genéticas de ambos poderá contribuir na melhor compreensão da patogênese e evolução da doença. Neste sentido, novas técnicas moleculares têm possibilitado acumular, cada vez mais, conhecimentos sobre a diversidade intraespecífica do *T. cruzi* no contexto da complexa relação parasito-hospedeiro estabelecida ao longo da infecção.

Considerando ainda, que na história natural da evolução da doença de Chagas as manifestações clínicas geralmente aparecem vários anos após a infecção, e que a maioria dos indivíduos infectados atualmente, encontra-se na fase crônica da infecção e devido a razões éticas, alguns procedimentos experimentais não podem ser realizados em humanos. Dessa maneira, torna-se necessário o estudo de vários fatores relacionados à doença de Chagas em animais que reproduzam os achados típicos de todo curso da infecção à semelhança daqueles descritos em humanos. Assim, o cão se destaca como um bom modelo experimental, uma vez que nesses animais têm sido reproduzida tanto a fase aguda como a fase crônica da infecção de maneira semelhante à descrita em humanos.

Por esta razão, a proposta deste trabalho é estudar em cães *Beagle* a influência da cepa do *T. cruzi* na evolução da doença de Chagas. Este modelo foi escolhido por ser geneticamente homogêneo e por apresentar parâmetros imunológicos, hematológicos e eletrocardiográficos dentre outros bem definidos, possibilitando assim, a obtenção de resultados mais homogêneos e reprodutivos.

3. OBJETIVOS

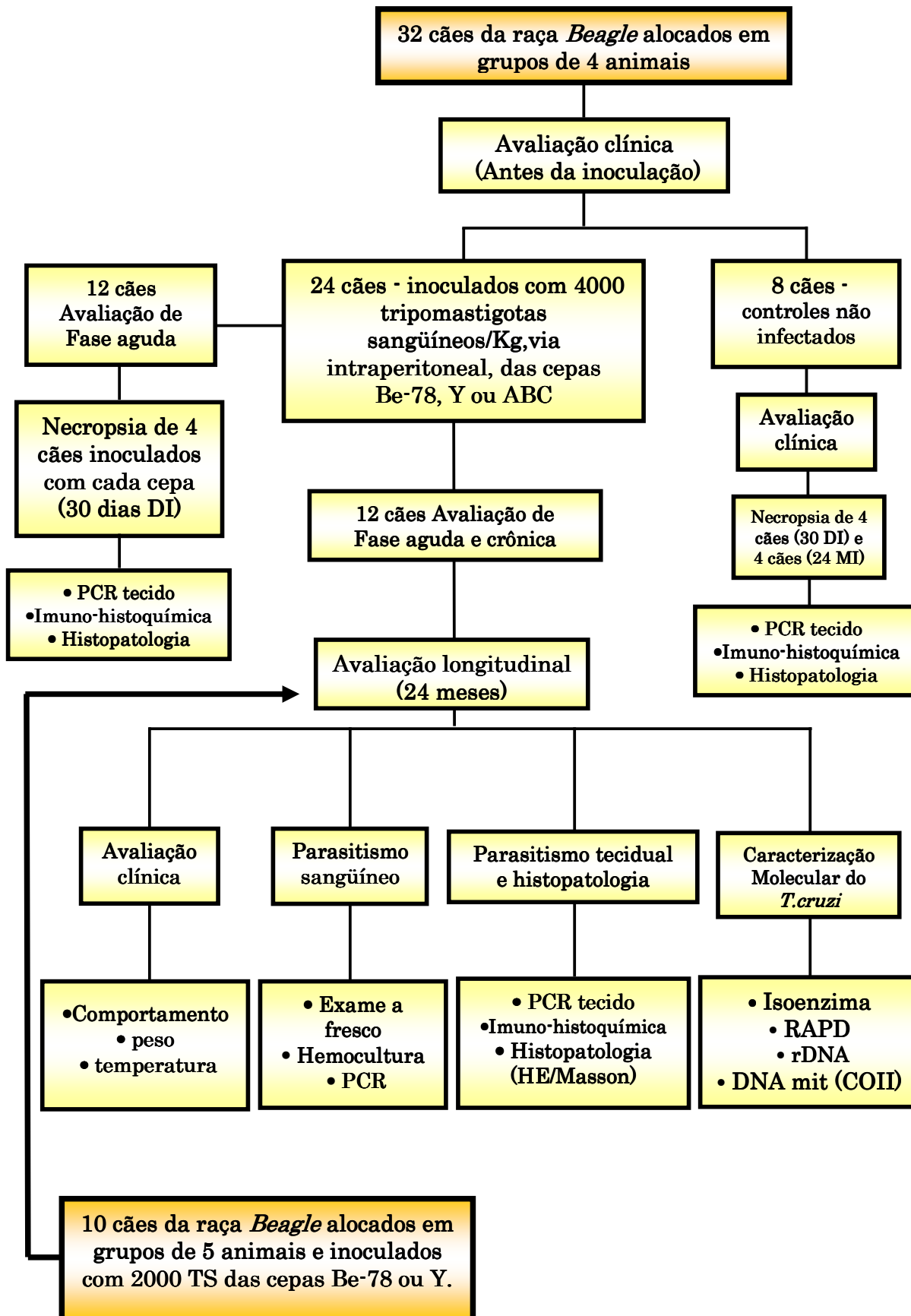
3.1- Objetivo geral

Avaliar a influência da cepa do *T. cruzi* na evolução da infecção experimental em cães da raça *Beagle*, ao longo das fases aguda e crônica da infecção utilizando parâmetros clínicos, parasitológicos, histopatológicos e moleculares.

3.2- Objetivos específicos

- ❖ Avaliar clinicamente os animais durante as fases aguda e crônica da infecção.
- ❖ Avaliar o parasitismo sanguíneo por meio de técnicas parasitológicas e moleculares.
- ❖ Avaliar o parasitismo tecidual do coração por meio de técnicas moleculares e histológicas.
- ❖ Correlacionar a positividade dos testes parasitológicos com a positividade da PCR em tecidos cardíacos.
- ❖ Avaliar a presença de alterações histopatológicas (infiltração de células adiposas, inflamação e fibrose) em fragmentos do coração.
- ❖ Caracterizar as cepas parentais e as populações isoladas do sangue de cães infectados experimentalmente, ao longo das fases aguda e crônica por meio da análise da mobilidade eletroforética de isoenzimas, RAPD, rDNA e DNA mit COII.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5. MATERIAL e MÉTODOS

5.1- Cepas do *Trypanosoma cruzi*

Nesse estudo foram utilizadas três cepas do *T. cruzi* isoladas de pacientes em diferentes fases e formas clínicas da doença de Chagas crônica.

A cepa **Be-78** (*T. cruzi* II) foi isolada por xenodiagnóstico em 1978 da paciente Berenice, considerada o primeiro caso clínico da doença de Chagas e estudada por Lana & Chiari (1986).

A cepa **Y** (*T. cruzi* II) foi isolada por xenodiagnóstico em 1950 por Pereira de Freitas de um caso agudo humano em São Paulo e estudado por Silva & Nussenzweig (1953).

A cepa **ABC** (*T. cruzi*) foi isolada por xenodiagnóstico em 1962 de uma paciente de Minas Gerais, pelo Dr. Zigman Brener. A paciente havia sido operada em 1958 de megacólon. Apresentava dispnéia de esforço e manifestações de insuficiência cardíaca congestiva (BRENER, 1965).

Essas cepas vêm sendo mantidas no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) por passagens sucessivas em camundongos.

5.2- Animais

Foram utilizados 42 cães da raça *Beagle* com quatro meses de idade, de ambos os sexos, nascidos e mantidos no canil do Biotério Central (UFOP). Os animais foram alocados em grupos experimentais, de quatro ou cinco animais pertencentes a mesma ninhada, foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Receberam, antes da inoculação, quatro doses da vacina sêxtupla (Vanguard® HTLP 5/CV-L) e foram tratados com anti-helmínticos.

5.2.1 - Inoculação dos animais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ouro Preto. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

O inóculo utilizado para a infecção dos cães foi obtido, no dia do pico de parasitemia, de camundongos Swiss infectados com as cepas descritas no item

5.1. A contagem dos parasitos para a preparação do inóculo foi feita segundo a técnica descrita por Brener (1962).

Vinte e quatro cães foram inoculados com 4000 formas tripomastigotas sangüíneas/Kg de peso corporal (TS), via intraperitoneal (VI), das cepas Be-78, Y ou ABC. Os animais foram alocados em três grupos: (1) oito animais inoculados com a cepa Be-78; (2) oito, com a cepa Y e; (3) oito, com a cepa ABC. Quatro animais inoculados com cada cepa foram avaliados até 30 dias e quatro até 24 meses após a inoculação. Para verificar a influência do tamanho do inóculo nas avaliações realizadas ao longo de 24 meses, cinco animais foram inoculados com 2000 TS da cepa Be-78 e cinco com 2000 TS da cepa Y. Um grupo de oito animais foi mantido como controle não infectado (CNI).

5.2.2 - Necropsia e coleta do material

Dezesseis e 26 animais foram eutanasiados, respectivamente, aos 30 dias e aos 24 meses após a inoculação, para avaliação de fase aguda e crônica da infecção. Os animais do grupo controle foram eutanasiados para análise comparativa com os animais avaliados nas fases aguda e crônica da infecção. Foram coletados fragmentos de aproximadamente 0,5 cm³ do coração [parede atrial direita (AD) e esquerda (AE), parede ventricular direita (VD) e esquerda (VE), septo interventricular (SI) e ponta (PTA)] de todos os cães. Os fragmentos foram lavados exaustivamente em tampão fosfato (PBS pH 7,2), secados em papel de filtro, e congelados a -70°C para posterior extração de DNA ou fixados em formol 10% tamponado pH 7,2 para o processamento histológico.

5.3- Exames clínicos (Sinais clínicos, temperatura retal e variação de peso corporal)

Os animais foram avaliados diariamente durante a fase aguda da infecção com o objetivo de observar alterações clínicas e comportamentais e também para registrar casos de morte devido à infecção pelo *T. cruzi*.

Registros de temperatura retal e de peso corporal foram realizados antes da inoculação, 30 dias e 24 meses após a infecção. A média da variação de peso e de temperatura foi calculada para cada grupo experimental.

5.4- Avaliação do parasitismo sangüíneo e tecidual

5.4.1- Exame de sangue a fresco

A parasitemia dos animais foi verificada do 10^o ao 30^o dia após a inoculação. Para isso, 5µl de sangue da veia marginal da orelha foram coletados diariamente e examinados ao microscópio (aumento de 400X) para pesquisa de tripomastigotas.

5.4.2- Hemocultura

Amostras de sangue foram coletadas 30 dias após a inoculação na fase aguda, e em intervalo regular de três meses, a partir do segundo mês, até dois anos após a infecção, totalizando 10 hemoculturas. A técnica de hemocultura foi realizada de acordo com a descrita por Chiari *et al.* (1989) com algumas modificações. O volume de sangue em cada coleta foi de 10ml. O sangue foi centrifugado a 1.000g durante 10 minutos a 4°C, sendo o plasma descartado. Posteriormente, o sedimento foi lavado uma vez com meio LIT [*Liver infusion tryptose* (CAMARGO, 1964)] e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. Após descartar o sobrenadante, a camada de leucócitos e o sedimento de hemácias foram retirados e semeados separadamente para tubos plásticos com tampa de rosca contendo 5ml de LIT. Todos os tubos foram incubados a 28°C, sendo agitados levemente duas vezes por semana. Alíquotas de 10µl da suspensão de cada tubo foram examinadas entre lâmina e lamínula, ao microscópico, em aumento de 400X, no 30^o, 60^o, 90^o e 120^o dia após a coleta. As hemoculturas positivas foram mantidas em crescimento exponencial para obtenção da massa úmida (aproximadamente 1×10^6 parasitos). A massa úmida foi conservada a -70°C para posterior extração enzimática e do DNA.

5.4.3- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

5.4.3.1- Coleta das amostras de sangue e de tecido cardíaco

5.4.3.1.1- Amostras de sangue

Para obtenção de DNA, utilizado na PCR, 10ml de sangue foram coletados em paralelo com as coletas de sangue para as hemoculturas de fase aguda, e de seis em seis meses na fase crônica. O sangue foi conservado em 10ml de guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M (*Sigma Chemical Co*, USA) pH 8,0 (ÁVILA *et al.*, 1990). No total foram realizadas cinco coletas por animal. Esta mistura, sangue/guanidina/EDTA, foi fervida 15 dias após a coleta, a 100°C, durante 15 minutos, com o objetivo de promover a linearização dos minicírculos concatenados na rede de kDNA (BRITTO *et al.*, 1993) permitindo assim, uma distribuição homogênea das seqüências alvo presentes na amostra. O lisado foi estocado à temperatura ambiente.

5.4.3.1.2 - Amostras de tecidos cardíacos

Ver item 5.2.2- Necropsia e coleta do material

5.4.3.2- Extração do DNA

5.4.3.2.1- Amostras de sangue (Extração fenólica)

A extração do DNA foi processada após homogeneização de cada amostra. Foi utilizada a técnica proposta por Sambrook *et al.* (1989) modificada por Gomes *et al.* (1998b). Alíquotas de 200µl do lisado de sangue foram transferidas para tubos de microcentrífuga 1,5ml (*ependorf-USA*), em seguida foi desproteinizado em igual volume de uma mistura de fenol-clorofórmio (100µl de fenol Tris pH 8,0 e 100µl de clorofórmio). Essa mistura foi homogeneizada lentamente por 2 minutos e centrifugada a 6.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e ao sedimento foram adicionados 150µl de H₂O milli-Q estéril e novamente centrifugado a 6.000rpm por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 320µl de clorofórmio ao sobrenadante, que foi centrifugado na mesma rotação anterior. A precipitação do DNA presente no sobrenadante foi realizada em banho de gelo, por 15 minutos, com 40µg de

glicogênio (*Mannheim Biochemicals, Mannheim, Germany*), 10mM de acetato de sódio e dois volumes de etanol absoluto. Após centrifugação, a 13.000rpm, por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e após volatilização do etanol, o DNA foi resuspenso em 20µl de água milli-Q estéril. Durante este estágio, um controle negativo e um positivo foram processados em paralelo.

5.4.3.2.2- Amostras de tecidos cardíacos (Método da Lise Alcalina seguido de Extração fenólica)

O DNA foi extraído dos fragmentos de tecido do coração dos animais inoculados com as diferentes cepas do *T. cruzi* e eutanasiados na fase crônica da infecção. Os tecidos dos animais eutanasiados 30 dias após a inoculação foram utilizados apenas como controle positivo da reação e os fragmentos cardíacos dos animais do grupo CNI foram utilizados como controles negativos.

Os fragmentos de aproximadamente 0,5cm³ foram transferidos para uma placa de Petri estéril onde foram totalmente picotados com auxílio de uma lâmina de bisturi. A seguir, esses fragmentos foram transferidos com auxílio de palitos de madeira estéril para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml contendo 238µl de água milli-Q estéril e 12µl de NaOH 50mM e foram fervidos por 10 minutos. Após a fervura, foram adicionados às amostras, 40µl de Tris-HCl 130mM (pH 7,0) para neutralização da reação (VAGO *et al.*, 1996a; 2000).

Posteriormente, foi realizada uma extração fenólica como descrito no item 5.4.3.2.1. Em cada extração foi incluído um fragmento de tecido obtido do coração de cão não infectado e outro de cão na fase aguda para controle negativo e positivo, respectivamente. O número de extrações realizadas para cada amostra de tecido, por cão, foi de no máximo três.

5.4.3.3- Amplificação específica do *T. cruzi* (Amostras de sangue e fragmentos de tecido cardíaco)

Nas reações da PCR específica, as seqüências das regiões conservadas dos minicírculos da rede de kDNA do *T. cruzi* constituíram o alvo para o anelamento dos iniciadores:

S35 (5'AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA3') e

S36 (5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT3'), descritos por Ávila *et al.* (1990). Além desses iniciadores, o 121 (5'AAATAATGTACGG(T/G)-

GAGATGCATGA-3') e o 122 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3') também foram utilizados alternativamente nas amostras negativas com os iniciadores S35 e S36.

A metodologia usada foi a descrita por Gomes *et al.* (1998b), modificada. A PCR foi realizada num volume final de 20µl contendo 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 3,5mM MgCl₂, 75mM KCl, 0,2mM de cada dNTP's (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*), 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*), 20pmol de cada iniciador (S35 e S36) ou (121 e 122), 2µl de DNA e a mistura foi coberta com 20µl de óleo mineral.

O programa de amplificação constituiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e de 35 ciclos, com desnaturação do DNA a 95°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final de 10 minutos, realizados em termociclador automático (MinCycler TM).

Nas etapas de preparo do DNA e mistura da reação da PCR foram usados controles negativos (amostras de sangue de cães não infectados) e controles positivos (amostras de sangue de cães infectados na fase aguda da infecção).

Os produtos amplificados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corados pela prata (SANTOS *et al.*, 1993).

5.4.4- Análise imuno-histoquímica (IMH)

Um dos tecidos obtidos, como descrito no item 5.2.2, foi utilizado para a realização da IMH. Inicialmente, a atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de peróxido de hidrogênio/PBS por 30 minutos (10ml de H₂O₂ 30% e 240ml de PBS) à temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos a três banhos consecutivos em PBS durante 5 minutos cada (BARBOSA *et al.*, 1985). Após secagem dos cortes com papel absorvente, os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando a lâmina por 30 minutos com soro normal de cabra diluído 1:40 em PBS, em câmara úmida à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram secadas e incubadas com anticorpo primário (anti-*T. cruzi* produzido a partir de um coelho imunizado com a cepa Y do *T. cruzi*, diluição 1:500 em PBS e soro

albumina bovina-BSA 1%) em câmara úmida, na estufa, a 37°C, por 1 hora. Seguiram-se três banhos de 5 minutos cada, em PBS. As bordas dos cortes foram novamente secadas e cobertas com anticorpo secundário aplicado (anti-IgG de coelho produzido em cabra diluído a 1:200). A seguir, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos e submetidas novamente a três banhos de PBS, 5 minutos cada. Em seguida, foi aplicado o complexo peroxidase-antiperoxidase (PAP diluído 1:250 em PBS/albumina 0,1%). As lâminas foram incubadas por 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente, seguindo-se três banhos de PBS, 5 minutos cada.

A revelação foi feita por meio de incubação em solução de DAB (50mg de diaminobenzidina em 250ml de PBS e 500µl de peróxido de hidrogênio 30%) durante 5 minutos. Para interromper a reação, os cortes foram lavados em água corrente durante 5 minutos e contra corados com hematoxilina de Harris por 8 segundos. Prosseguiu-se com a lavagem dos cortes por 5 minutos e desidratação progressiva em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%), diafanização em xilol e montagem com Entellan para pesquisa de ninhos de amastigotas ou antígenos de *T. cruzi*.

Em cada bateria de imuno-histoquímica foi incluída, como controle da reação, dois cortes obtidos de coração de um cão infectado e de outro não infectado, eutanasiados, para avaliação de fase aguda. Um deles foi usado como controle positivo e o outro como controle negativo no qual o antisoro primário (anti-*T. cruzi*) foi substituído por PBS/albumina 0,1%.

Os ninhos ou amastigotas isoladas foram quantificados em 30 campos microscópicos (aumento de 400X) em cada fragmento cardíaco.

5.5- Avaliação histopatológica de fragmentos do coração por meio das técnicas de Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson

5.5.1- Preparação dos cortes histológicos

Os fragmentos dos tecidos coletados e fixados em formol 10% tamponado pH 7,2 foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em parafina e posteriormente foram submetidos a microtomia para a obtenção de 3 cortes seriados na espessura de

4µm. Em seguida, foram desparafinizados em dois banhos de xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente por 5 minutos.

5.5.2- Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)

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

5.5.3- Técnica de Tricrômico de Masson

Inicialmente as lâminas contendo os fragmentos descritos acima foram coradas pela hematoxilina, lavadas em água corrente e coradas pela solução Sudam/fucsina ácida. Posteriormente, foram lavadas em água corrente e imersas em uma solução de ácido fosfotúngstico/ácido fosfomolibdico e novamente lavadas. Em seguida, foram coradas pelo azul de anilina, lavadas em água corrente, foram secas (em estufa), posteriormente foram imersas em xilol e montadas com Entellan e lamínula.

5.5.4- Análise semi-quantitativa da área ocupada por inflamação e por colágeno.

As lâminas obtidas foram analisadas ao microscópio óptico, por dois observadores, para a detecção da presença de infiltrado de células adiposas, infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo (fibrose). Os resultados foram descritos utilizando os seguintes parâmetros: (0) ausente, (1) raros, (2) discreto +, (3) moderado ++, (4) intenso +++ e (5) muito intenso.

5.6- Avaliação da variabilidade intraespecífica dos isolados de *Trypanosoma cruzi* obtidos de cães inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC pelas técnicas de isoenzimas, RAPD, rDNA, e do gene mitocondrial CO II

5.6.1- Perfil eletroforético de isoenzimas (Zimodema)

A massa úmida de parasitos foi descongelada em banho de gelo e submetida à lise osmótica em estabilizador enzimático (Ditiotreitol - 2,0mM, ácido ϵ -amino capróico - 2,0mM, EDTA, 2,0mM, pH 7,0), numa relação de volume 1:1 (p/v). O lisado permaneceu por 20 minutos no gelo e em seguida foi centrifugado a 4000rpm, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante (extrato enzimático) foi armazenado em nitrogênio líquido, a -196°C. O sedimento foi conservado a -70°C, e posteriormente o DNA total foi extraído.

As isoenzimas foram separadas por eletroforese horizontal, sob refrigeração, em membrana de acetato-celulose (BEN-ABDERRAZAK *et al.*, 1993). Após a corrida enzimática, foi aplicado sobre a membrana o revelador específico para cada enzima estudada. Os perfis eletroforéticos obtidos foram fotografados. Foram estudados quatro sistemas enzimáticos: glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) [E.C.1.1.1.49]; glicose fosfato isomerase (GPI) [E.C.5.3.1.9]; fosfoglucomutase (PGM) [E.C.2.7.5.1]; isocitrato desidrogenase (IDH) [EC1.1.1.42].

5.6.2- Caracterização molecular (RAPD, rDNA, gene mitocondrial CO II)

5.6.2.1- Extração do DNA

A extração de DNA (WILLIAM *et al.*, 1990 modificada) foi realizada a partir do sedimento citado no item 5.6.1. O DNA foi extraído utilizando-se três etapas:

a) lise e digestão celular: o sedimento foi diluído em 100 μ l de tampão de lise TE (pH 8,0 Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM), com adição de 10 μ l SDS 10% e 5 μ l de Proteinase K(20mg/ml) na proporção de 100 μ g/ml e incubado por 12 horas, a 55°C, em banho-maria;

b) desproteíntização: foram realizadas duas extrações fenólicas. O fenol foi adicionado (v/v) e homogeneizado por 5 minutos, sendo em seguida

centrifugado a 10.000rpm, por 7 minutos, a 4°C, com recuperação da fase aquosa. A seguir, no sedimento da primeira extração foram realizadas duas extrações com clorofórmio e álcool isoamílico. O sedimento foi homogeneizado por 5 minutos e centrifugado a 10.000rpm, por 7 minutos, a 4°C, sendo a fase aquosa recuperada.

c) para a precipitação do DNA, foi adicionada à fase aquosa uma solução de acetato de sódio 3M na proporção 1/10 e 2,5X de etanol absoluto gelado. A seguir, os tubos foram mantidos por duas horas a -70°C, centrifugados a 10.000rpm, por 15 minutos, a 4°C. O DNA extraído foi lavado duas vezes com 500µl de etanol 70 gelado e centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente foi re-suspendido em 100µl de água milli-Q estéril e estocado a -20°C.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260nm e o grau de pureza das amostras determinado pela relação das absorbâncias a 260/280nm. A concentração aproximada do DNA total foi determinada com auxílio da fórmula:

$$\text{Concentração DNA} = \frac{\text{Leitura a 260nm} \times \text{Fator 50} \times \text{Fator da diluição}}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

A concentração final de cada amostra de DNA foi ajustada para 3ng/µl e as amostras foram estocadas a 4°C.

5.6.2.2- RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

A amplificação aleatória do polimorfismo do DNA em *T. cruzi* foi realizada segundo Steindel *et al.* (1993) com algumas modificações. Cada reação foi realizada em um volume final de 10µl, contendo 10mM (pH 9,0), 0,1% Triton X-100 (*Promega, Madison, WI, USA*), 1,5mM MgCl₂, 125µM de cada dNTP (*Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*), 1,0 unidade de Taq DNA polimerase, 6,4pmoles do iniciador, 3ng do DNA total e coberto com 20µl de óleo mineral. A amplificação seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de dois ciclos térmicos para anelamento, alongamento e desnaturação respectivamente, a 30°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto e 95°C por 30 segundos e 33 ciclos com temperatura de anelamento a 40°C e, extensão final a 72°C por 5 minutos. A PCR foi realizada num

termociclador MJ Research PTC-100. Para a realização desta reação foram utilizados quatro oligonucleotídeos iniciadores: 3302 (5'-CTGATGCTAC-3'), λGT11-F (5'-GACTCCTGGAGCCCG-3'), M-13F (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') e λGT11-R (5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3').

Após a amplificação, 5µl da reação de PCR foram misturados a 5µl de tampão da amostra (0,25% de Azul de Bromofenol, 0,25% de Xilenocianol e 30% de glicerol) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb (*Promega, Madison, WI, USA*). A corrida foi a 100 Volts (30mA) por aproximadamente três horas. Posteriormente, o gel foi corado pela prata e fotografado.

5.6.2.3- Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sα

Para a amplificação do domínio divergente do gene ribossômico rDNA 24Sα, a reação foi processada em um volume final de 25µl contendo 10mM Tris-HCl (pH 9,0), 50mM KCl, 3,5mM MgCl₂ (Promega), 0,625 unidades de *Taq* DNA polimerase (Promega), 0,1% Triton X-100 (Buffer B, Promega); 0,2mM de cada dNTP, 0,25µM dos iniciadores D71: (3'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-5') e D72: (3'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-5'), 3ng/µl de DNA de cada amostra. A PCR foi realizada em um termociclador *MJ Research* PTC-100. Foi utilizado o seguinte protocolo de amplificação: 30 ciclos com desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, um outro passo de desnaturação por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. O produto amplificado foi analisado após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata (SOUTO *et al.*, 1996).

A visualização do fragmento de 125pb indica que a população de *T. cruzi* pertence a Linhagem 1 (*T. cruzi* II), do fragmento de 110pb, a Linhagem 2 (*T. cruzi* I), ou de ambos fragmentos, Linhagem 1/2.

5.6.2.4- PCR - gene Mitochondrial Citocromo Oxidase subunidade II (CO II)

Para a amplificação da região gênica que compreende a subunidade II da enzima mitocondrial Citocromo Oxidase (CO II) de *T. cruzi*, o DNA das cepas parentais (Be-78, Y e ABC) e também dos isolados do parasito obtidos de cães

inoculados com 2000 TS ou 4000 TS das cepas acima foi submetido a uma PCR contendo 10mM Tris-HCl pH 8,8, 25mM KCl, 3,5mM MgCl₂, 1,0 unidades *Taq* DNA Polimerase (Promega), 250mM de cada dNTP, 0,3mM dos iniciadores externos TcMit21 (5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3') e TcMit10 (5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3'), 3ng de DNA total e quantidade de H₂O Milli-Q estéril suficiente para 15µl. Os ciclos de amplificação da PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, um outro passo de desnaturação por 45 segundos, anelamento por 45 segundos e extensão por um minuto, num total de 40 ciclos. Após a amplificação pela PCR, os amplicons foram digeridos com a enzima de restrição *AluI* por 16 horas, e os fragmentos gerados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata. Os fragmentos de 30, 81 e 264pb são relacionados ao grupo mitocondrial A (*T. cruzi* I), os fragmentos de 81 e 212pb são indicadores das cepas relacionadas ao grupo C (*T. cruzi* II) e os fragmentos de 81 e 294pb, indicando o grupo mitocondrial B, (*T. cruzi* III ou cepas híbridas) (AUGUSTO-PINTO, 2003).

5.7- Análise dos dados

Os parâmetros temperatura e peso corporal foram analisados pelo teste One-way ANOVA (*nonparametric*) e as diferenças entre grupos, pelo teste *Tukey*. Os dados obtidos pelas técnicas de hemocultura e PCR em sangue foram comparados pelo teste do *Chi-Quadrado de Fisher e de McNemar*. Os dados histopatológicos (avaliados semi-quantitativamente) foram analisados através do teste de *Kuskal-Wallis* (SNEDECOR & COCHRAN, 1989). A análise estatística foi conduzida com o apoio instrumental do *software* Prism 4.0 for Windows, versão 4.0. O intervalo de confiança foi de 95% em todos os testes realizados e diferença estatística foi considerada em $p < 0,05$.

A análise dos perfis de bandas obtidas pela técnica de RAPD foi feita visualmente. Os fenogramas foram construídos fundamentados no número de bandas compartilhadas. Os padrões observados foram inseridos manualmente no computador e submetidos à análise de proporção de bandas compartilhadas entre as populações do *T. cruzi* pelo programa *Treecon* (VAN DE PEER & DE WACHTER, 1994). O programa analisa os dados em comparações de pares em

$n(n-1)/2$ fornecendo o número total de bandas e a proporção de bandas compartilhadas por cada par e, no final, para todos os pares. No programa *Treecon* foi utilizada a medida de distância genética e o método da Média Aritmética não Ponderada – UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Analysis*). Foi realizada uma análise de compartilhamento de bandas utilizando o programa DNA-POP (PENA & NUNES, 1990).

6. RESULTADOS

6.1- Dados clínicos dos cães avaliados durante 24 meses após a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Os animais foram avaliados diariamente durante a fase aguda da infecção com o objetivo de detectar alterações clínicas e comportamentais relacionadas à doença de Chagas, porém apenas dois animais inoculados com a cepa Y apresentaram quadro de tristeza e apatia, nos demais não foi observada nenhuma alteração que se destacasse. Nenhuma morte foi registrada ao longo de todo período de avaliação.

A temperatura corporal registrada nas fases aguda e crônica da infecção ocorreu de maneira irregular, variando entre 38,3°C e 40,5°C. Não foram observadas alterações significativas entre os registros da temperatura dos animais infectados, independente da cepa e do tamanho do inóculo, e o dos animais do grupo CNI.

Durante a fase aguda (30 dias após a inoculação) foi observada uma variação de peso corporal significativa entre os animais inoculados com 4000 TS das cepas Be-78, Y ou ABC e os animais do grupo CNI. Entre aqueles animais inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC, 0%(0/8), 50%(4/8) e 62,5% (5/8) perderam peso, respectivamente (Gráfico 1A). Por outro lado, todos os animais que evoluíram para a fase crônica da infecção tiveram aumento de peso corporal. Desta maneira, o ganho de peso dos animais infectados foi similar aos dos animais do grupo CNI após 24 meses da inoculação (Gráfico 1B).

Entre os animais pertencentes aos grupos infectados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y e os animais do grupo CNI, também foram observadas diferenças significativas na variação de peso corporal, durante a fase aguda da infecção. Destes, apenas 20% (1/5) e 0% (0/5) dos animais inoculados com as cepas Be-78 ou Y perderam peso corporal até 30 dias após a inoculação, respectivamente. Porém, na fase crônica (24 meses após a infecção) o ganho de peso entre os animais infectados e os animais do grupo CNI foi semelhante.

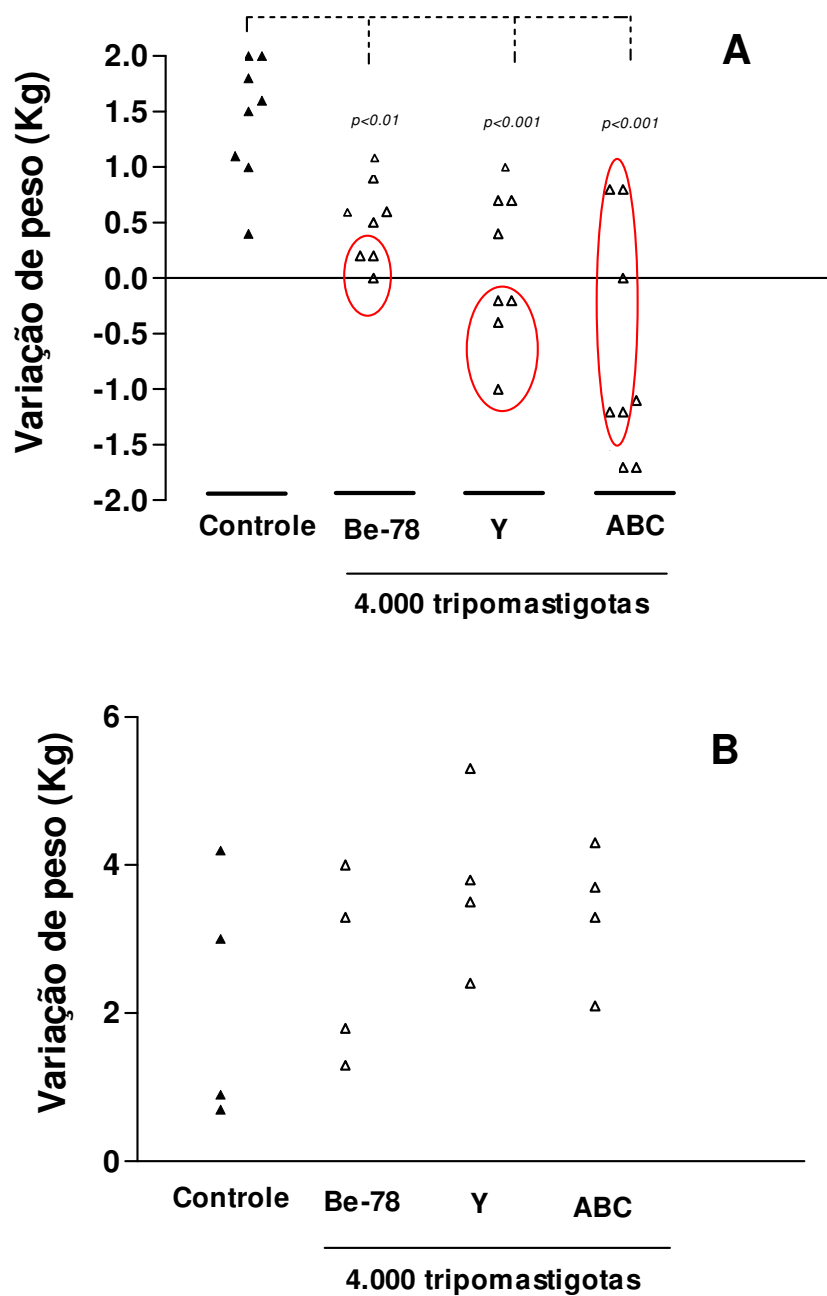


Gráfico 1 – Análise comparativa da variação de peso registrada após: A) 30 dias e B) 24 meses da inoculação de 24 cães *Beagle* com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, e dos oito controles não-infectados. No gráfico A, os dados circulado em vermelho representam os animais avaliados por 24 meses também mostrados em B.

6.2- Parasitismo sangüíneo

6.2.1- Exame de Sangue a Fresco (ESF)

O *T. cruzi* foi detectado no sangue periférico de todos os animais inoculados com 4000 TS e avaliados por 24 meses. Entretanto, o número de testes necessários para a detecção do parasito foi variável entre os animais inoculados com as diferentes cepas (Tabela 1). A freqüência de testes positivos das Hc realizadas nos animais inoculados com a cepa ABC foi significativamente superior a dos animais inoculados com as cepas Be-78 ou Y. Os parasitos foram detectados entre 19 a 30, 13 a 21 e 13 a 30 dias após a inoculação com as cepas Be-78, Y ou ABC, respectivamente (Tabela 1).

Os animais inoculados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y apresentaram positividade do ESF inferior à observada nos animais inoculados com 4000 TS. Assim, 80% (4/5) e 60% (3/5) dos cães inoculados com as cepas Be-78 ou Y, respectivamente, apresentaram este teste positivo. Além disso, foi necessário realizar um número maior de testes para detectar o parasito nestes animais. Contudo, para os cães inoculados com a cepa Be-78 a proporção de testes positivos em relação ao total realizado foi de 1/9 e para os inoculados com a cepa Y foi de 1/12,5, sendo, esse, significativamente maior em relação aos realizados nos animais inoculados com 4000 TS da cepa Y (Tabela 1). A freqüência dos ESF foi de 11% e 8% para os cães inoculados com as cepas Be-78 ou Y, respectivamente, sendo a significativamente inferior, apenas, à observada para os animais inoculados com 4000 TS da cepa Y. O tamanho do inóculo não interferiu no período em que o parasito foi detectado (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados dos exames de sangue a fresco realizados durante a fase aguda da infecção de 22 cães *Beagle* inoculados com 4000 trypomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi*.

Fase aguda	Inóculos				
	4000 TS			2000 TS	
	Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i>				
	Be-78 n=4	Y n=4	ABC n=4	Be-78 n=5	Y n=5
ESF + (%+)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (80)	3 (60)
ESF+/ ESF total (%)	15/80 (18,7)	21/80 ^a (26,2)	59/80* (73,7)	11/100 (11,0)	8/100 ^b (8,0)
ESF+/ESF total	1/5,3	1/3,8 ^a	1/1,4*	1/9	1/12,5 ^b
Período de positividade	19 ^o - 30 ^o	13 ^o - 21 ^o	13 ^o - 30 ^o	16 ^o - 29 ^o	12 ^o - 20 ^o

Nota: ESF +: exame de sangue a fresco positivo; (% +) percentagem de testes positivos. Período de avaliação: 10^o ao 30^o dia após a inoculação. * $p < 0,05$ diferença significativa quando comparado os resultados dos ESF realizados nos animais infectados com a cepa ABC aos inoculados com as cepas Be-78 ou Y, e ^a, ^b $p < 0,05$ diferença significativa quando comparado os resultados dos ESF realizados nos animais infectados com a cepa Y 4000 TS e 2000 TS.

6.2.2- Hemocultura

Todos os animais inoculados com 4000 TS apresentaram hemocultura positiva, durante a fase aguda (30 dias após a inoculação). Entre os animais inoculados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y foi observada uma positividade de 100% (5/5) e 60% (3/5), respectivamente.

Durante a fase crônica da infecção 100% dos animais inoculados com as cepas Be-78 ou ABC apresentaram pelo menos uma Hc positiva, enquanto apenas um dos quatro animais inoculados com a cepa Y apresentou este teste positivo. Além disso, a frequência de testes positivos, em dois anos de avaliação foi similar entre os animais inoculados com as cepas Be-78 (75%) e ABC (62,5%), sendo, portanto, significativamente menor (6,2%) naqueles inoculados com a cepa Y (Tabela 2).

Considerando todas as Hc positivas, realizada nos cães inoculados com 4000TS, 61% (14/23) foram realizadas no primeiro e 39% (9/23), no segundo ano após a inoculação dos cães, mostrando um decréscimo da positividade dos testes com a evolução da doença. Curiosamente, este decréscimo foi observado

apenas nos animais inoculados com a cepa ABC. Nesses cães, 87,5% (7/8) das hemoculturas positivas foram realizadas no primeiro ano de avaliação. No segundo ano, a positividade foi significativamente menor ($p=0,038$), onde apenas 37,5% (3/8) das Hc foram positivas. Por outro lado, a positividade dos testes das Hc realizadas nos animais inoculados com a cepa Be-78 foi similar durante os dois anos de avaliação, e nos cães inoculados com a cepa Y a maioria dos testes foram negativos durante os dois anos de avaliação.

A positividade das hemoculturas realizadas durante a fase crônica da infecção, nos animais inoculados com 2000 TS da cepa Be-78, foi significativamente maior em relação aos inoculados com a cepa Y (Tabela 2). A percentagem de positividade cumulativa de Hc positivas foi significativamente superior nos exames realizados nos animais inoculados com a cepa Be-78 (85%) em relação aos inoculados com a cepa Y (5%). Estes dados foram concordantes com os obtidos entre os animais inoculados com 4000 TS das cepas Be-78 ou Y, respectivamente (Tabela 2). Considerando todas as Hc positivas 94,4% foram observadas em animais inoculados com a cepa Be-78 e apenas 5,6% com a cepa Y. Destas, 50% (9/18) foram realizadas no primeiro e 50% (9/18) no segundo ano após a inoculação dos cães, não sendo observado decréscimo da positividade da Hc com a evolução da doença. Estes resultados confirmam os obtidos em animais inoculados com 4000 TS das cepas Be-78 ou Y, que também não mostraram diminuição na positividade ao longo de dois anos.

O Gráfico 2 mostra uma representação da positividade cumulativa das Hc realizadas em cães *Beagle*, inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC do *T. cruzi*.

Tabela 2 – Resultados das hemoculturas realizadas durante a fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em cães *Beagle* inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y.

Fase crônica	Inóculos				
	4000 TS			2000 TS	
	Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i>				
	Be-78 n=4	Y n=4	ABC n=4	Be-78 n=5	Y n=5
Hc + (%+)	4 (100)	1 (25)*	4 (100)	5 (100)	1 (20)*
Hc +/- total Hc (%)	12/16 (75)	1/16 (6,2)*	10/16 (62,5)	17/20 (85)	1/20 (5)*

Nota: Hc +: nº de hemocultura positiva; (% +): percentagem de testes positivos, (%): percentagem de positividade cumulativa das hemoculturas, ^a $p < 0,05$ diferença significativa quando são comparadas as frequências das Hc positivas nos animais infectados com a cepa Y em relação aos inoculados com as cepas Be-78 ou ABC.

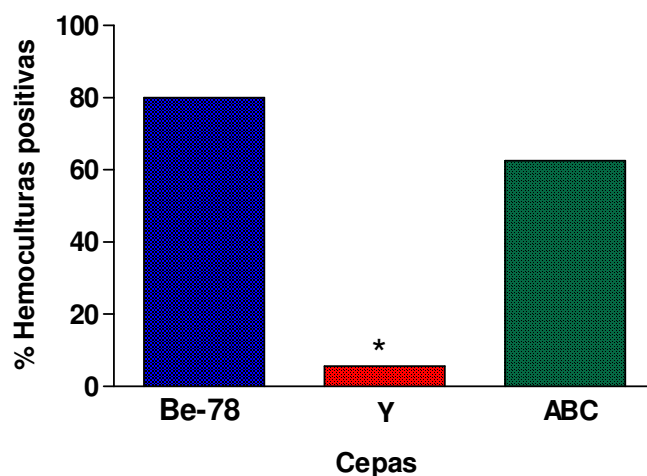


Gráfico 2 – Percentagem cumulativa da positividade das hemoculturas realizadas durante a fase crônica da infecção em cães da raça *Beagle*, inoculados experimentalmente com 4000 ou 2000 Tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*.

Nota: * $p < 0,05$ – diferença significativa quando são comparadas as frequências das Hc positivas nos animais inoculados com a cepa Y em relação aos inoculados com as cepas Be-78 ou ABC.

Durante a fase crônica da infecção foram realizadas 88 hemoculturas em 22 animais, sendo observada uma taxa de positividade de 46,6% (41/88). As hemoculturas foram examinadas mensalmente até 120 dias. Entretanto, foi observado que 97,7% dos resultados positivos foram comprovados entre 30 e 60 dias, apenas 2,3% (2/88) do total tiveram sua positividade comprovada aos 90 e nenhuma aos 120 dias.

As amostras de sangue foram semeadas em dois tubos distintos (leucócitos e hemácias) e apresentaram positividade variada. A análise cumulativa do número de tubos positivos demonstrou, de uma maneira geral, maior sensibilidade para os tubos de leucócitos em relação aos de hemácias para as três cepas. Entretanto, o parasito foi evidenciado, com frequência significativamente maior, nos tubos contendo leucócitos apenas entre os exames realizados nos animais inoculados com 4000 TS da cepa Be-78 (Gráfico 3).

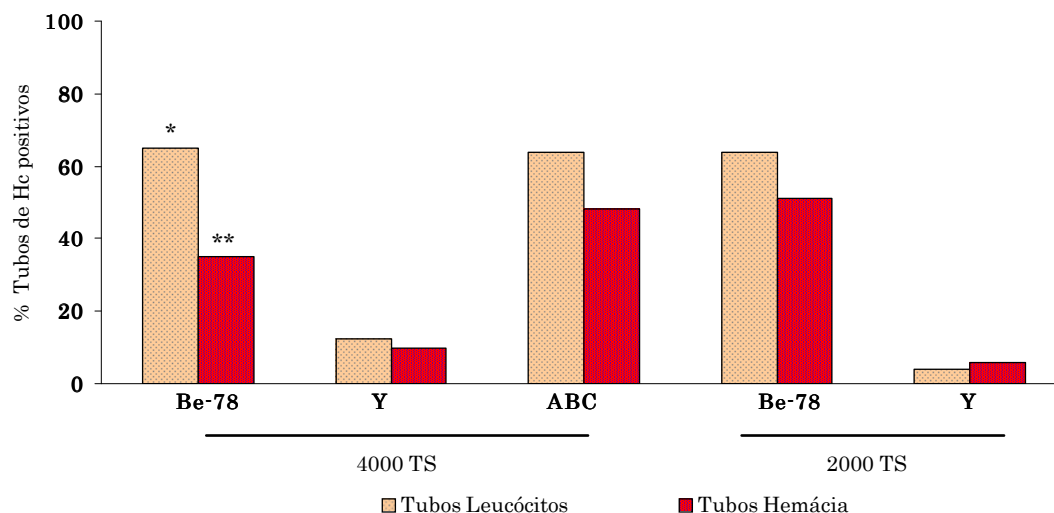


Gráfico 3 – Percentagem cumulativa da positividade dos tubos contendo leucócitos e hemácias, realizados em 22 cães *Beagle* inoculados com 4000 formas tripomastigotas sangüíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi* e avaliados por 24 meses. Nota: *, ** $p < 0,05$ - representam diferenças significativas.

Foi observada uma variação entre as percentagens de Hc positivas realizadas nos animais inoculados com as diferentes cepas do *T. cruzi*, e também, entre os animais inoculados com uma mesma cepa. Assim, entre as Hc realizadas nos animais inoculados com a cepa Be-78, o índice de positividade variou de 50% a 100%, sendo o parasito detectado ao longo de todo período de avaliação. Nas Hc realizadas nos cães inoculados com a cepa ABC, a positividade variou de 25% a 100% e foram mais positivas quando realizadas no primeiro ano de infecção. Das Hc realizadas nos animais inoculados com a cepa Y, apenas duas foram positivas aos 12 meses após a inoculação.

A parasitemia dos animais foi avaliada também pela análise do número de tubos positivos em relação ao número total de tubos semeados, ou seja, dois tubos por Hc, sendo correlacionado com o número de Hc positivas por animal. Foi observado 0 a 1 tubo positivo por animal em 41% (9/22) deles, 2 a 4 tubos positivos em 32% (7/22) e, 5 ou mais tubos positivos em 27% (6/22). O Gráfico 4 mostra a frequência de tubos e Hc positivas entre os animais infectados com as diferentes cepas e inóculos (4000TS e 2000TS). O Gráfico 4A mostra a frequência de tubos positivos e o número de Hc positiva entre aquelas Hc realizadas nos animais inoculados com as diferentes cepas. Não foi observada diferença entre o número de tubos (n=32) e de Hc (n=16) positivas realizadas nos animais inoculados com 4000 TS das cepas Be-78 (Tubos14/32 e Hc12/16) ou ABC (Tubos16/32 e Hc10/16, respectivamente), as quais foram significativamente superiores ($p<0.001$) a frequência de positividade observada entre os animais inoculados com a cepa Y (Tubos1/32 e Hc1/16). De maneira similar, foi observado nos animais inoculados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y, o mesmo padrão de frequência de positividade dos tubos e Hc observada nos animais inoculados com 4000 TS das cepas Be-78 ou Y. (Gráfico 4B).

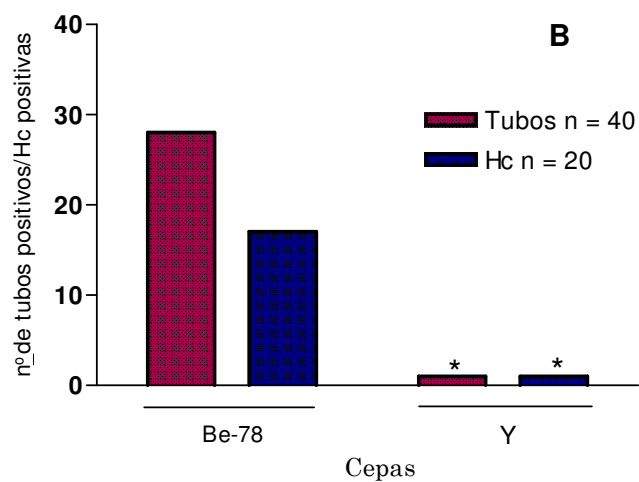
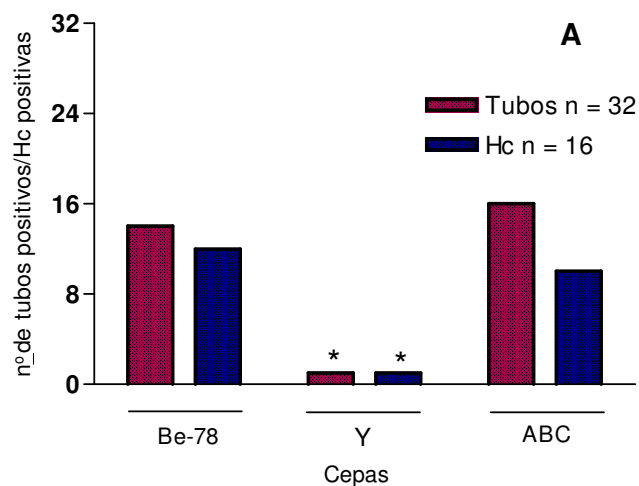


Gráfico 4 – Freqüência de tubos e de hemoculturas positivas realizadas durante a fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em cães *Beagle* inoculados com (A) 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC, ou com (B) 2000 TS das cepas Be-78 ou Y.

Nota: * $p < 0,05$ – diferença significativa quando são comparados os resultados das Hc realizadas nos animais inoculados com a cepa Y com os inoculados com as cepas Be-78 ou ABC.

Na Tabela 3 encontram-se os dados correspondentes à classificação dos animais de acordo com o nível parasitêmico. Este nível foi evidenciado pelo número de tubos positivos em relação ao número total de tubos semeados e realizados seriadamente por animal.

Entre os animais inoculados com 4000 TS da cepa Be-78 ou ABC, 100% e 50% respectivamente, apresentaram média parasitemia (2 a 4 Tubos positivos). Enquanto, 100% dos inoculados com a cepa Y apresentaram baixa parasitemia (0 a 1 tubo positivo). Em dois animais inoculados com a cepa ABC foi detectada alta parasitemia (acima de 5 tubos positivos). Curiosamente, em avaliação análoga, os animais inoculados com 2000 TS da cepa Be-78 apresentaram 20% (1/5) e 80% (4/5) de parasitemia média e alta, respectivamente. Enquanto os animais inoculados com 2000 TS da cepa Y tiveram 100% de parasitemia baixa, semelhante aos animais inoculados com 4000 TS.

Em conjunto, os 22 animais foram distribuídos de maneira homogênea nos três níveis parasitêmicos, ou seja, 9/22, 7/22 e 6/22 apresentaram parasitemia baixa, média e alta, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Classificação dos 22 cães da raça *Beagle* infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi*, avaliados durante 24 meses de infecção, de acordo com o nível parasitêmico.

Classificação dos animais de acordo com o nível parasitêmico				
	Cepas	Baixa	Média	Alta
	(nº de cães)	(0 a 1 tubo +)	(2 a 4 tubos +)	(5 ou mais tubos +)
4000 TS	Be-78 (n=4)	0	4	0
	Y (n=4)	4	0	0
	ABC (n=4)	0	2	2
2000 TS	Be-78 (n=5)	0	1	4
	Y (n=5)	5	0	0
Total	(n=22)	9	7	6

Nota: +: positivo.

6.2.3- Reação em Cadeia da Polimerase

Os resultados obtidos com a reação de PCR demonstraram que essa técnica possui alta sensibilidade em detectar o kDNA do *T. cruzi* no sangue dos animais infectados com diferentes cepas. Durante a fase aguda da infecção (30 dias após a inoculação) a presença do kDNA foi detectada em 11(91,7%) das 12 amostras de sangue obtidas dos animais inoculados com 4000 TS das cepas Be-78, Y ou ABC. Apenas uma amostra obtida de um animal inoculado com a cepa ABC apresentou PCR negativa mesmo após seis repetições da reação. Entre os animais inoculados com 2000 TS foram observados 100% de positividade da PCR.

Durante a fase crônica, o kDNA do *T. cruzi* foi detectado em 40 (83,3%) das 48 amostras de sangue obtidas dos animais inoculados com 4000 TS das diferentes cepas. A PCR foi positiva pelo menos em uma amostra de sangue de cada animal avaliado e a frequência de positividade da técnica foi variável. Não foi observada diferença significativa na positividade dos testes realizados nas amostras de sangue coletadas dos animais inoculados com as cepas Be-78 (100%) e ABC (93,7%). Entretanto, esses índices foram significativamente maiores em relação aqueles (56,3%) observados nos animais inoculados com a cepa Y (Tabela 4). Considerando todas as PCR positivas, 52,5% foram realizadas no primeiro e 47,5%, no segundo ano após a inoculação dos cães, mostrando uma estabilidade na positividade dos testes ao longo da fase crônica da infecção.

Nas amostras de sangue coletadas nos animais inoculados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y o kDNA do *T. cruzi* foi evidenciado em 24 (60%) das 40 amostras coletadas. A PCR foi negativa em todas as quatro reações realizadas em um animal inoculado com a cepa Y, os demais apresentaram pelo menos um teste positivo. As taxas de positividade das reações de PCR realizadas nos animais inoculados com as cepas Be-78 ou Y, durante a fase crônica da infecção, foram de 90% (18/20) e 30% (6/20), respectivamente. Esses resultados foram similares aos observados nos animais inoculados com 4000 TS das respectivas cepas (Tabela 4). Considerando todas as PCR positivas, 50% foram

realizadas no primeiro e 50%, no segundo ano após a inoculação dos cães, confirmando os dados apresentados acima.

Tabela 4 – Resultados das reações de PCR realizadas durante a fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em cães *Beagle* inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y.

Fase crônica	Inóculos				
	4000 TS			2000 TS	
	Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i>				
	Be-78 n=4	Y n=4	ABC n=4	Be-78 n=5	Y n=5
PCR + (%+)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	5 (100)	4 (80)
PCR +/- total PCR (%)	16/16 (100)	9/16 (56,3)*	15/16 (93,7)	18/20 (90)	6/20 (30)*

Nota: PCR +: nº de PCR positivas; (%+): percentagem de reações positivas, (%): percentagem de positividade cumulativa das PCR, * $p < 0,05$ diferença significativa quando são comparadas as frequências das PCR positivas nos animais infectados com a cepa Y em relação aos inoculados com as cepas Be-78 ou ABC.

O Gráfico 5 mostra uma representação da positividade das reações de PCR realizadas em cães *Beagle*, inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC do *T. cruzi*, sendo observado 95%, 43% e 93,7% de positividade, respectivamente.

Durante a fase crônica da infecção foram realizadas 88 PCR em 22 animais, sendo observada uma taxa de positividade de 72,7% (64/88). As reações negativas foram repetidas seis vezes (três extrações e duas ampliações de cada extração). Os resultados obtidos pela PCR também demonstraram heterogeneidade na positividade entre os grupos de animais inoculados com cepas distintas, e entre os animais inoculados com uma mesma cepa.

A Figura 1 é representativa da amplificação do kDNA do *T. cruzi* pela PCR específica realizada no sangue de cães *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *T. cruzi*, e avaliados por 24 meses.

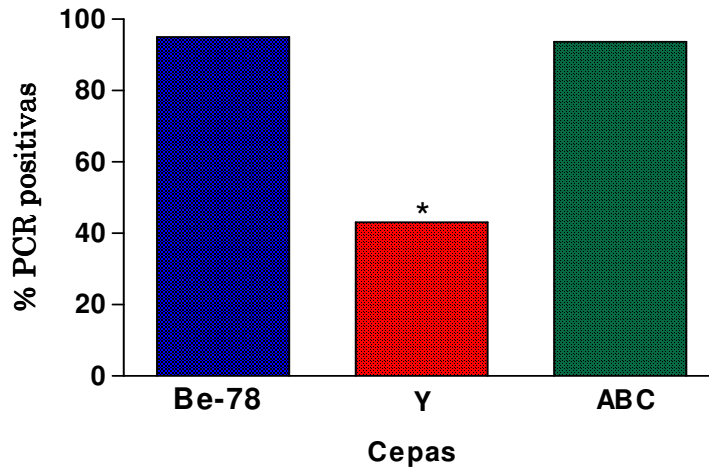


Gráfico 5 – Percentagem cumulativa da positividade das reações de PCR realizadas, durante a fase crônica da infecção, em cães *Beagle*, infectados experimentalmente com 4000 ou 2000 formas tripomastigotas sangüíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*.

Nota: * $p < 0,05$ – diferença significativa quando comparada as freqüências de PCR positivas nos animais inoculados com a cepa Y em relação aos inoculados com as cepas Be-78 ou ABC.

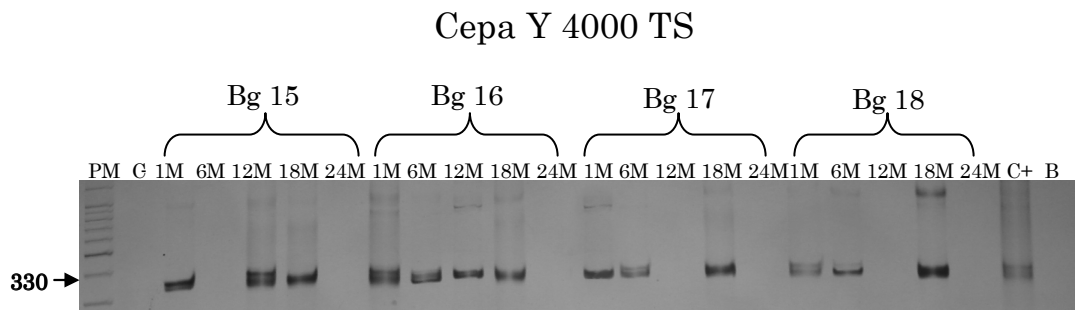


Figura 1 – Gel de poliacrilamida 6% representativo de amostras amplificadas pela PCR do kDNA do *Trypanosoma cruzi* realizada em amostras de sangue de cães *Beagle* (Bg) infectados experimentalmente com 4000 formas tripomastigotas sangüíneas (TS) da cepa Y durante as fases aguda e crônica da infecção.

Nota: PM: Marcador de peso molecular 100pb; M – mês; C- : controle negativo; C+: controle positivo; B: branco.

6.2.4- Comparação entre os resultados obtidos pelas técnicas de hemocultura (Hc) e PCR.

Durante a fase aguda da infecção, 91,6% das amostras obtidas dos animais inoculados com 4000 TS foram positivas para Hc e PCR e 8,4%, somente para Hc (Tabela 5). A positividade das Hc e PCR foi concordante em 80% nas amostras realizadas nos animais inoculados com 2000 TS e 20% dessas amostras foram positivas apenas para a PCR (Tabela 6). Estes dados indicam que os dois testes apresentaram sensibilidade similar nesta fase da doença.

Por outro lado, durante a fase crônica, 47,9% das amostras obtidas dos animais inoculados com 4000 TS foram positivas para Hc e PCR; 35,4%, apenas para PCR; e 16,7% foram negativos em ambos os testes (Tabela 5). A positividade da PCR foi significativamente mais freqüente em relação à da Hc. A sensibilidade da Hc em relação à PCR no primeiro e no segundo ano da infecção dos cães inoculados com diferentes cepas foram 66,7% e 47,4%, respectivamente; e a especificidade foi 100% (Tabela 5).

A tabela 6 apresenta os resultados das Hc e PCRs realizadas durante as fases aguda e crônica da infecção de 18 cães *Beagle* com 4000 ou 2000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi*.

A PCR foi mais sensível em relação à Hc em detectar o *T. cruzi*, independente da cepa e do tamanho do inóculo. Os animais inoculados com a cepa Y exemplificam este dado. Apenas dois dos nove animais inoculados com 4000 TS ou 2000 TS da cepa Y apresentaram Hc positiva na fase crônica da infecção (dois testes positivos entre 36 realizados). Por outro lado, a PCR foi positiva em oito desses animais (15 reações positivas em 36 realizadas).

Tabela 5 – Comparação entre os resultados das hemoculturas (Hc) e das PCR em amostras de sangue (S-PCR) realizadas durante as fases aguda e crônica da infecção de 12 cães *Beagle* inoculados com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*.

	Comparação entre Hc e S-PCR			
	Fase aguda	Fase crônica		
	Total (n= 12)	1º ano (n=24)	2º ano (n=24)	Total (n=48)
Hc+/PCR+	11 (91,6%)	14 (58,3%)	9 (37,5%)	23 (47,9%)
Hc+/PCR-	1 (8,4%)	0	0	0
Hc- /PCR+	0	7 (29,2%)	10 (41,7%)	17 (35,4%)
Hc- /PCR-	0	3 (12,5%)	5 (20,8%)	8 (16,7%)
χ^2 McNemar	NS	$P < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Sensibilidade Hc	100%	66.7%	47.4%	57.5%

Nota: Hc+ hemocultura positiva; PCR+ reação em cadeia da polimerase positiva; - negativo.
 $p < 0,05$ – diferença significativa, quando a positividade da Hc e da S-PCR foi comparada.

Tabela 6 – Comparação entre os resultados das hemoculturas (Hc) e das PCR em amostras de sangue (S-PCR) realizadas durante as fases aguda e crônica da infecção de 18 cães *Beagle* inoculados com 4000 ou 2000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi*.

	Comparação entre Hc e S-PCR							
	Fase aguda		Fase crônica					
	2000TS (n= 10)	4000TS (n=8)	2000 TS		Total (n=40)	4000 TS		Total (n=32)
			1º ano	2º ano		1º ano	2º ano	
Hc+/PCR+	8(80%)	8(100%)	9(45%)	7(35%)	16(40%)	7(44%)	6(37,5%)	13(41%)
Hc+/PCR-	0	0	0	2(10%)	2(5%)	0	0	0
Hc-/PCR+	2(20%)	0	3(15%)	5(25%)	8(20%)	6(37%)	6(37,5%)	12(37%)
Hc-/PCR-	0	0	8(40%)	6(30%)	14(35%)	3(19%)	4(25%)	7(22%)
χ^2 McNemar	NS	NS	NS	NS	NS	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0,05$
Sensibilidade Hc	80%	100%	82%	58,3%	66,7	53,8%	50%	52%

Nota: Hc+ hemocultura positiva; PCR+ reação em cadeia da polimerase positiva; - negativo. $p < 0,05$ – diferença significativa, quando a positividade da Hc e da S-PCR foi comparada.

6.3- Parasitismo tecidual

6.3.1- PCR em tecidos cardíacos

Fragmentos de DNA do *T. cruzi* foram detectados em 84,5% das reações de PCR realizadas em amostras de tecidos dos átrios e ventrículos direito e esquerdo, septo interventricular e ponta que foram obtidos de cães inoculados com 4000 TS das cepas Be-78, Y ou ABC do *T. cruzi*. Considerando as diferentes áreas do coração, a PCR foi positiva em pelo menos três amostras de cada animal avaliado. Assim, em 75% (18/24), 87.5% (21/24) e 91.3% (21/23) dos fragmentos cardíacos coletados dos animais inoculados com a cepa Be-78, Y ou ABC respectivamente, a PCR foi positiva (Tabela 7). Nenhuma diferença significativa na positividade dos testes foi encontrada nas amostras de tecidos dos animais inoculados com as diferentes cepas (Tabela 7).

De forma semelhante, a PCR foi eficaz na detecção do kDNA do *T. cruzi* nos tecidos cardíacos dos animais inoculados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y, sendo observado 90% e 76,6% de testes positivos, respectivamente.

A Figura 2 é representativa da amplificação do kDNA do *T. cruzi* pela PCR específica realizada nos tecidos cardíacos (átrios e ventrículos direito e esquerdo, septo interventricular e ponta) de cães infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*, e avaliados por 24 meses.

Tabela 7 – Resultados das reações de PCR realizadas em diferentes áreas cardíacas (átrios e ventrículos direito e esquerdo, septo interventricular e ponta) de cães *Beagle* infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC; ou com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi* e eutanasiados após 24 meses da inoculação.

Fragmentos cardíacos	4000 TS			2000 TS	
	Be-78	Y	ABC	Be-78	Y
	Nº PCR positiva/total de cães				
AD	3/4	4/4	4/4	4/5	5/5
AE	2/4	2/4	4/4	5/5	2/5
VD	4/4	4/4	3/3	5/5	5/5
VE	2/4	4/4	3/4	4/5	4/5
SI	3/4	3/4	3/4	5/5	4/5
PTA	4/4	4/4	4/4	4/5	3/5
nº de frag + /Total de frag /total de cães	18/24/4	21/24/4	21/23/4	27/30/5	23/30/5
(%+)	75	87,5	91,3	90	76,6

Nota: nº de frag +: nº de fragmentos positivos, %+: percentagem de positividade, AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular, PTA: ponta.

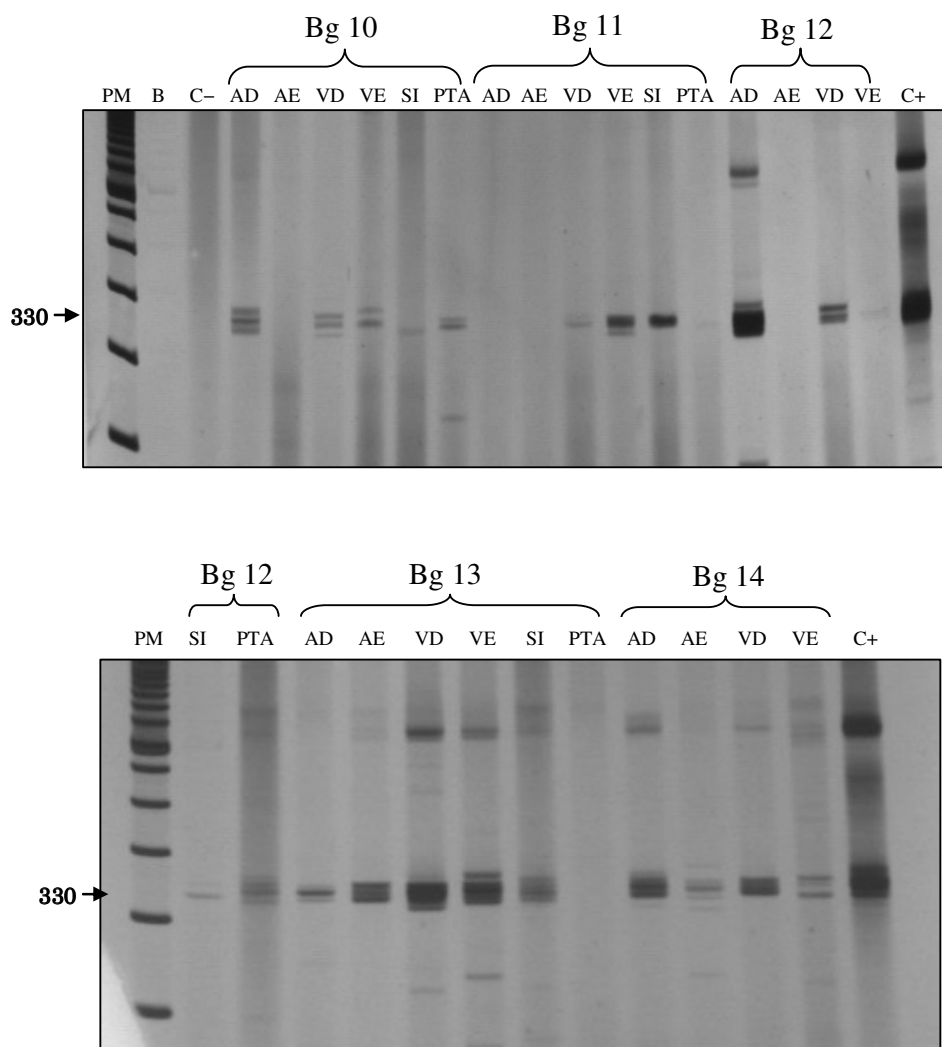


Figura 2 – Gel de poliacrilamida 6% com os perfis dos produtos da PCR específica realizada com os iniciadores S35 e S36 em tecidos do coração de cães *Beagle* (Bg) infectados experimentalmente com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, pela via intraperitoneal. Os fragmentos do coração foram obtidos após a necropsia realizada na fase crônica da infecção (24 meses). A banda de 330pb corresponde a amplificação do kDNA do parasito.

Nota: PM: peso molecular, B: branco, C-: controle negativo, C+: controle positivo, AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular, PTA: ponta. Cães *Beagles*: Bg 10, Bg11, Bg12, Bg13 e Bg14.

6.3.2- Avaliação do parasitismo cardíaco por meio da reação de imuno-histoquímica (IMH) anti-*T. cruzi*

O parasitismo tecidual foi quantificado em fragmentos cardíacos submetidos à reação de imuno-histoquímica (IMH). Para esta quantificação foram avaliados 30 campos microscópicos aleatórios, totalizando 720 campos por grupo experimental. Nos fragmentos coletados dos animais necropsiados na fase aguda da infecção, o parasito foi detectado em pelo menos um dos fragmentos cardíacos analisados de todos os animais.

Considerando o número de fragmentos positivos por grupo, num universo de 24 fragmentos, foi calculada a taxa de positividade por cepa. Desta maneira foi obtida uma taxa de 95,8% (23/24) de positividade para os animais inoculados com a cepa Be-78; de 70,8% (17/24) para os animais inoculados com a cepa ABC e apenas ($p < 0,05$) 29,2% (7/24) dos fragmentos obtidos dos cães inoculados com a cepa Y apresentaram amastigotas isoladas ou em ninhos (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição da positividade da técnica de imuno-histoquímica, realizada nos diferentes fragmentos cardíacos de cães infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda da infecção.

Fragmentos cardíacos	Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i>		
	Be-78	Y	ABC
	Nº de fragmentos positivos/ total de cães		
AD	4/4	2/4	2/4
AE	3/4	0/4	2/4
VD	4/4	0/4	4/4
VE	4/4	3/4	4/4
SI	4/4	1/4	3/4
PTA	4/4	1/4	2/4
nº de frag + /Total de frag /total de cães	(23/24/4)	(7/24/4)	(17/24/4)
(%+)	95,8	29,2*	70,8

Nota: nº de frag +: nº de fragmentos positivos, %+: percentagem de positividade, AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular, PTA: ponta.

* $p < 0,05$ – diferença significativa, quando a positividade da IMH realizada em fragmentos cardíacos dos animais inoculados com a cepa Y foi comparada a dos animais inoculados com as cepas Be-78 e ABC.

A intensidade do parasitismo tecidual visualizado após a realização da técnica de imuno-histoquímica variou entre os animais inoculados com as diferentes cepas do *T. cruzi*. Desta maneira, foram observadas 101 amastigotas isoladas/720 campos e 183 ninhos de amastigotas/720 campos nos fragmentos obtidos do coração dos animais inoculados com a cepa Be-78. Nestes fragmentos, a maioria dos ninhos de amastigotas estava íntegro, sem processo inflamatório associado, sendo observada inflamação, principalmente, próxima às amastigotas isoladas (ninhos rompidos). Nos fragmentos dos tecidos dos animais inoculados com a cepa Y, foi observado intenso processo inflamatório e escassos ninhos de amastigotas (4 ninhos/720 campos), porém, foi observado um maior número de amastigotas isoladas (52 amastigotas/720 campos) ou pequenos grupos de amastigotas associadas às células inflamatórias. Por outro lado, o parasitismo no tecido cardíaco dos animais inoculados com a cepa ABC mostrou padrão intermediário entre os inoculados com a cepa Be-78 ou Y, onde foram observadas 20 amastigotas isoladas/720 campos e 53 ninhos/720 campos. Tanto as amastigotas isoladas quanto os ninhos foram observados associados ao processo inflamatório (Tabela 9, Figura 3).

Na fase crônica da infecção, foram realizadas análises imuno-histoquímica a semelhança das realizadas na fase aguda. Entretanto, nenhum parasito foi observado nos fragmentos cardíacos dos animais eutanasiados nesta fase da infecção (24 meses após a inoculação).

Tabela 9 – Distribuição da intensidade do parasitismo tecidual, observado após a realização da técnica de imuno-histoquímica, nos diferentes fragmentos cardíacos de cães inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda da infecção.

Fragmentos cardíacos	Cepa do <i>Trypanosoma cruzi</i>					
	Be-78		Y		ABC	
	Parasitismo tecidual (Fase aguda)					
	Amastigotas isoladas		Amastigotas isoladas		Amastigotas isoladas	
	Ninhos	Ninhos	Ninhos	Ninhos	Ninhos	Ninhos
AD	19	52	30	0	6	0
AE	16	18	0	0	4	4
VD	22	30	0	0	1	20
VE	13	30	21	3	2	5
SI	8	27	1	0	7	16
PTA	23	26	0	1	0	8
TOTAL	101	183	52	4	20	53

Nota: AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular, PTA: ponta, A: amastigotas isoladas, N: ninhos de amastigotas.

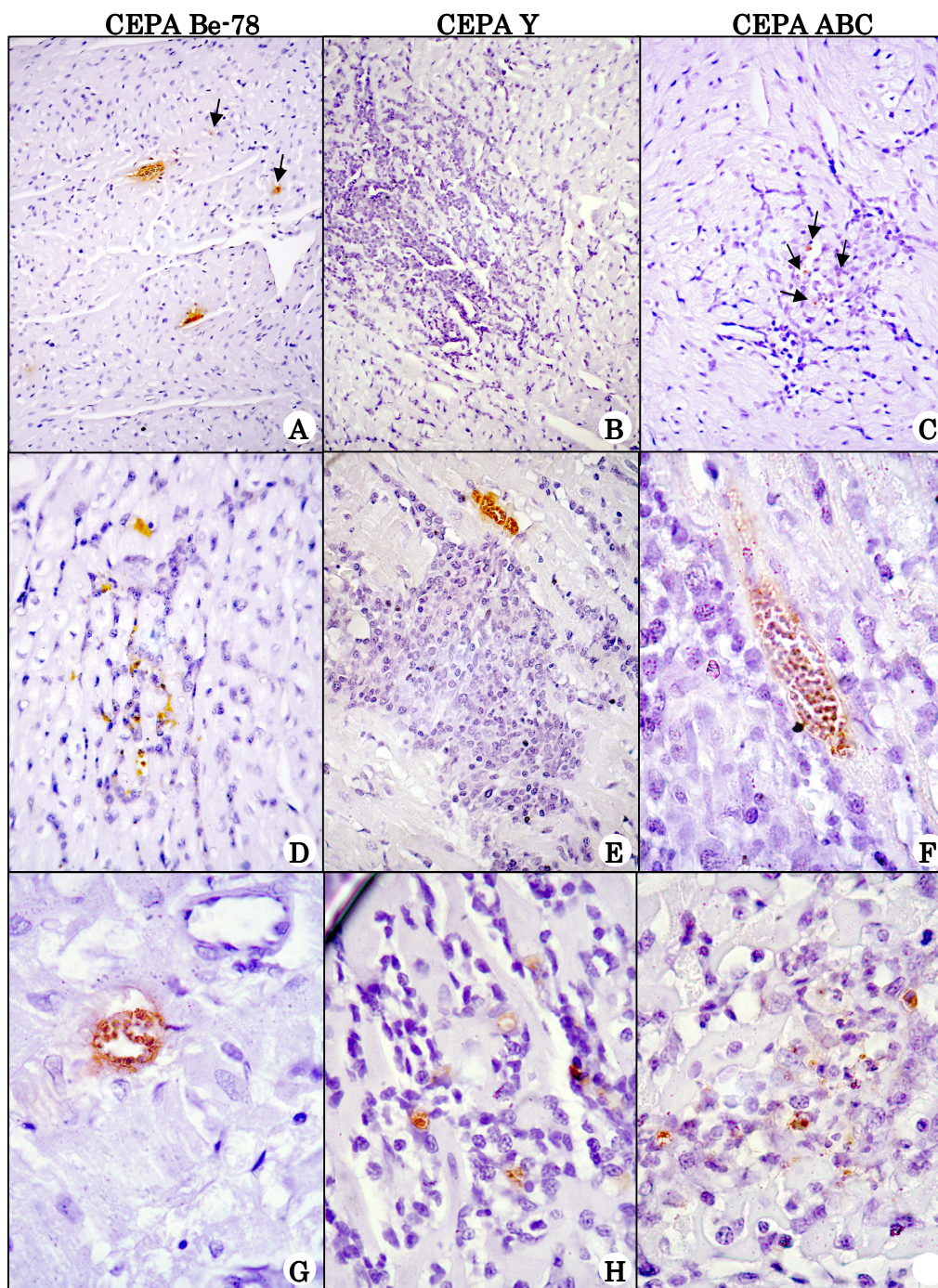


Figura 3 – Fotomicrografias do miocárdio de cães *Beagle* infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi* e eutanasiados na fase aguda. *Parasitismo*: A: ninhos de amastigotas ou amastigotas isoladas (setas) com ausência de processo inflamatório; B: processo inflamatório intenso e ausência de parasitismo; C: processo inflamatório moderado e amastigotas isoladas; D: amastigotas isoladas e discreto processo inflamatório; E: ninho de amastigotas próximo a foco inflamatório; F: ninho de amastigotas no contexto de um foco inflamatório; G: ninho de amastigotas e ausência de inflamação; H e I: amastigotas isoladas e inflamação em torno. Imuno-histoquímica Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP). A, B e C: X 160; E: X300; D, F, G, H e I: X1000.

6.3.3- Comparação entre os resultados obtidos pela Hemocultura, PCR em amostras de sangue e de tecidos cardíacos (24 meses após a inoculação)

Os resultados obtidos pelas técnicas de Hc, PCR em amostras de sangue (S-PCR) e de tecido cardíaco (T-PCR) realizadas pareadamente, 24 meses após a inoculação dos animais com 4000 TS das cepas Be-78, Y ou ABC (Gráfico 6), mostraram maior positividade para a T-PCR em relação à Hc ($p < 0,025$). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre a Hc e S-PCR e nem entre a S-PCR e T-PCR. A positividade dos três testes foi 100% para T-PCR, 66,7% para S-PCR e 33% para Hc. A sensibilidade da Hc em relação a S-PCR foi 50%, da Hc em relação a T-PCR foi de 33,3% e da S-PCR em relação a T-PCR foi de 66,7%. Estes resultados mostraram maior sensibilidade da T-PCR (Tabela 10)

Todos os testes realizados em amostras obtidas dos animais infectados com a cepa Be-78 mostraram freqüência de testes positivos similares, mostrando maior correlação entre os níveis de parasitos no sangue periférico e no tecido cardíaco. Do mesmo modo, nos animais inoculados com a cepa ABC, a positividade do S-PCR e T-PCR foi similar, mas os parasitos foram detectados com freqüência significativamente menor pela Hc (Gráfico 6). Por outro lado, enquanto o parasitismo tecidual foi detectado em todos os animais inoculados com a cepa Y pela T-PCR, o parasitismo sanguíneo não foi detectado em nenhum animal avaliado pela Hc e S-PCR. De forma semelhante, os três testes realizados 24 meses após a inoculação dos animais com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y, apresentaram o mesmo perfil observado para os animais inoculados com 4000 TS das respectivas cepas. Desta maneira, o tamanho do inóculo não interferiu nos resultados (Gráfico 6).

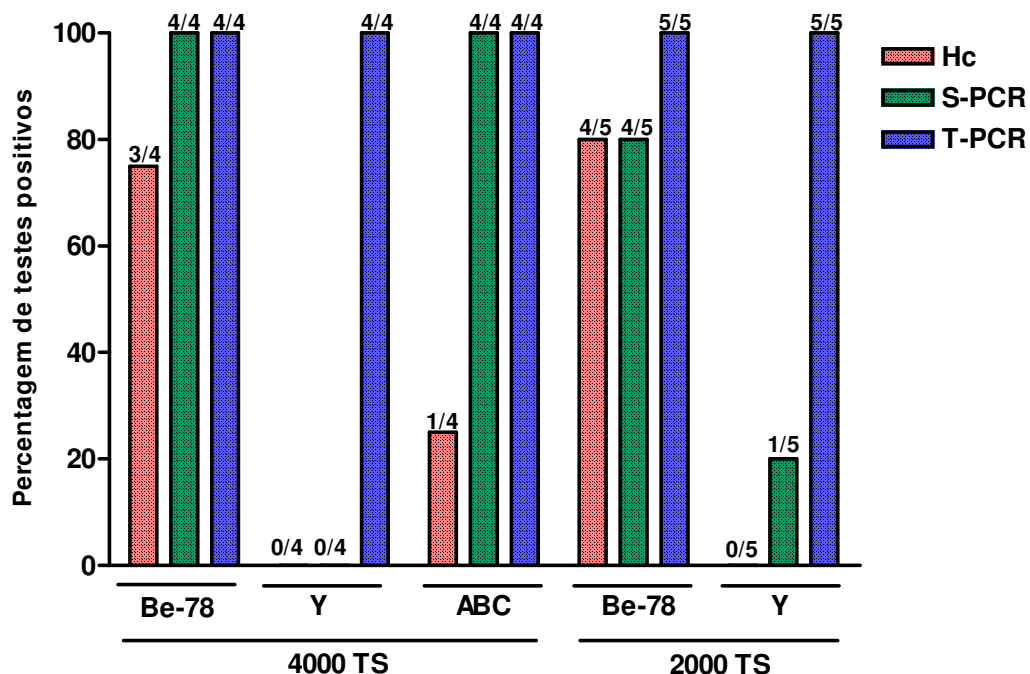


Gráfico 6 – Comparação entre os resultados obtidos pela hemocultura (Hc), PCR em amostras de sangue (S-PCR) e tecidos (T-PCR) realizados após 24 meses da infecção de 12 cães *Beagle* com 4000 tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* (TS) das cepas Be-78, Y ou ABC, ou 10 cães *Beagle* inoculados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y.

Tabela 10 – Comparação entre os resultados obtidos pela hemocultura (Hc), PCR em amostras de sangue (S-PCR) e tecidos (T-PCR) realizados após 24 meses da inoculação de 12 cães *Beagle* com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC.

	Fase crônica (24 meses após a infecção)		
	(%) Testes positivos		
Hc+/S-PCR+/T-PCR+	4/12 (33.3%)		
Hc+/S-PCR-/T-PCR+	4/12 (33.3%)		
Hc-/S-PCR+/T-PCR+	8/12 (66.7%)		
Hc-/S-PCR-/T-PCR+	4/12 (33.3%)		
Hc-/S-PCR-/T-PCR-	0%		
	Hc x S-PCR	Hc x T-PCR	S-PCR x T-PCR
χ^2 McNemar	NS	$P < 0.05$	NS
Sensibilidade	50%	33.3%	66.7%

Nota: + positivo, - negativo. $p < 0,05$ – diferença significativa, quando a positividade dos testes de Hc e T-PCR realizados após 24 meses de infecção foram comparados.

6.4- Avaliação histopatológica de fragmentos do coração por meio das técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE) e de Tricrômico de Masson

6.4.1. Fase aguda

Os fragmentos do coração (AD, AE, VD, VE, SI e PTA) foram avaliados histologicamente utilizando as colorações HE e Tricrômico de Masson. Inicialmente, foram definidos os padrões histopatológicos para cada parâmetro avaliado (infiltração de células adiposas, inflamação e neoformação de colágeno). As Figuras 4, 5 e 6 são representativas da distribuição normal, discreta, moderada e intensa de células adiposas, inflamação e neoformação de colágeno, respectivamente.

O AD de 50% dos animais pertencentes ao grupo CNI apresentou grau moderado para o parâmetro neoformação de colágeno. Nos demais fragmentos cardíacos foram observados padrões histopatológicos compatíveis com a normalidade.

De uma maneira geral, os animais infectados com as diferentes cepas do *T. cruzi* apresentaram alterações histológicas do tecido cardíaco para a maioria dos parâmetros avaliados. Estas alterações foram significativamente maiores em relação apenas ao grupo controle. Entre os grupos infectados, a análise estatística não revelou diferenças significativas.

No Gráfico 7 está representada a percentagem de animais que apresentaram distribuição de células adiposas normal, rara, discreta, moderada ou intensa, detectada nas diferentes regiões do coração dos animais infectados com as cepas Be-78, Y ou ABC, e eutanasiados na fase aguda da infecção, comparativamente ao grupo controle. Nos animais inoculados com a cepa Y, a presença de infiltrado de c adiposo foi detectada com maior frequência nos diferentes fragmentos cardíacos avaliados. Esta diferença foi menos marcante nos animais inoculados com a cepa ABC em relação aos animais inoculados com a cepa Y, sendo observado uma maior intensidade apenas no AD. Não foi observada diferença significativa, no parâmetro infiltrado de células adiposas, entre os animais inoculados com a cepa Be-78 e os animais do grupo CNI.

O Gráfico 8 mostra os resultados da avaliação do processo inflamatório observados durante a fase aguda da infecção. Nesse parâmetro verificou-se diferença significativa entre os animais infectados com as cepas Y ou ABC e os animais do grupo controle ($p < 0,05$) em todos os fragmentos cardíacos avaliados, enquanto, nos animais infectados com a cepa Be-78, esta diferença foi observada apenas no AD.

No Gráfico 9 está representada a percentagem de animais com distribuição de colágeno normal, rara, discreta, moderada, intensa ou muito intensa, detectada nas diferentes regiões do coração dos animais infectados com as cepas Be-78, Y ou ABC, e eutanasiados na fase aguda da infecção e dos animais pertencentes ao grupo controle. Nesse parâmetro verificou-se diferença significativa entre os animais infectados com a cepa Y e os animais do grupo controle ($p < 0,05$) nos fragmentos AE e SI. Para os animais inoculados com a cepa ABC, esta diferença foi observada nos fragmentos VE, SI e PTA.

A análise estatística comparativa entre os diferentes fragmentos de um mesmo grupo de animais demonstrou diferença significativa apenas entre os fragmentos AD x VD ($p < 0,05$) dos animais inoculados com a cepa ABC durante a fase aguda da infecção em relação ao parâmetro inflamação.

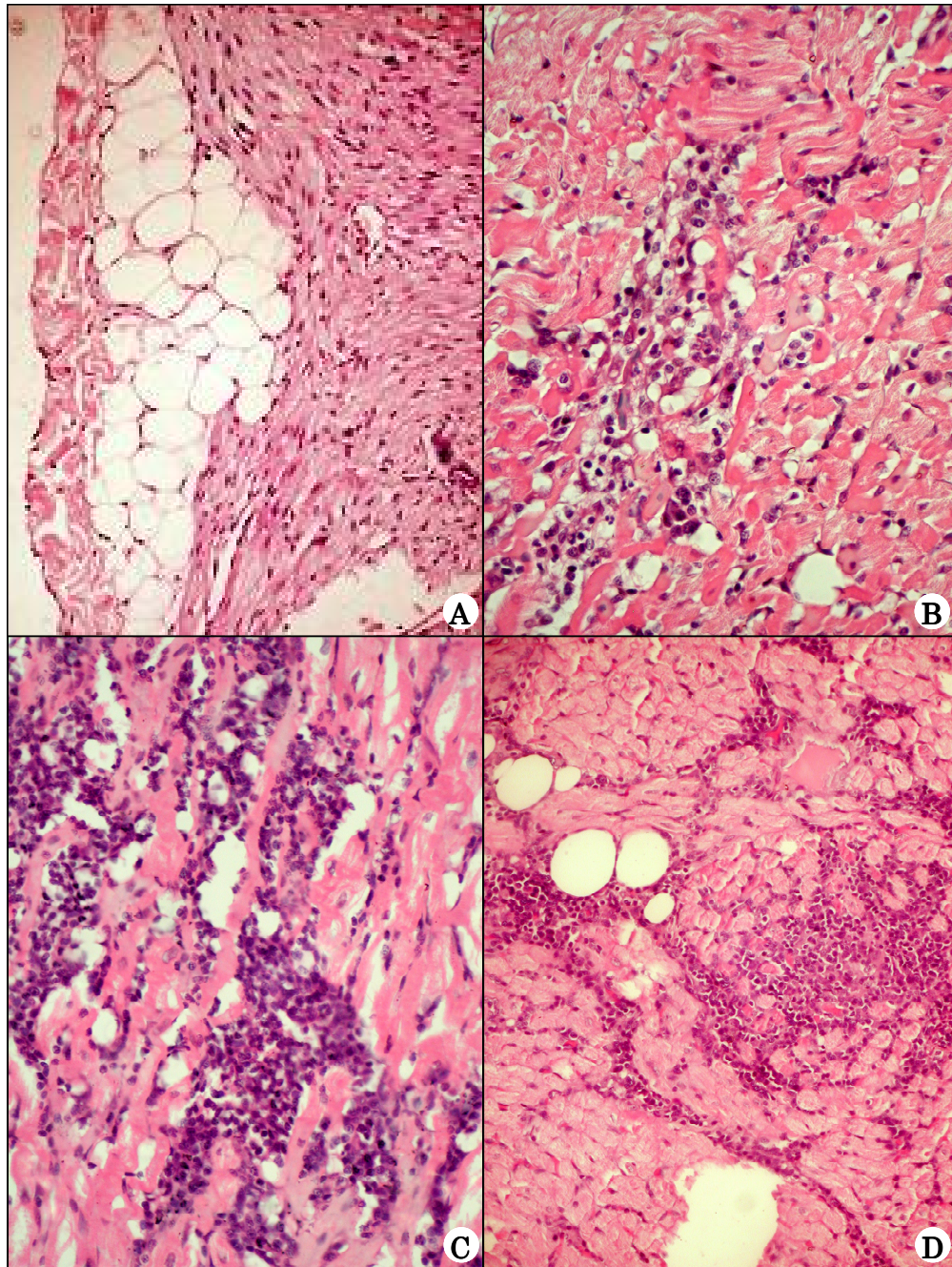
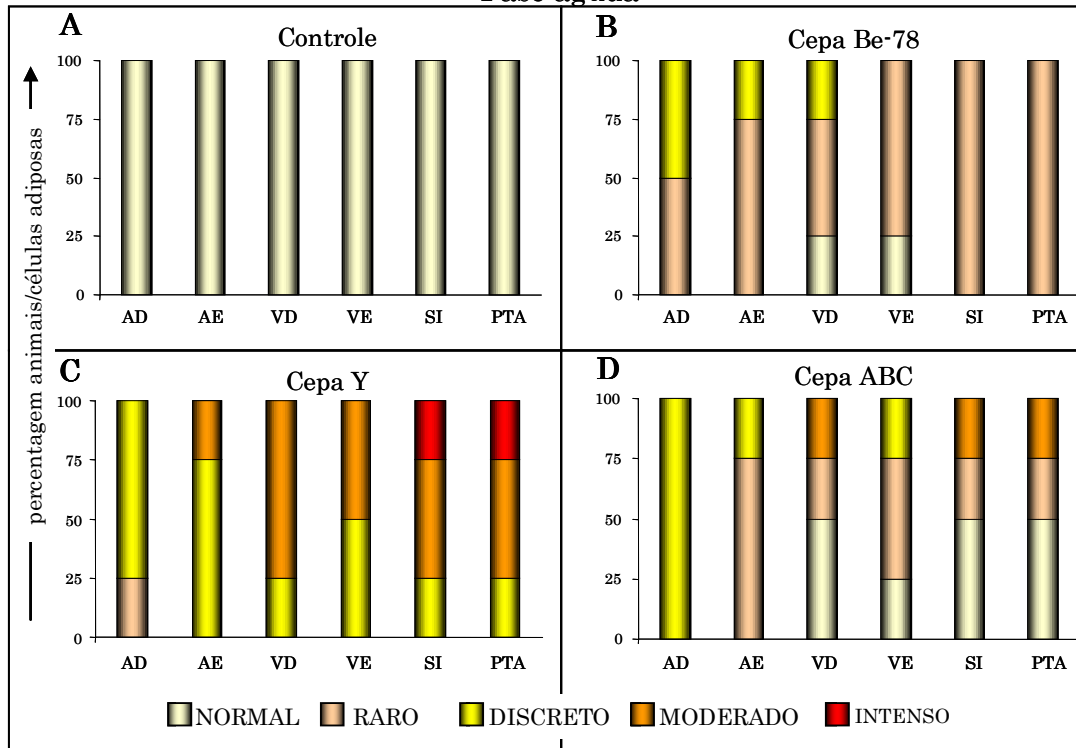


Figura 4 – Fotomicrografias padrão do miocárdio de cães *Beagle* controle e infectados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. A: presença de células adiposas com distribuição periférica, observada principalmente nos átrios e células adiposas distribuídas de forma: B: discreta, C: moderada e D: intensa, no contexto do processo inflamatório. Hematoxilina-Eosina. A, B e C: X600; D: X160.

Fase aguda



	AD	AE	VD	VE	SI	PTA
Be-78	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Y	#	#	#	#	#	#
ABC	#	NS	NS	NS	NS	NS

diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$

NS: não significativo

Teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*

Gráfico 7 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram presença de infiltrado de células adiposas nos diferentes fragmentos do coração, A: grupos controle e B, C e D: infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase aguda da infecção.

Nota: AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular e PTA: ponta, (n=4 animais/grupo).

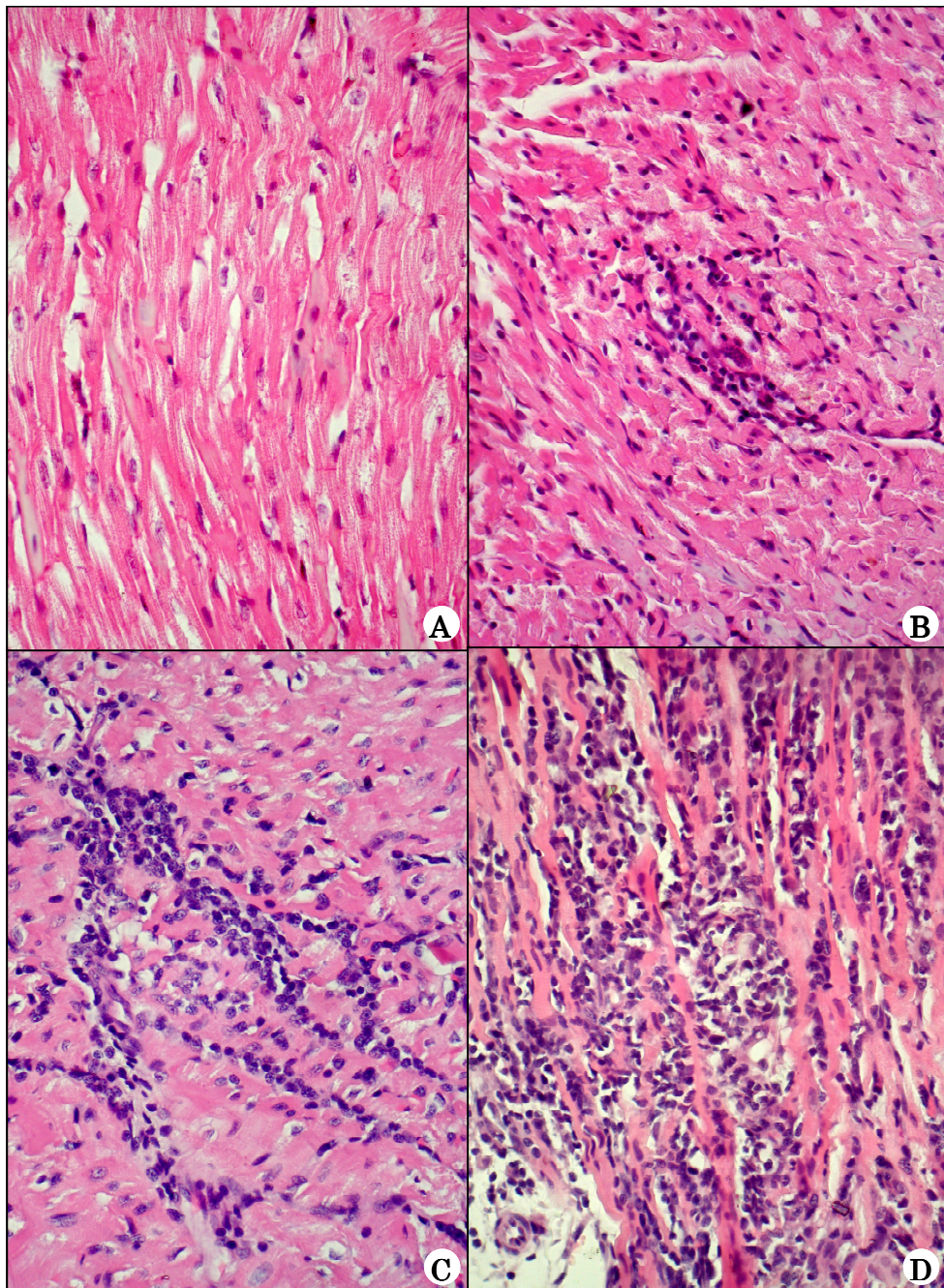
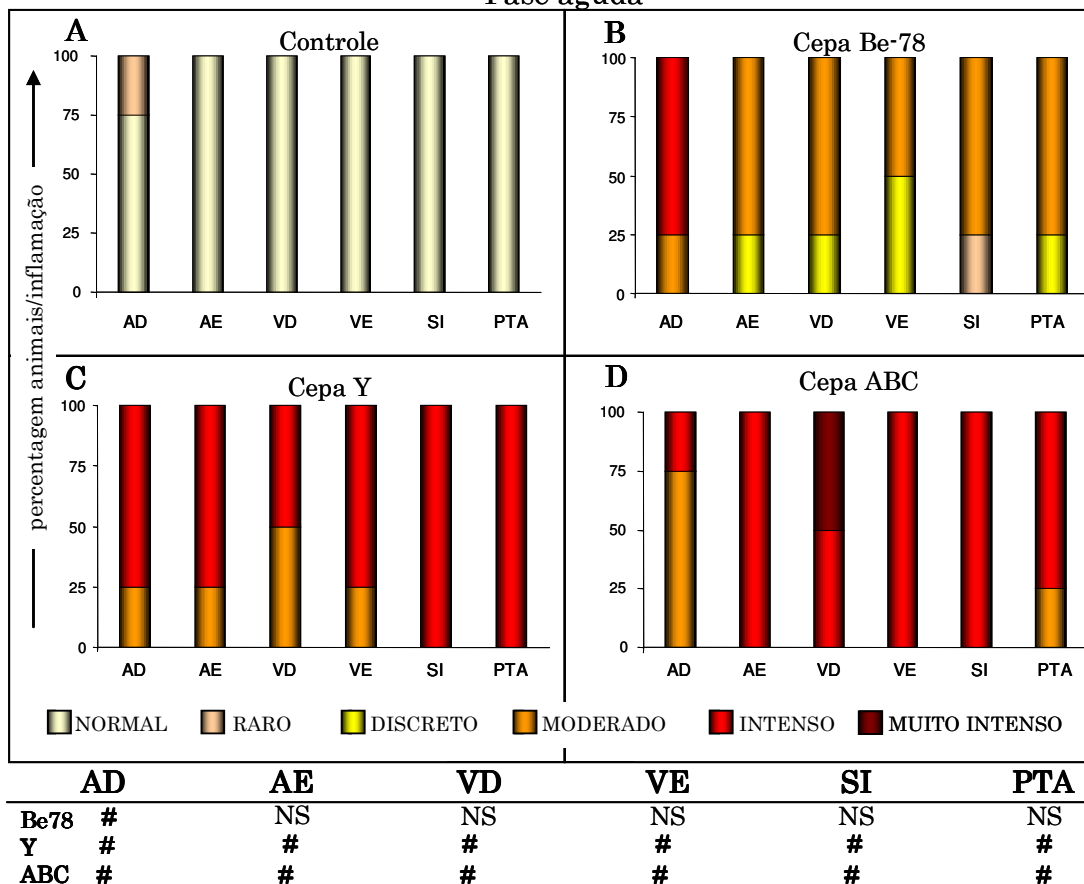


Figura 5 – Fotomicrografias padrão do miocárdio de cães *Beagle* controle e infectados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. A: Miocárdio normal; B: com processo inflamatório discreto constituído predominantemente por células mononucleadas, C: moderado e D: intenso. Hematoxilina-Eosina, X600.

Fase aguda



diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$

NS: não significativo

Teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*

Gráfico 8 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram processo inflamatório nos diferentes fragmentos do coração, A: grupos controle e B, C e D: infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase aguda da infecção.

Nota: AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular e PTA: ponta, (n=4 animais por grupo).

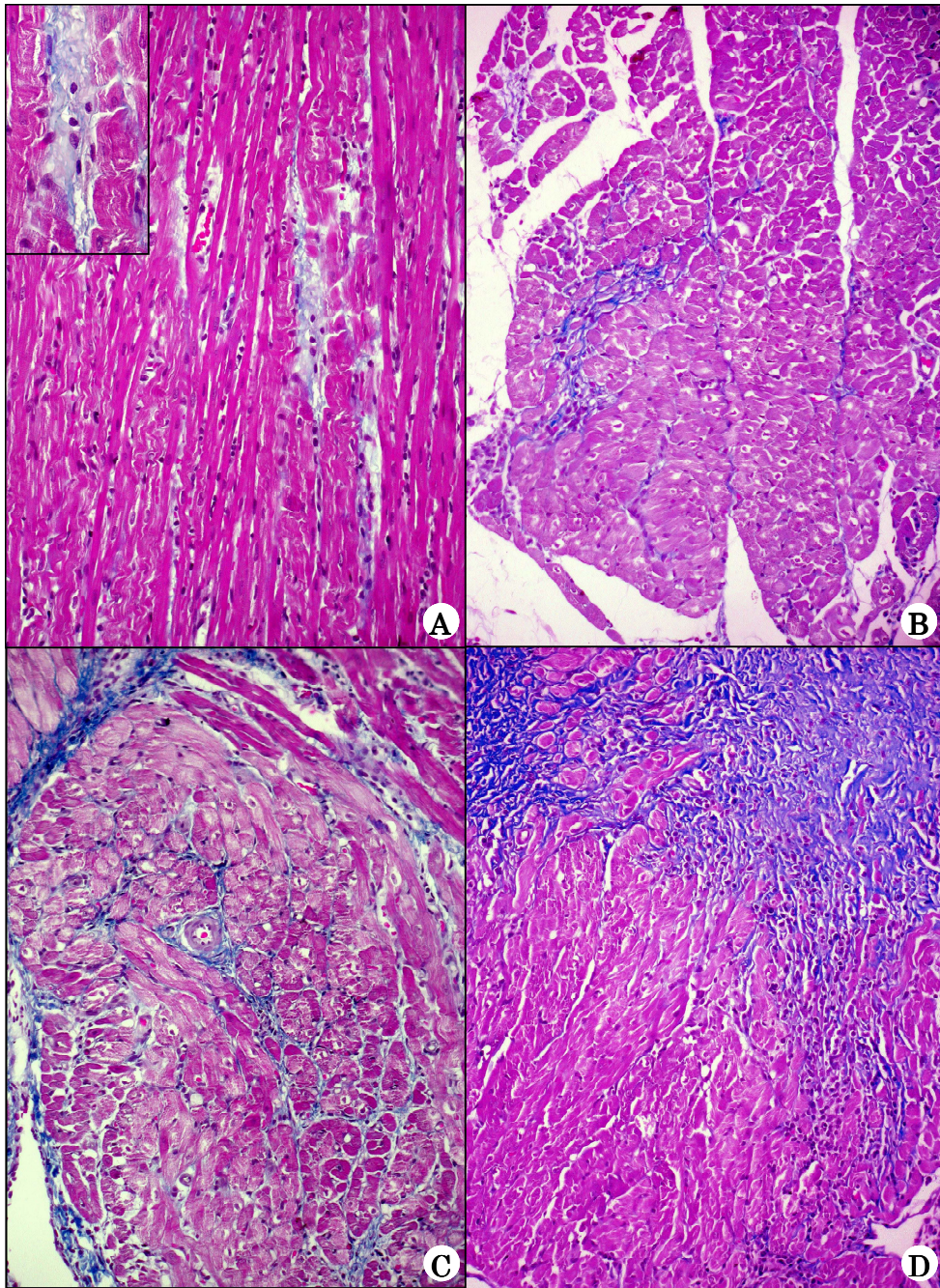
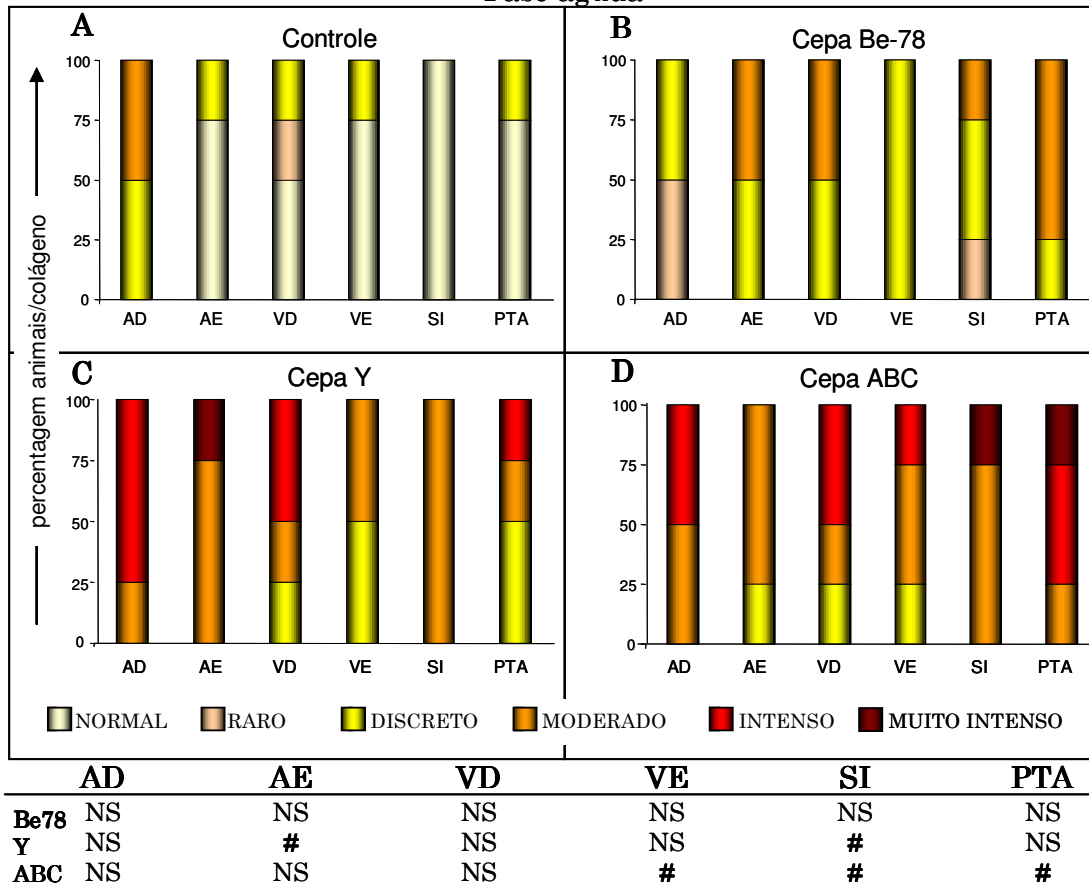


Figura 6 – Fotomicrografias padrão do miocárdio de cães *Beagle* controle e infectados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. A: Padrão de distribuição de colágeno considerado normal observado em azul escassamente distribuído em torno dos vasos e entre as fibras cardíacas,; B: aumento discreto, C: moderado e D: intenso. Tricrômico de Masson, X160; “insert”: X600.

Fase aguda



diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$

NS: não significativo

Teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*

Gráfico 9 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram presença de colágeno nos diferentes fragmentos do coração, A: grupos controle e B, C e D: infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase aguda da infecção.

Nota: AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular e PTA: ponta, (n=4 animais por grupo).

6.4.2. Fase crônica

Nos animais pertencentes ao grupo CNI de fase crônica foram observados padrões histopatológicos compatíveis com normalidade em relação ao parâmetro fibrose (presença de colágeno) na maioria dos fragmentos, exceto para o AD, onde 40% dos animais apresentaram grau moderado. A análise semi-quantitativa dos seis fragmentos do coração dos animais eutanasiados 24 meses após a infecção não revelou diferença significativa em nenhum dos fragmentos para o parâmetro presença de tecido adiposo.

Nos fragmentos obtidos dos animais inoculados com a cepa Be-78, exceto para o AD, foram observadas diferenças significativas no parâmetro presença de inflamação, quando comparados com os fragmentos cardíacos do grupo CNI. Embora fosse encontrada diferença significativa, a intensidade da inflamação variou de discreta a moderada, sendo observado um padrão principalmente focal, às vezes perivascular (Figura 7A), podendo apresentar-se difuso inclusive com epicardite. Estes resultados foram opostos aos observados na fase aguda, uma vez que, nesta fase da infecção, os fragmentos dos animais inoculados com esta cepa, foram os únicos que não apresentaram diferença significativa em relação aos dos controles nesse parâmetro (Gráfico 10).

A presença de fibrose foi observada com maior intensidade nos fragmentos dos animais pertencentes ao grupo infectado com a cepa Y (Figura 7B), menos intenso nos cães infectados com a cepa ABC e discreta nos animais inoculados com a cepa Be-78. Curiosamente, os animais inoculados com a cepa Y apresentaram diferença significativa no parâmetro inflamação em todos os fragmentos avaliados na fase aguda e foram os únicos a apresentarem diferença significativa no parâmetro fibrose na fase crônica. Por outro lado, os animais inoculados com a cepa ABC também apresentaram processo inflamatório acentuado na fase aguda, porém, a análise estatística não mostrou diferença significativa no parâmetro fibrose, em relação ao grupo controle, na fase crônica da infecção (Gráfico 11). Nos fragmentos do coração dos animais infectados com a cepa ABC, chama atenção a presença de intenso processo degenerativo (Figura 7C).

A análise estatística comparativa entre os diferentes fragmentos de um mesmo grupo de animais demonstrou diferença significativa apenas entre os

fragmentos AD x VD ($P < 0,05$) dos animais inoculados com a cepa Be-78, em relação ao parâmetro fibrose. Dos animais inoculados com 2000 TS das cepas Be-78 ou Y, apenas os inoculados com a cepa Be-78 apresentaram diferença significativa no VE, SI e PTA, no parâmetro inflamação (Gráfico 12).

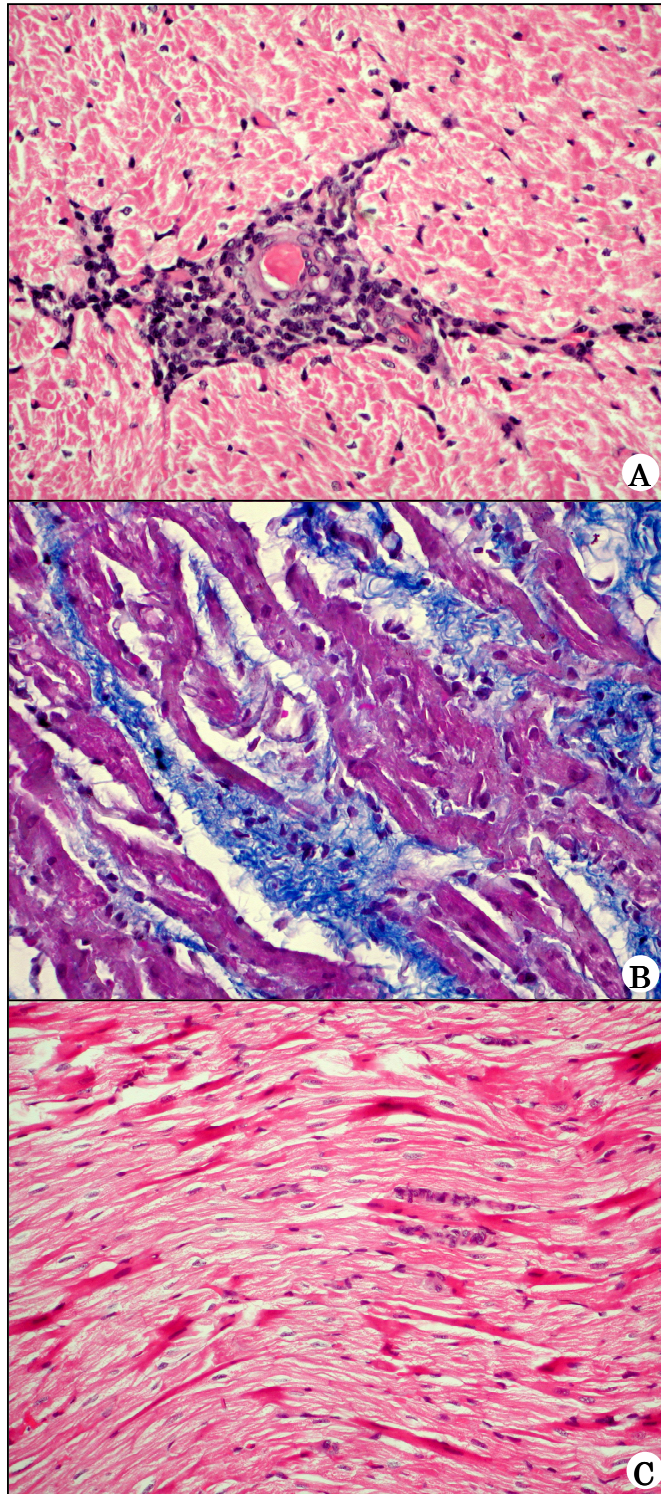
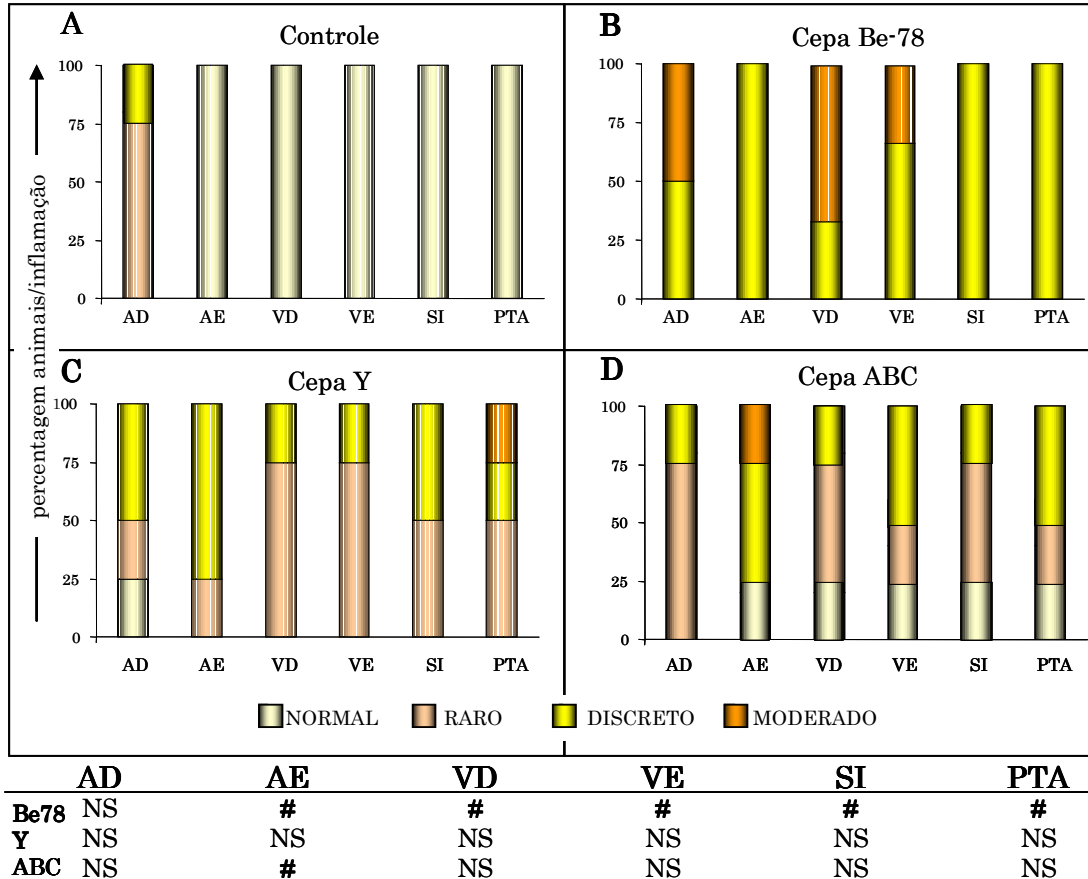


Figura 7 – Fotomicrografias representativas do miocárdio de cães *Beagle* infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase crônica. (A) Cepa Be-78: foco inflamatório perivascular, Hematoxilina-Eosina, X600; (B) Cepa Y: fibrose, Tricrômico de Masson, X600; (C) Cepa ABC: degeneração hialina, Hematoxilina-Eosina, X600.

Fase crônica – 4000 TS



diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$

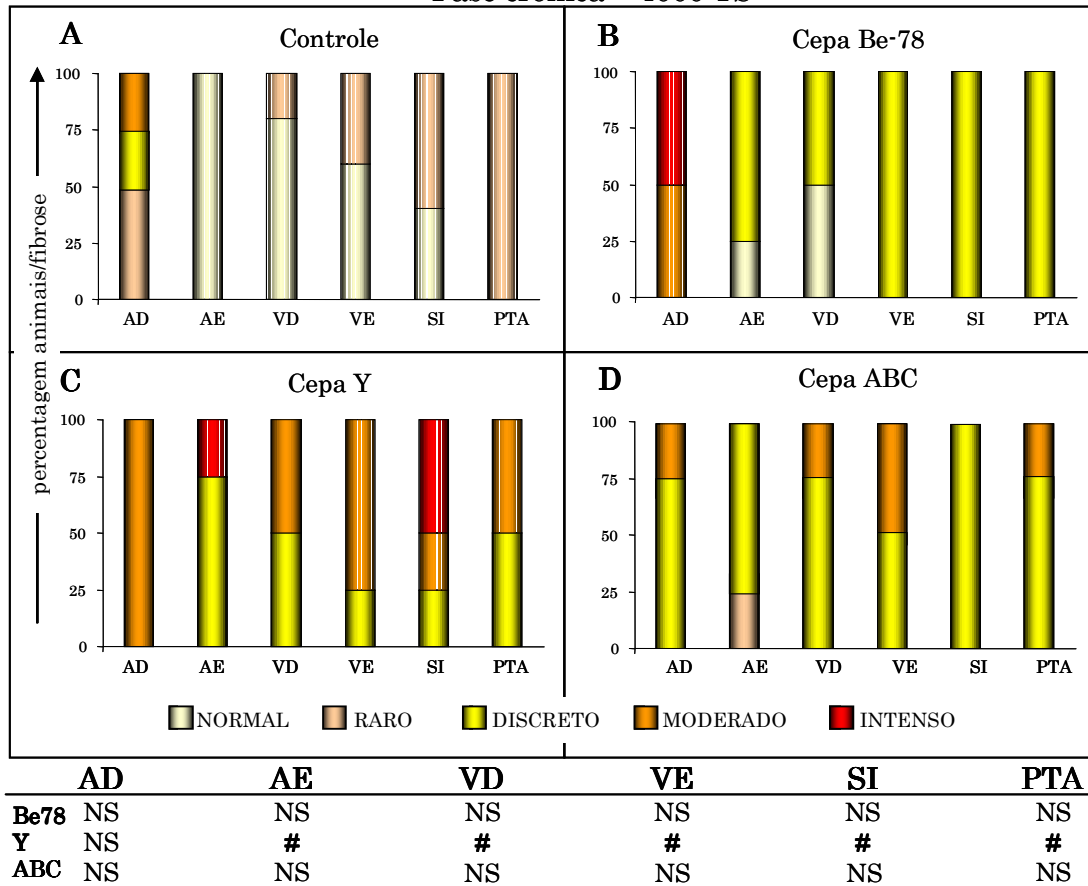
NS: não significativo

Teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*

Gráfico 10 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram processo inflamatório nos diferentes fragmentos do coração, (A) grupos controle e (B), (C) e (D) infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase crônica da infecção.

Nota: AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular e PTA: ponta, (n=4 animais por grupo).

Fase crônica – 4000 TS



diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$

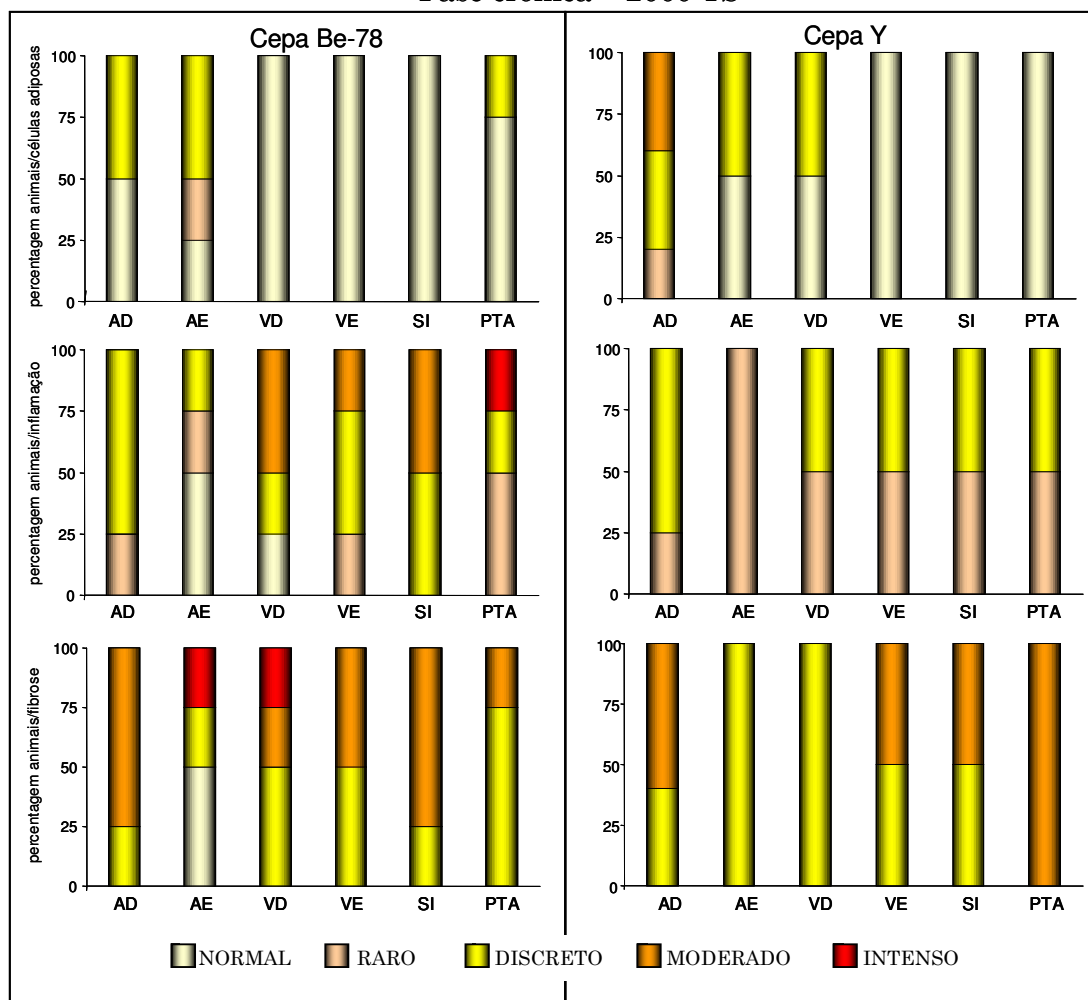
NS: não significativo

Teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*

Gráfico 11 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram fibrose nos diferentes fragmentos do coração, (A) grupos controle e (B), (C) e (D) infectados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78, Y ou ABC do *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. Os animais foram eutanasiados na fase crônica da infecção.

Nota: AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular e PTA: ponta, (n=4 animais por grupo).

Fase crônica – 2000 TS



		AD	AE	VD	VE	SI	PTA
Inflamação	Be78	NS	NS	NS	#	#	#
	Y	NS	#	NS	NS	NS	NS
Fibrose	Be78	NS	NS	#	NS	NS	NS
	Y	NS	#	NS	NS	NS	NS

#diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$

NS: não significativo

Teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*

Gráfico 12 – Percentagem de cães *Beagle* que apresentaram presença de infiltrado de células adiposas, inflamação e fibrose nos diferentes fragmentos do coração dos animais infectados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Be-78 ou Y do *Trypanosoma cruzi*. Os animais foram eutanasiados na fase crônica da infecção.

Nota: AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito, VE: ventrículo esquerdo, SI: septo interventricular e PTA: ponta, (n=5 animais por grupo).

6.5-Avaliação da variabilidade intraespecífica dos isolados de *Trypanosoma cruzi* de cães inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC pelas técnicas de isoenzimas, RAPD, rDNA, e gene mitocondrial CO II

6.5.1 - Análise do perfil eletroforético de isoenzimas (Zimodema)

A análise do perfil eletroforético de isoenzimas, obtido com quatro enzimas (GPI, PGM, G6PD e IDH), demonstrou que os isolados de *T. cruzi*, recuperados por meio de Hc realizadas em cães experimentalmente infectados com as cepas Be-78 ou ABC, durante as fases aguda (Hc realizada 30 dias após a infecção) e crônica (última Hc positiva até 24 meses) da infecção, apresentaram o mesmo perfil, idêntico ao das respectivas cepas parentais (Be-78 e ABC). Porém, foram observadas diferenças entre os perfis da cepa Y e de duas amostras obtidas de cães distintos inoculados com 4000 TS ou 2000 TS dessa cepa (Figura 8).

A cepa Be-78 e os respectivos isolados de cães inoculados com 4000 ou 2000 TS apresentaram perfil de Z2 para as enzimas GPI, PGM, G6PD e IDH. Assim, o tamanho do inóculo e o tempo transcorrido entre os dois experimentos (18 meses) não influenciaram o resultado (Tabela 11, Figura 8).

O *T. cruzi* foi recuperado de todos os animais inoculados com 4000 TS da cepa Y durante a fase aguda, porém, na fase crônica apenas dois isolados do parasito (Bg 15/12M e Bg 15/21M) foram obtidos de um mesmo animal. Embora o número de isolados seja pequeno, aquele obtido aos 21 meses após a inoculação apresentou perfil de ZB, diferente da cepa parental que apresentou perfil de Z2. Os demais isolados apresentaram perfil idêntico ao da cepa parental (Figura 8C). Esses resultados apresentaram correlação com os obtidos pela amplificação do DNA genômico por meio da técnica de RAPD onde a diversidade genética do isolado Bg 15/21M foi evidenciada pelo polimorfismo de tamanho de banda (Figura 9 - destaque em vermelho) e também pela análise do polimorfismo do gene Citocromo Oxidase II (Figura 12- destaque em vermelho). De forma semelhante, ao grupo de animais inoculados com 4000 TS, o único isolado (Bg 10/12M) obtido aos 12 meses após a inoculação dos animais pertencentes ao grupo 2000 TS da cepa Y (Z2) apresentou perfil eletroforético diferente da cepa parental, porém, esse isolado apresentou perfil ZC para a enzima GPI, e ZB para as outras enzimas. (Tabela 11; Figura 8).

Observa-se na Tabela 11 que todos os isolados obtidos dos cães inoculados com a cepa ABC apresentaram perfil ZB para as quatro enzimas estudadas, idênticos aos da cepa parental.

Tabela 11 – Perfis de Zimodemas apresentados pelas cepas Be-78, Y e ABC e pelas populações isoladas de cães experimentalmente infectados com 4000 ou 2000 TS do *Trypanosoma cruzi*.

Enzima	4000 TS									2000 TS				
	Be-78			Y			ABC			Be-78			Y	
	P	FA	FC	P	FA	FC	P	FA	FC	P	FA	FC	P	FC
GPI	Z2	Z2	Z2	Z2	Z2	Z2	ZB	ZB	ZB	Z2	Z2	Z2	Z2	Z ₂
						ZB*								ZC*
PGM	Z2	Z2	Z2	Z2	Z2	Z2	ZB	ZB	ZB	Z2	Z2	Z2	Z2	ZB*
						ZB*								
G6PD	Z2	Z2	Z2	Z2	Z2	Z2	ZB	ZB	ZB	Z2	Z2	Z2	Z2	ZB*
						ZB*								
IDH	Z2	Z2	Z2	Z2	Z2	Z2	ZB	ZB	ZB	Z2	Z2	Z2	Z2	ZB*
						ZB*								

Nota P – cepa parental; FA – população isolada na fase aguda (30 dias após a infecção); FC – população isolada na fase crônica (última Hc positiva até 24 meses).

Z2 – Zimodema 2 - Miles *et al.* (1977).

ZB e ZC - Zimodema B e C, respectivamente - Romanha *et al.* (1979).

ZB* perfil apresentado pelos isolados da cepa Y – cão Bg 10 e Bg 15 (12 e 21 meses de infecção, respectivamente)

ZC* apresentados pelo isolado da cepa Y - cão Bg 10 (12 meses de infecção)

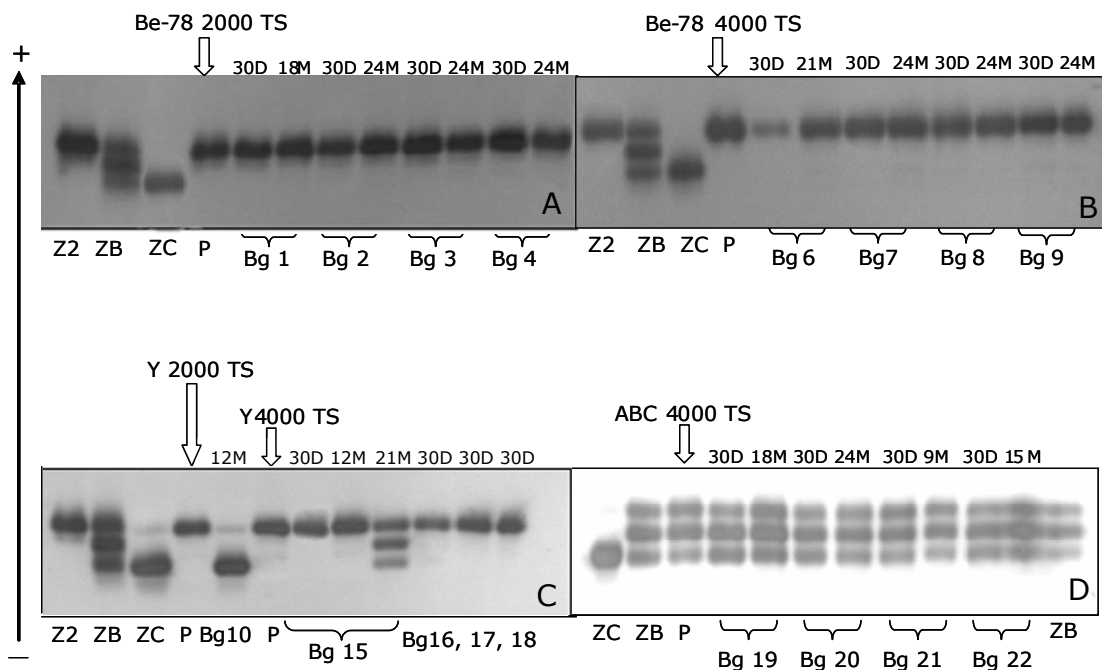


Figura 8 – Perfil eletroforético da enzima GPI, para as cepas parentais: (A) Be-78 - 2000 TS, (B) Be-78 - 4000 TS, (C) Y - 2000 TS e 4000 TS e (D) ABC - 4000 TS do *Trypanosoma cruzi* e dos respectivos isolados de cães *Beagle*, experimentalmente inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou 2000 TS. Os isolados foram obtidos na fase aguda (30 dias após a inoculação) e na fase crônica (entre 9 e 24M após a inoculação).

Nota P – cepa parental; D ou M – dias ou meses após a infecção, respectivamente. Z2 – Zimodema 2 – Miles *et al.* (1977); ZB e ZC – Zimodemas B e C, respectivamente Romanha *et al.* (1979), Bg: *Beagle*, TS: Tripomastigotas sanguíneas.

6.5.2- Perfil de RAPD

O polimorfismo do tamanho de bandas gerado pelo RAPD, obtido com quatro iniciadores (λ gt-11F, λ gt-11R, 3302 e M-13), foi monitorado com o marcador de peso molecular 1kb e as bandas analisadas variaram de 250pb a 3000pb, para as cepas Be-78, Y e ABC e os respectivos isolados obtidos por Hc de cães experimentalmente infectados com essas cepas.

A Figura 9 é representativa da amplificação do DNA do *T. cruzi* pelo RAPD realizado em amostras de DNA das cepas Be-78, Y e ABC e dos respectivos isolados obtidos por Hc de cães infectados com essas cepas e avaliados por 24 meses.

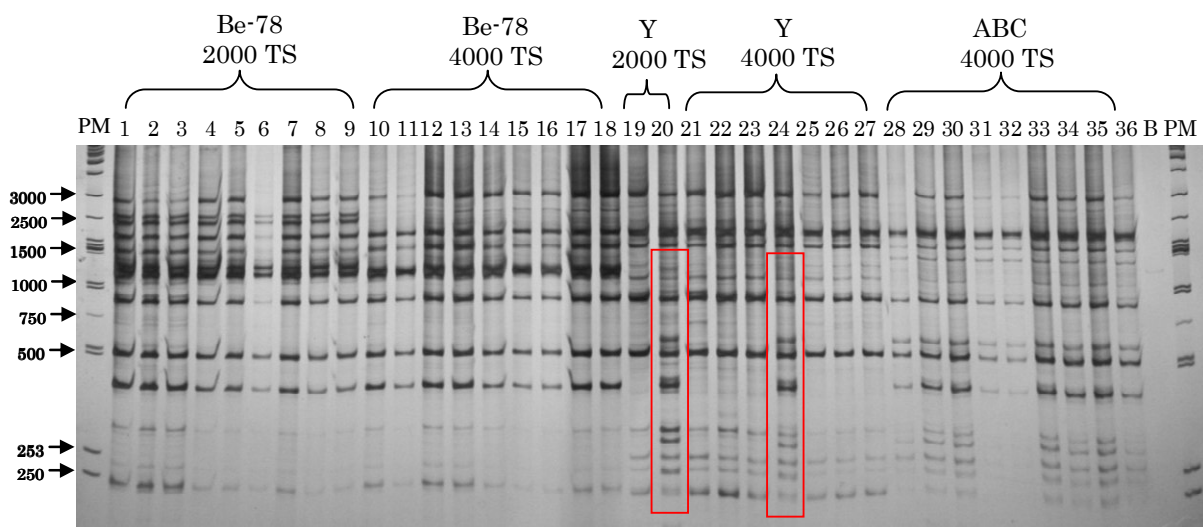


Figura 9 – Gel de poliacrilamida 5% com os perfis de RAPD obtidos com o iniciador (λ gt-11F) determinados para as cepas parentais Be-78, Y e ABC do *Trypanosoma cruzi* e para os respectivos isolados de cães *Beagle* (Bg), inoculados com 4000 ou 2000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS). Os isolados foram obtidos na fase aguda (30 dias (D) após a inoculação) e na fase crônica (entre 9 a 24 meses (M) após a inoculação). Linhas de **1 a 9** – cepa Be-78 parental 2000 TS e respectivos isolados: Bg1(30D e 18M), Bg2(30D e 24M), Bg3(30D e 24M) e Bg4(30D e 24M); Linhas de **10 a 18** – cepa Be-78 parental 4000 TS e respectivos isolados: Bg 6(30D e 21M), Bg7(30D e 24M), Bg8(30D e 24M) e Bg9(30D e 24M); Linhas **19 e 20** – cepa Y parental 2000 TS e o isolado: Bg 10/12M, respectivamente. Linhas de **21 a 27** – cepa Y parental 4000 TS e respectivos isolados: Bg15(30D, 12M e 21M), Bg16(30D), Bg17(30D) e Bg18(30D); Linhas **28 a 36** – cepa ABC parental 4000 TS e respectivos isolados: Bg19(30D e 18M), Bg20(30D e 24M), Bg21(30D e 9M) e Bg22(30D e 15M).

Nota: PM: Marcador de Peso Molecular 1Kb; B: branco (controle negativo da reação).

Destaque em vermelho (isolados que mudaram de perfil).

Uma matriz de coeficiente de similaridade de Dice fundamentada em um pareamento de bandas compartilhadas foi calculada para as amostras permitindo a construção de um fenograma (Figura 10) pela média aritmética não ponderada (UPGMA).

O fenograma permitiu separar as cepas Be-78, Y e ABC e os respectivos isolados em dois grupos distintos. No grupo I foram incluídas a cepa Be-78 (4000 TS e 2000 TS) e os respectivos isolados; a cepa Y, os isolados de fase aguda (Bg 15; 16; 17 e 18) e o isolado Bg 15/12M, sendo essas populações do parasito relacionadas ao grupo mitocondrial C (*T. cruzi* II). No grupo II foram incluídas a cepa ABC com seus isolados e dois isolados da cepa Y (Bg10/12M e Bg15/21M). Essas populações foram relacionadas ao grupo mitocondrial B, (*T. cruzi* III ou híbrido) pela técnica de DNA mit CO II. Foi observada uma subdivisão no grupo I em dois ramos. Em um ramo encontram-se as populações da cepa Be-78 que também se subdividiram de acordo com o inóculo e no outro ramo a cepa Y, os isolados de fase aguda e o isolado Bg 15/12M. O grupo II também se dividiu em dois subgrupos: (1) dois isolados da cepa Y; (2) cepa ABC com seus respectivos isolados (figura 10).

Os isolados Bg10/12M e Bg15/21M foram os únicos que se distanciaram da cepa parental. Os demais formaram um grupo correlacionado geneticamente com as respectivas cepas parentais.

A análise dos perfis de RAPD demonstrou a ocorrência de uma alta proporção de bandas compartilhadas nas diferentes populações do *T. cruzi* isoladas de cães inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC. Foi observado um maior compartilhamento entre os isolados de cães inoculados com a cepa ABC. O contrário foi observado entre os isolados de animais inoculados com a cepa Y. O iniciador M-13 apresentou menor poder de discriminação e o λ gt-11R maior. Entretanto, na avaliação intra-grupo o 3302 mostrou melhor discriminação entre os isolados da cepa Y e o λ gt-11R entre os da cepa Be-78 e ABC. As Tabelas 12 e 13 mostram a proporção de bandas compartilhadas inter e intra-grupo e também entre os diferentes iniciadores utilizados.

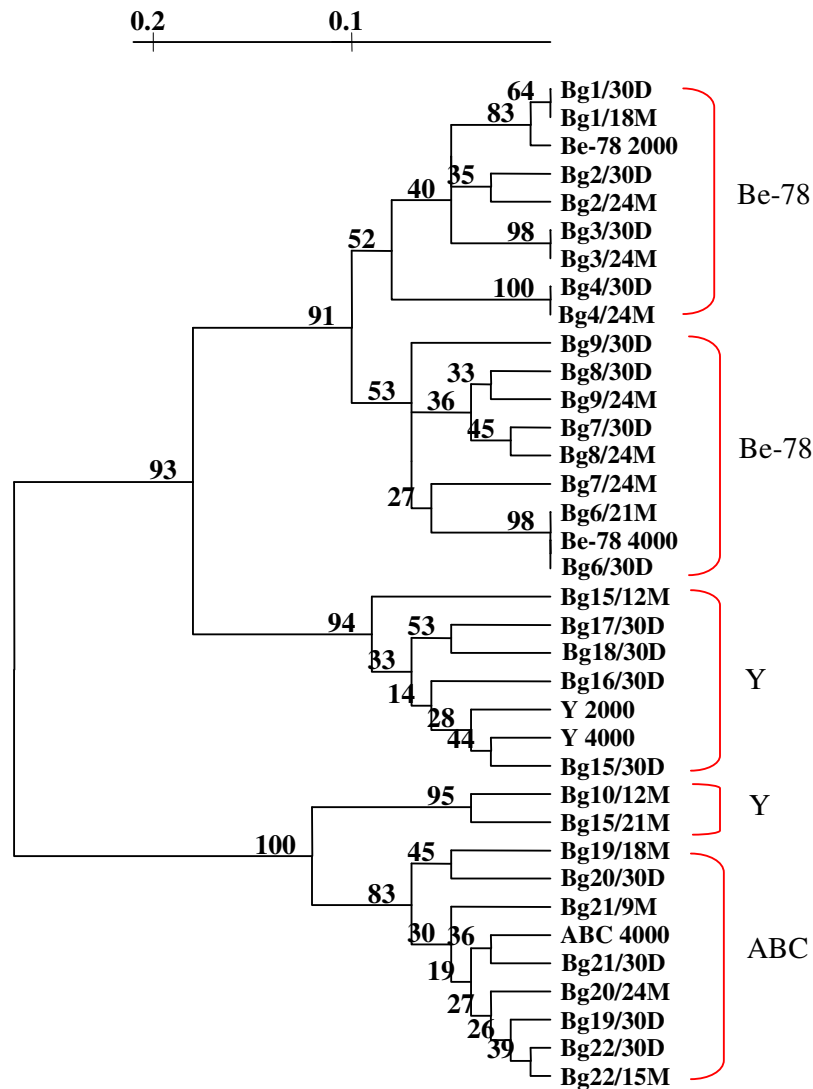


Figura 10 – Fenograma correspondente aos perfis de RAPD, obtidos com os iniciadores (M-13, 3302, λ gt-11F e λ gt-11R), das cepas Be-78, Y e ABC do *Trypanosoma cruzi* e dos respectivos isolados de cães *Beagle* (Bg), inoculados com 4000 ou 2000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS). Os isolados foram obtidos na fase aguda (30 dias (D) após a inoculação) e na fase crônica (entre 9 a 24 meses (M) após a inoculação). Populações do *T. cruzi* utilizadas: cepa Be-78 2000 TS e os respectivos isolados: Bg1(30D e 18M), Bg2(30D e 24M), Bg3(30D e 24M) e Bg4(30D e 24M); cepa Be-78 4000 TS e os respectivos isolados: Bg 6(30D e 21M), Bg7(30D e 24M), Bg8(30D e 24M) e Bg9(30D e 24M); cepa Y 2000 TS e o isolado: Bg 10 (12M); cepa Y 4000 TS e os respectivos isolados: Bg15(30D, 12M e 21M), Bg16 (30D), Bg17(30D) e Bg18(30D); cepa ABC 4000 TS e os respectivos isolados: Bg19(30D e 18M), Bg20(30D e 24M), Bg21(30D e 9M) e Bg22(30D e 15M).

Nota: Os números correspondem aos valores *Bootstrap* (número de vezes em que o agrupamento se manteve durante 1000 reamostragens)

Tabela 12 – Compartilhamento de bandas das assinaturas gênicas (RAPD) obtidas utilizando quatro iniciadores (λ gt-11F, λ gt-11R, 3302, M-13) nas amostras de DNA do *Trypanosoma cruzi* isoladas de cães inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC. Avaliação inter-grupo (Be-78 x Y, Be-78 x ABC, Y x ABC).

Cepas e isolados de cães do <i>T. cruzi</i>			
Iniciadores	Be-78 x Y	Be-78 x ABC	Y x ABC
λgt-11F			
Média de bandas compartilhadas entre os pares	$9,4 \pm 1,3$	$10,1 \pm 1,5$	$11,4 \pm 1,8$
% de bandas compartilhadas	84%	85%	88%
λgt-11R			
Média de bandas compartilhadas	$9,1 \pm 1,4$	$8,9 \pm 1,5$	$9,3 \pm 1,4$
% de bandas compartilhadas	80%	79%	82%
3302			
Média de bandas compartilhadas	$10,3 \pm 1,7$	$9,3 \pm 2,9$	$8,4 \pm 2,4$
% de bandas compartilhadas Geral	84%	74%	71%
M-13			
Média de bandas compartilhadas	$11,8 \pm 0,9$	$11,2 \pm 0,6$	$11,7 \pm 1,0$
% de bandas compartilhadas	97%	94%	96%

Tabela 13 – Compartilhamento de bandas das assinaturas gênicas (RAPD) obtidas utilizando quatro iniciadores (λ gt-11F, λ gt-11R, 3302, M-13) nas amostras de DNA do *Trypanosoma cruzi* isoladas de cães inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC. Avaliação intra-grupo (Be-78 x Be-78, Y x Y e ABC x ABC).

	λ gt-11F			λ gt-11R			3302			M-13		
	Be-78	Y	ABC	Be-78	Y	ABC	Be-78	Y	ABC	Be-78	Y	ABC
Média de bandas por amostra	11 $\pm 1,0$	11,8 $\pm 1,5$	14	11,4 $\pm 1,5$	11,2 $\pm 1,5$	11,1 $\pm 1,1$	12,7 $\pm 0,8$	11,2 $\pm 2,6$	12,6 $\pm 0,7$	11 $\pm 0,5$	11,4 $\pm 0,8$	14
Média de bandas compartilhadas	10,5 $\pm 0,8$	10,4 $\pm 1,0$	14	9,5 ± 2	9,2 $\pm 1,4$	9,7 $\pm 1,3$	11,9 $\pm 0,6$	8,4 $\pm 1,5$	11,3 $\pm 0,8$	11,2 $\pm 0,4$	11,1 $\pm 0,3$	14
% de bandas compartilhadas	95	89	100	83	82	87	94	75	90	98	97	100

6.5.3- Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α

Para a realização da amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α foram utilizadas amostras de DNA das cepas parentais (Be-78, Y e ABC), e também, o DNA dos isolados do parasito, obtidos na fase crônica da infecção de cães inoculados com cada cepa. O produto da amplificação de seqüências do gene rDNA 24S α , visualizado em gel de poliacrilamida correspondeu ao fragmento de 125pb para todas as amostras analisadas. Desta maneira, os resultados obtidos foram homogêneos, sendo essas populações do parasito classificadas como *T. cruzi* II.

A Figura 11 é representativa da amplificação, pela PCR, da região 3' do gene rDNA 24 S α do *T. cruzi* de cada cepa avaliada e um respectivo isolado.

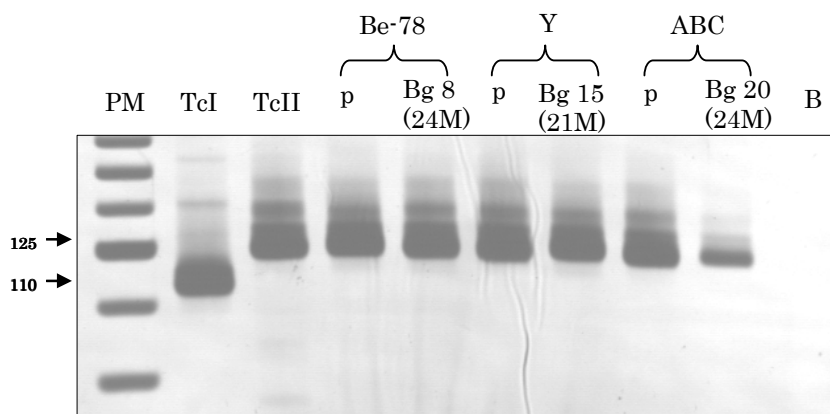


Figura 11 – Gel de poliacrilamida 6% representativo da amplificação, pela PCR, da região 3' do gene rDNA 24 S α das cepas parentais Be-78, Y e ABC do *Trypanosoma cruzi* e dos respectivos isolados de cães *Beagle* (Bg), inoculados com 4000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) dessas cepas. Populações do *T. cruzi* utilizadas: cepa Be-78 e o isolado Bg 8(24M); cepa Y e o isolado Bg 15(21M); cepa ABC e o isolado Bg 20(24M).

Nota: PM: Marcador de Peso Molecular 25pb; O fragmento de 110pb corresponde ao *T. cruzi* I (TcI) e o de 125pb ao *T. cruzi* II (TcII); P: cepa parental; B: Branco (controle negativo da reação).

6.5.4- PCR gene Mitochondrial Citocromo Oxidase subunidade II (CO II)

A figura 12 mostra os produtos de amplificação do gene Mitochondrial, Citocromo Oxidase subunidade II (CO II), após a digestão pela enzima *AluI*, de DNA obtido das cepas Be-78, Y e ABC do *T. cruzi* e das populações isoladas de cães *Beagle* inoculados com 4000 ou 2000 formas tripomastigotas sanguíneos destas cepas.

Os perfis de RFLP obtidos dos fragmentos amplificados do gene COII, permitiram verificar dois tipos diferentes de populações entre as estudadas nesse trabalho. As cepas Be-78 e Y apresentaram as bandas de 81 e 212pb que são indicadoras de cepas relacionadas ao grupo mitocondrial C (*T. cruzi* II). Entretanto, a cepa ABC apresentou os fragmentos de 81 e 294pb, indicativos do grupo mitocondrial B, relacionado às cepas *T. cruzi* III ou às cepas híbridas. Todos os isolados obtidos de cães experimentalmente inoculados com as cepas Be-78 ou ABC apresentaram perfil idêntico aos das respectivas cepas parentais. Entretanto, dois isolados de cães inoculados com a cepa Y (Bg10/12M e Bg15/21M) apresentaram perfis diferentes da cepa parental. Esses dois isolados foram relacionados ao grupo mitocondrial B (*T. cruzi* III ou híbrido), enquanto a cepa Y parental mostrou perfil de *T. cruzi* II (Figura 12). Esses resultados foram concordantes com os observados pela análise do perfil eletroforético de isoenzima e RAPD.

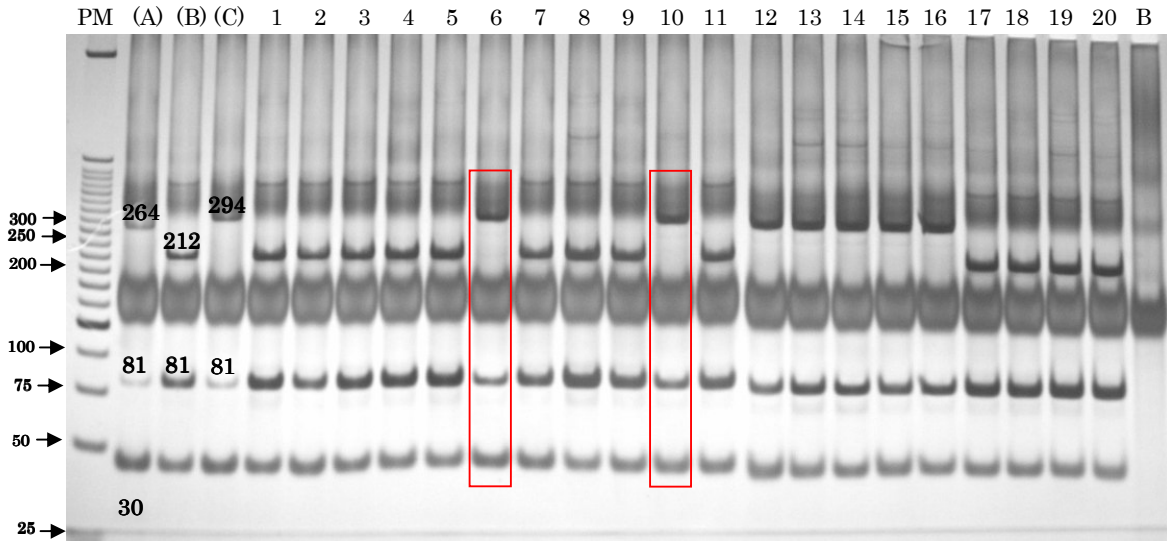


Figura 12 – Gel de poliacrilamida 6%, mostrando os padrões de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) gerados a partir de produtos amplificados por PCR do gene mitocondrial Citocromo Oxidase II das cepas parentais Be-78, Y e ABC do *Trypanosoma cruzi* e dos respectivos isolados de cães *Beagle* (Bg), inoculados com 4000 e 2000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) dessas cepas, depois da digestão enzimática empregando *AluI*. Os isolados foram obtidos na fase aguda (30 dias (D) após a inoculação) e na fase crônica (entre 9 a 24 meses (M) após a inoculação). Linhas 1 e 2 – cepa Be-78 2000 TS e o isolados Bg1(18M), respectivamente; Linhas 3 e 4 – cepa Be-78 4000 TS e o isolados Bg 7(24M), respectivamente; Linhas 5 e 6 – cepa Y 2000 TS e o isolado: Bg 10(12M), respectivamente; Linhas de 7 a 11 – cepa Y 4000 TS e os respectivos isolados: Bg15(30D, 12M e 21M) e Bg16(30D); Linhas 12 a 16 – cepa ABC 4000 TS e os respectivos isolados: Bg19(18M), Bg20(24M), Bg21(9M) e Bg22(15M); Linhas de 17 a 20 – isolados: Bg2(24M) e Bg6(21M) isolados de cães inoculados com a cepa Be-78 2000 TS e 4000 TS, respectivamente; Bg 17(30D) e Bg 18(30D) isolados de cães inoculados com a cepa Y 4000 TS.

Nota: PM: Marcador de Peso Molecular 25pb; (A): amostras que apresentam os fragmentos de restrição de 264, 81 e 30 pares de base (pb) são classificados como *T. cruzi* I (haplótipo mitocondrial A); (C): fragmentos de 212 e 81 pb são classificados como *T. cruzi* II (haplótipo mitocondrial C); (B): fragmentos de 294 e 81 pb são classificados como *T. cruzi* III ou híbridas (haplótipo mitocondrial B). B: Branco (controle negativo da reação). Destaque em vermelho (isolados: Bg 10(12M) e Bg15(21M) - que mudaram o perfil de restrição).

7. DISCUSSÃO

7.1- Sinais e sintomas observados em cães infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

As manifestações clínicas observadas durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* normalmente são discretas tanto em humanos quanto em alguns animais de experimentação. Nesse estudo, a avaliação clínica e comportamental dos animais, durante a fase aguda da infecção, mostrou alterações discretas, como perda de peso e tristeza e apatia foram observadas em apenas dois animais inoculados com a cepa Y e não foi registrado nenhum caso de morte. Esses dados foram semelhantes aos observados por Machado *et al.* (2001). Tais autores registraram apenas manifestações clínicas discretas e ausência de mortalidade na fase aguda da infecção em cães sem raça definida inoculados com 1×10^3 formas tripomastigotas sanguíneos das cepas 147 e SC-1, pela via intraperitoneal. Além disso, Andrade *et al.* (1980), Andrade *et al.* (1981), Lana *et al.* (1988) mostraram que as manifestações clínicas comumente observadas na fase aguda da doença de Chagas em cães se parecem às observadas em humanos. Entretanto, foi observada divergência dos resultados do presente trabalho em relação aos de outros estudos que utilizaram esse mesmo modelo experimental (MARSDEN & HAGSTROM, 1968; KRAMER Jr., 1972). Esses autores registraram sintomas clínicos típicos da doença de Chagas aguda, porém, alta mortalidade quando utilizaram inóculo de $2,5 \times 10^4$ a $9,3 \times 10^8$ parasitos, pelas vias subcutânea e conjuntival da cepa Peru (MARSDEN & HAGSTROM, 1968) e $5,0 \times 10^5$ tripomastigotas sanguíneos/Kg de peso corporal, via subcutânea da cepa B (KRAMER Jr., 1972). Esses resultados podem ser justificados pelas condições experimentais adotadas, ou seja, os animais utilizados no presente estudo foram inoculados com um baixo inóculo, aos quatro meses de idade, após receberem quatro doses de vacina e uma alimentação balanceada. Além das condições experimentais citadas, a via de inoculação e as características biológicas e genéticas das cepas utilizadas, provavelmente foram fatores importantes na divergência desses resultados. Dessa maneira, as condições experimentais parecem ser responsáveis pelo amplo espectro de manifestações clínicas observadas quando se utiliza o cão como modelo experimental.

A variação da temperatura corporal ocorreu de maneira irregular, semelhante aos animais controle. Não foi observada nenhuma correlação entre a variação da temperatura e os níveis parasitêmicos. Esses resultados foram similares aos observados por Lana *et al.* (1992), que também não observaram correlação entre a elevação da temperatura e os níveis de parasitemia em cães infectados com as cepas Be-62 ou Be-78. Este parâmetro é difícil de ser analisado, pois a temperatura de cães oscila muito durante o dia, mesmo naqueles animais sem nenhuma infecção (GREENE, 1984).

O número de animais utilizados foi relativamente pequeno, uma vez que, foi priorizado utilizar somente animais provenientes de uma mesma ninhada para compor cada grupo experimental. Além disso, foram utilizados cães de raça pura. O objetivo desse procedimento foi minimizar as possíveis diferenças individuais entre os animais envolvidos nos experimentos.

7.2- Parasitismo sangüíneo e tecidual

Em indivíduos infectados com o *T. cruzi*, a avaliação dos níveis de parasitemia tem sido alvo de vários estudos. Entretanto, muitos deles, devido a razões éticas, foram realizados em humanos somente na fase aguda ou na fase crônica da infecção e não foi possível avaliar a relação entre a intensidade do parasitismo sangüíneo e tecidual. Nesse sentido, neste estudo foi realizada uma avaliação do parasitismo sangüíneo em cães *Beagle*, inoculados com três cepas do *T. cruzi*, que possuem propriedades biológicas e genéticas distintas, por meio das técnicas de ESF, Hc e PCR. Além disso, foi verificada a correlação dos níveis de parasitismo sangüíneo com a freqüência de PCR positiva realizada em tecidos cardíacos.

Durante a fase aguda da infecção, a presença do parasito foi facilmente demonstrada pelo ESF em todos os animais inoculados com 4000 TS. Nos cães inoculados com 2000 TS, esse teste não foi capaz de detectar o parasito em três dos 10 animais avaliados, sendo a presença do parasito confirmada, apenas pela Hc ou pela PCR. A freqüência e o período da infecção no qual o parasito foi detectado variaram entre os animais inoculados com as diferentes cepas do *T. cruzi*. Assim, foi necessário realizar um número maior de testes para encontrar um exame positivo nos animais inoculados com 4000 TS das cepas Be-78 e Y

em relação aos inoculados com a cepa ABC. Nos animais inoculados com 2000 TS, foi necessário realizar um número maior de testes em relação aos inoculados com 4000 TS. Contudo, nos cães inoculados com 2000 TS da cepa Be-78 o número de testes realizados para encontrar um positivo foi menor em relação aos inoculados com 2000 TS da cepa Y. Essas observações corroboraram as observadas por Castro & Brener (1985) que mostraram padrões de parasitemia distintos entre cães jovens inoculados com as cepas Y e CL do *T. cruzi*. Os autores mostraram que nos animais inoculados com a cepa CL a parasitemia foi ascendente e o parasito foi detectado em todos os animais ao passo que com a Y, a parasitemia foi baixa, irregular e com frequência subpatente.

De forma semelhante, todos os exames de hemocultura realizados 30 dias após a inoculação dos animais com 4000 TS foram positivos, entretanto, esse exame foi negativo em dois dos cinco animais inoculados com 2000 TS da cepa Y, corroborando com os dados observados por Castro & Brener (1985). Durante a fase crônica da infecção, foi observada uma variação na positividade deste teste. Assim, todos os animais inoculados com as cepas Be-78 ou ABC apresentaram pelo menos uma Hc positiva, enquanto apenas um animal inoculado com a cepa Y apresentou este teste positivo. Resultados semelhantes foram observados por outros autores que também mostraram por meio de hemocultura e/ou xenodiagnóstico, perfis parasitêmicos variáveis entre cães inoculados com diferentes cepas (LANA *et al.*, 1992; MACHADO *et al.*, 2001). Os dados obtidos nesse estudo mostraram que alguns animais apresentaram resultados sempre positivos, esporadicamente positivos, ou ainda persistentemente negativos. Com base nesses dados, os animais foram classificados de acordo com o nível parasitêmico. Assim, foram observados níveis médios e altos entre os cães infectados com as cepas Be-78 ou ABC, enquanto nos animais inoculados com a cepa Y foram observados níveis baixos de parasitemia. Essa classificação tem mostrado ser de grande importância, principalmente quando antecede o tratamento específico (CASTRO *et al.* 2002; 2006).

A diferença entre as taxas de positividade das hemoculturas realizadas em cães inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC pode ser relacionada às

diferenças morfológicas apresentadas por essas cepas. Esta hipótese tem sido sugerida por outros autores que observaram diferentes perfis de parasitemia em cães inoculados com as cepas Be-62 ou Be-78, as quais apresentam predominância de formas delgadas e largas, respectivamente (LANA *et al.*, 1992; ARAÚJO *et al.*, 2002). Considerando este aspecto da biologia do parasito como sendo importante tanto na definição do perfil da parasitemia, como em outros parâmetros que são avaliados no contexto da relação parasito/hospedeiro, Guedes *et al.* (2007) realizaram uma análise da morfologia das formas tripomastigotas sanguíneas das cepas utilizadas nesse trabalho. Os autores demonstraram que as cepas Be-78 e ABC são constituídas predominantemente por formas largas e a cepa Y por formas delgadas, comprovando observações anteriores realizadas por Brener (1965). Desta maneira, esses resultados reforçam a hipótese de que as formas delgadas penetram nas células mais precocemente e são mais sensíveis à lise mediada pelo complemento, resultando em menor permanência no sangue periférico. O inverso é observado para as formas largas (Brener, 1969).

Os resultados apresentados acima foram semelhantes aos observados em humanos nas fases aguda e crônica da doença. Dados da literatura têm mostrado resultados discordantes quanto à sensibilidade da hemocultura e/ou xenodiagnóstico em detectar o parasito em alguns pacientes, na fase crônica, que vivem na mesma ou em regiões geográficas distantes (CASTRO *et al.*, 1999; 2002; 2006). Esses autores verificaram que vários pacientes não apresentavam xenodiagnóstico e nem hemocultura positivos, enquanto, outros apresentavam esses exames repetidamente positivos. Esses dados corroboram a hipótese de que a parasitemia durante a fase crônica é, em geral, uma constante para cada indivíduo, desde aqueles com raros parasitos circulantes em que ocasionalmente se obtém um exame positivo, até aqueles com elevada parasitemia onde o parasito é detectado em todos os exames realizados (SCHENONE *et al.*, 1977; LUQUETTI & RASSI, 2000; PRATA, 2001). Entretanto, tem sido descrito também que a realização seriada desse método aumentaria a positividade proporcionalmente ao número de exames realizados (LUQUETTI & RASSI, 2000; PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA 2003). Nesse estudo, as alterações dos níveis de parasitemia observadas

durante os dois anos de avaliação foram relacionadas com a cepa do parasito utilizada para a inoculação dos animais. Assim, foi detectada uma redução gradual dos níveis da parasitemia nos animais inoculados com a cepa ABC após o primeiro ano de avaliação e uma estabilidade dos níveis parasitêmicos nos inoculados com a cepa Be-78. Naqueles inoculados com a cepa Y ocorreu uma brusca redução da parasitemia após a fase aguda da infecção, ou seja, no primeiro ano de avaliação. Esses resultados reforçam a hipótese de que o tempo de infecção diminui a quantidade de parasitos circulantes, entretanto a positividade da hemocultura e xenodiagnóstico parecem ser dependentes da cepa do parasito (CASTRO *et al.*, 1983; CASTRO *et al.*, 1999). Esses dados indicam que nem sempre a sensibilidade desses testes aumenta com a repetição dos mesmos, a exemplo dos animais inoculados com a cepa Y. Por outro lado, já foi demonstrada que a sensibilidade dos métodos parasitológicos varia de 30% a 55%, quando apenas um exame é realizado em cada paciente (MOURÃO & MELLO, 1975; CHIARI *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1999). Entretanto, segundo alguns autores a aplicação seriada desses métodos aumentaria a positividade proporcionalmente ao número de exames realizados (LUQUETTI & RASSI, 2000; PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003).

A maioria das Hc realizadas nesse estudo foi positiva entre 30 e 60 dias após a realização da coleta e 1,8% tiveram sua positividade comprovada aos 90 dias após a coleta. Esses dados corroboram àqueles obtidos por outros autores (MORA, 1996; LUZ *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 2002). Devido à baixa sensibilidade da técnica de Hc é importante examiná-las além de 60 dias, principalmente porque a demora na detecção do parasito pode estar relacionada com diferentes características biológicas do *T. cruzi* como a taxa de crescimento em meios artificiais (MINTER-GOEBLOED *et al.*, 1978). Além disso, foi observada uma maior chance de encontrar o parasito nos tubos que continham a camada de leucócito, independente da cepa. Esses dados foram semelhantes aos demonstrados por Luz *et al.* (1994).

Em geral, a sensibilidade dos testes de diagnóstico parasitológicos como hemocultura e xenodiagnóstico variam de acordo com as regiões geográficas (COURA *et al.*, 1984), e pode ser relacionada aos níveis de parasitismo sanguíneo. Considerando que ampla variabilidade biológica e genética tem sido

observada em *T. cruzi* e essa, tem sido correlacionada ao curso da infecção no hospedeiro vertebrado (BRENER, 1962; ANDRADE, 1974, ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), é razoável supor que a variabilidade intraespecífica do *T. cruzi* tem um papel importante na variação dos níveis parasitêmicos.

Atualmente, a PCR tem sido um método importante para o monitoramento da infecção por *T. cruzi*, pois apresenta elevada sensibilidade, na detecção tanto de fragmentos genômicos quanto de kDNA (GOMES *et al.*, 1999; BRITTO *et al.*, 2001). Todavia, assim como na hemocultura e no xenodiagnóstico, o resultado positivo da PCR depende da presença de um parasito em 20ml de sangue ou de pelo menos 1% do minicirculo de um parasito ou ainda de 0,01% dos fragmentos do DNA do *T. cruzi* no sangue circulante de um indivíduo infectado (ÁVILA *et al.*, 1991; GOMES *et al.*, 1998b). Diferentes resultados têm sido encontrados quando estudos em áreas geográficas distintas são considerados, com taxas variando de 3,8% a 100% entre os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003).

Nesse estudo, a PCR foi realizada em paralelo a Hc e, como descrito na literatura, apresentou maior sensibilidade em detectar a presença do *T. cruzi* no sangue dos animais avaliados (LAGES-SILVA *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2002).

Durante a fase aguda da infecção, a presença do DNA do *T. cruzi* foi evidenciada em 91,7% dos animais inoculados com 4000 TS das cepas Be-78, Y ou ABC. Apenas uma amostra de sangue coletada em um animal inoculado com a cepa ABC apresentou PCR persistentemente negativa, enquanto os demais testes foram positivos. Esses dados são consistentes com os registrados por outros autores (JUNQUEIRA, *et al.*, 1996; LAGES-SILVA, 2001; CASTRO *et al.*, 2002). Tais autores obtiveram resultados negativos para PCR realizada em pacientes que apresentaram outros testes parasitológicos positivos (hemocultura e/ou xenodiagnóstico).

As taxas de positividade das PCRs realizadas ao longo da fase crônica da infecção foram semelhantes entre as realizadas nos animais infectados com as cepas Be-78 ou ABC e significativamente superiores àquelas realizadas em amostras de sangue coletadas em cães inoculados com a cepa Y. Estes

resultados foram concordantes com aqueles obtidos na Hc, indicando mais uma vez a importância da cepa na sensibilidade de ambas as técnicas. Porém, foi demonstrada também divergência entre os resultados obtidos em animais infectados com a mesma cepa sugerindo a participação de fatores relacionados ao hospedeiro. Segundo Gomes *et al.* (1998b) a discrepância dos resultados de PCR obtidos por vários autores em indivíduos chagásicos poderia ser explicada pelas diferenças nos níveis de parasitemia, bem como da sensibilidade dos protocolos utilizados. Araújo *et al.* (2002) demonstraram a dificuldade de positividade da PCR em cães cronicamente infectados. Para obter 100% de positividade da PCR nos animais avaliados, os autores realizaram para alguns cães até seis extrações e 17 reações para obter o primeiro resultado positivo.

Os resultados da positividade da Hc e da PCR obtidos em cães foram bastante semelhantes aos observados em humanos. Os dados desse estudo fornecem evidências de que a cepa do parasito interfere na sensibilidade das técnicas de Hc e PCR e explicam, em parte, a divergência de resultados entre diversos estudos.

Nesse trabalho, foi investigada, ainda, a presença do parasito em diferentes áreas do coração dos animais inoculados com as cepas Be-78, Y ou ABC, pelas técnicas de IMH e PCR. Os resultados obtidos pela IMH, na fase aguda da infecção, mostraram diferentes padrões de associação do parasito com o processo inflamatório. Assim, foi observada nos fragmentos do coração dos animais inoculados com a cepa Be-78, uma maior quantidade tanto de ninhos de amastigotas como de amastigotas isoladas, sendo, na maioria das vezes sem processo inflamatório associado. Um número bastante reduzido de ninhos de amastigotas foi observado nos animais inoculados com a cepa Y, porém, o número de amastigotas isoladas foi bem maior em relação à quantidade de ninhos e o processo inflamatório foi bastante intenso. Por outro lado, a quantificação do parasitismo nos tecidos dos animais inoculados com a cepa ABC demonstrou um nível de parasitismo intermediário, contudo, os parasitos estavam associados a células inflamatórias, diferente do observado nos tecidos dos animais inoculados com a cepa Be-78. Estes dados sugerem uma grande influência da cepa do parasito no resultado das lesões de fase aguda.

A reação de IMH foi negativa em todos os fragmentos analisados na fase crônica da infecção. A baixa sensibilidade da IMH nesta fase da infecção, já foi demonstrada por outros autores, em tecidos de cães (CALIARI *et al.*, 1994; MACHADO *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2006). Em humanos, Lages-Silva *et al.* (2001) também demonstrou maior sensibilidade da PCR em relação à IMH para detectar a presença do *T. cruzi* em tecido do esôfago.

A aparente ausência de parasitos no coração da maioria das pessoas infectadas tem levado vários autores a propor teorias auto-imunes para explicar o desenvolvimento das lesões inflamatórias miocárdicas (LEON *et al.*, 2001; KIERSZENBAUM, 1999; COSSIO *et al.*, 1974; ANSEMI *et al.*, 1966). Porém, a presença do parasito parece ser a causa primária da doença, estimulando todos os demais processos patogênicos teciduais, inclusive a autoimunidade (GIRONÈS & FRESNO, 2003).

Nesse estudo, a PCR foi utilizada também para demonstrar a presença do parasito nos tecidos cardíacos, através da detecção do kDNA. Na fase crônica, a PCR apresentou alta sensibilidade, uma vez que pelo menos três fragmentos do coração de cada animal apresentaram-se positivo. Desta maneira, foi mostrada uma alta frequência de kDNA do *T. cruzi* em porções representativas dos átrios e ventrículos direito e esquerdo, do septo interventricular e da ponta em todos os animais avaliados 24 meses após a inoculação. Por outro lado, a taxa de positividade foi variável entre os diversos fragmentos obtidos dos animais inoculados com as diferentes cepas. Esses resultados mostram como fragmentos do DNA do parasito permanecem no tecido cardíaco após uma infecção de longa duração em cães, como reportado na doença de Chagas humana (LAGES-SILVA *et al.*, 2001; ELIAS *et al.*, 2003). Esses resultados foram contraditórios aos observados por Machado *et al.* (2001), uma vez que não foi demonstrada a presença de DNA do *T. cruzi* em nenhum dos fragmentos das quatro câmaras cardíacas de cães inoculados e re-infectados com as cepas 147 e SC-1. Neste caso, a metodologia utilizada pode ter influenciado, uma vez que, no presente estudo, o DNA alvo para a amplificação pela PCR foi uma seqüência do kDNA e a utilizada pelos autores acima foi uma seqüência repetitiva de 195pb do DNA genômico. Outra justificativa seria o tempo de infecção: os animais utilizados nesse estudo foram

eutanasiados aos 24 meses após a inoculação e os dos referidos autores aos 38 meses. Entretanto, o fator tempo parece não influenciar a detecção de parasitos pela PCR na fase crônica da infecção em cães, uma vez que Cruz *et al.* (2006) evidenciaram a presença de kDNA do *T. cruzi* em PCR realizada em fragmentos do coração de cães na fase crônica da doença de Chagas tardia (5 a 13 anos de infecção).

A comparação entre a positividade da Hc e da S-PCR com a T-PCR mostrou dois padrões diferentes que estão relacionados com a cepa do parasito. O primeiro padrão foi obtido dos animais inoculados com a cepa Be-78 ou ABC, sendo observada concordância no número de exames positivos nos três testes. O segundo padrão foi obtido dos cães infectados com a cepa Y. Nesses, não foi observada relação entre a positividade dos testes realizados em amostras de sangue e de tecido. Considerando todas as avaliações realizadas ao longo de dois anos de infecção, o kDNA do parasito foi detectado no tecido cardíaco de todos os animais inoculados com a cepa Y, enquanto somente 6,2% e 56,3% de amostras positivas (parasito ou kDNA) foram detectados no sangue periférico pela Hc e pela PCR, respectivamente. Além disso, no tecido cardíaco coletado 24 meses após a inoculação foram verificados 87,5% de positividade da T-PCR entre os fragmentos cardíacos obtidos dos animais inoculados com essa cepa. Entretanto, o parasito ou o seu kDNA não foi detectado no sangue periférico de nenhum desses animais, nesse momento.

Estes resultados mostraram a dificuldade de avaliar o papel do parasito e sua persistência em pequeno número no sangue periférico do hospedeiro vertebrado durante a evolução da doença. Curiosamente, o parasito foi demonstrado com menor freqüência, aos 24 meses de infecção, nos tecidos dos animais inoculados com a cepa Be-78 em relação aos animais inoculados com a cepa Y. Ao contrário, os cães inoculados com a cepa Be-78 apresentaram maior parasitismo sangüíneo quando comparados aos inoculados com a cepa Y, que mostraram raros parasitos no sangue periférico. A persistência do *T. cruzi* no miocárdio também foi demonstrada pela amplificação de DNA do parasito em tecidos obtidos após biópsias miocárdica de pacientes portadores das formas indeterminada ou cardíaca (ÃNEZ *et al.*, 1999). A presença de DNA nuclear do parasito também tem sido detectada em tecidos cardíacos de pacientes com

lesões inflamatórias severas, pela PCR e hibridização com sondas internas específicas, não sendo detectadas seqüências de DNA do *T. cruzi* em tecido cardíaco de pacientes assintomáticos ou soronegativos (JONES *et al.*, 1993). Resultados concordantes foram obtidos por Lages-Silva *et al.* (2001) e Vago *et al.* (1996a; 1996b) que amplificaram o kDNA em tecidos do esôfago de pacientes com megaesôfago, sendo observada uma correlação entre a inflamação tecidual e a presença do parasito. Além disso, vários autores têm mostrado a ausência de correlação entre os níveis de parasitismo sangüíneo, verificada por testes parasitológicos e as formas clínicas da doença de Chagas crônica (CASTRO, 1980; CERISOLA *et al.*, 1974). Entretanto, a evidência do envolvimento do parasito na patogênese da doença de Chagas indica a importância do parasitismo tecidual cardíaco na avaliação da evolução da doença de Chagas crônica (HIGUCHI *et al.*, 1993a; JONES *et al.*, 1993; TARLETON, 2001).

7.3- Aspectos histopatológicos

Para a avaliação histopatológica foram realizadas análises semiquantitativas de fragmentos do coração dos animais infectados com as diferentes cepas do *T. cruzi*. A análise das seis diferentes regiões cardíacas, tanto em animais eutanasiados durante a fase aguda quanto na fase crônica da infecção não mostrou diferença significativa entre os grupos infectados. Entretanto, foram verificadas diferenças entre esses e o grupo controle para alguns dos parâmetros analisados. De uma maneira geral, as regiões cardíacas de um mesmo animal apresentaram o mesmo padrão histopatológico. Entretanto, segundo Rossi (1998) o ventrículo esquerdo e o átrio direito são as regiões mais atingidas na doença humana. Essas observações foram descritas também para o modelo canino (ANDRADE, 1984).

Durante a fase aguda, o parasito foi encontrado aleatoriamente, em todas as regiões cardíacas estudadas. Entretanto, como já descrito anteriormente, foi verificado nos fragmentos cardíacos dos animais infectados com a cepa Be-78, que a maioria dos ninhos íntegros encontrava-se sem associação com reação inflamatória. A presença de inflamação foi observada apenas quando havia ninhos rompidos. Essas observações estão de acordo com a presença de um infiltrado inflamatório menos exuberante nos tecidos cardíacos dos animais

inoculados com esta cepa. Entretanto, o único fragmento que apresentou inflamação mais intensa foi o AD, onde foi encontrada maior quantidade de ninhos rompidos. Por outro lado, nos fragmentos cardíacos dos animais infectados com as cepas Y ou ABC o processo inflamatório mostrou-se mais intenso em relação aos animais do grupo controle em todos os fragmentos cardíacos avaliados. A presença de ninhos e amastigotas isoladas envolvidas por processo inflamatório foram freqüentes. Na maioria das vezes, foram observados ninhos rompidos, entretanto, o parasitismo detectado nos fragmentos oriundos de cães inoculados com a cepa Y foi bem menor. Estes dados estão de acordo com os observados por Guedes (2006), para o AD. O autor realizou análises morfométricas computadorizadas para quantificação das áreas ocupadas por inflamação no AD desses mesmos animais. Foi observado que o número de núcleos celulares presentes no AD dos animais inoculados com as diferentes cepas foi significativamente superior apenas entre os cães infectados em relação àqueles não infectados.

Durante a fase aguda da infecção, podem ser observados infiltrados inflamatórios focais ao redor das células parasitadas, podendo ocorrer processos inflamatórios intensos e difusos, em geral, associados com a multiplicação do parasito, ruptura das células e liberação de mediadores inflamatórios. Segundo Ribeiro dos Santos & Hudson (1980) nesta fase, apesar do parasito ser facilmente detectado, nem sempre existe uma correlação direta entre este e a intensidade das lesões, principalmente pela destruição de células não parasitadas após adsorção de antígenos do parasito. Devido a grande destruição causada pela reação inflamatória, a substituição do miocárdio destruído pode ocorrer por diferentes mecanismos. A substituição por células adiposas foi descrita como sendo de menor importância do ponto de vista anatomopatológico, em relação ao reparo por tecido conjuntivo (ANDRADE *et al.*, 1988; ROSSI & BESTETTI, 1995; CALIARI *et al.*, 2002). No presente trabalho, os animais infectados com a cepa Y, que foram eutanasiados durante a fase aguda, apresentaram maior quantidade de células adiposas, em todos os fragmentos cardíacos avaliados, em relação aos animais do grupo controle. As células adiposas estavam associadas ao processo inflamatório. Nos fragmentos obtidos de animais inoculados com a cepa ABC, o infiltrado de células adiposas

foi observado apenas no AD, onde também houve associação nítida ao processo inflamatório. Os animais infectados com a cepa Y (fragmentos AE e SI) e ABC (VE, SI e PTA) foram os que apresentaram maior quantidade de neocolágeno quando comparados aos animais do grupo controle. A parasitemia observada nos animais inoculados com a cepa ABC foi subpatente em apenas um animal no dia da necropsia, enquanto, todos os animais inoculados com a cepa Y apresentaram parasitemia subpatente nesse dia. Em relação aos animais inoculados com a cepa Be-78, apenas o AD mostrou processo inflamatório intenso, não foi observado nenhum evento importante nas demais análises. Entretanto, o nível parasitêmico destes animais foi semelhante ao observado nos animais inoculados com a cepa ABC, e superior no tecido. Esses resultados também estão de acordo com os observados por Guedes (2006). A quantificação do colágeno nessa fase da doença, nos fragmentos AD dos animais inoculados com as três cepas, foi apenas discreta, não sendo observado, pelo autor, diferença significativa entre os animais infectados e os controles.

Diante dos dados observados na fase aguda, é possível especular que a morfologia das formas tripomastigotas sanguíneas descritas por Brener (1965) pode ter influência no padrão anatomopatológico observado. Desta maneira, os animais inoculados com cepa Be-78, apresentaram maior parasitismo tecidual e menor reação inflamatória. Esta cepa é constituída predominantemente de formas largas, a maioria dos ninhos estava íntegro. Uma vez o parasito na circulação sanguínea, estas formas são mais resistentes a Lise mediada pelo complemento (BRENER, 1969), permanecendo, portanto, por um período maior na circulação. Além disso, Brener (1965; 1969) verificou que essas diferenças morfológicas poderiam ser correlacionadas aos cursos clínicos da infecção experimental de camundongos. Por outro lado, as formas delgadas, observadas na cepa Y, penetram mais rapidamente nas células do hospedeiro e são mais susceptíveis aos mecanismos imunes, (BRENER, 1969), o que explicaria o fato de maior número de células parasitadas rompidas, portanto maior processo inflamatório e parasitemia subpatente. Os animais inoculados com a cepa ABC apresentaram um padrão intermediário. Segundo Guedes *et al.* (2007) esta cepa é composta predominantemente por formas largas, porém, possui uma

percentagem de formas delgadas superiores a observada para a cepa Be-78 e inferior à cepa Y.

Na fase aguda da infecção o infiltrado inflamatório intenso é reduzido drasticamente, mas o *T. cruzi* não é eliminado totalmente mesmo na presença de Interferon-gama (IFN- γ) (TORRICO *et al.*, 1991), linfócitos T CD8+ (TARLETON *et al.*, 1994) e macrófagos (ORTIZ-ORTIZ *et al.*, 1976). Por esta razão, os focos inflamatórios intrafasciculares continuam sendo formados lenta e progressivamente, ao longo dos anos, modulados pela resposta imune. Como resultado deste longo processo, surge uma miocardite crônica, fibrosante, podendo levar à falência cardíaca tanto no homem, quanto no modelo cão (BARRETO *et al.*, 1986; LANA *et al.*, 1988).

A princípio, a ausência do parasito na avaliação imuno-histoquímica no miocárdio destes cães sugere o envolvimento de outros mecanismos na gênese do processo inflamatório e conseqüentemente na manutenção das lesões crônicas. Embora nenhum parasito fosse detectado pela IMH na fase crônica, a PCR demonstrou a presença desses através da identificação de fragmentos de kDNA nos tecidos obtidos de animais infectados com 4000 TS e 2000 TS da cepa Be-78. Durante a fase aguda da infecção foi observado um maior número de ninhos e amastigotas isoladas no miocárdio. O processo inflamatório foi menos exuberante, o que poderia sugerir que a redução de células inflamatórias durante a fase aguda estaria relacionada à menor eficiência na destruição do parasito pelos mecanismos imunes, uma vez que a maioria das células parasitadas permanecia íntegra. Provavelmente, as células parasitadas se rompem mais tardiamente na fase crônica quando comparadas as células parasitadas de outras cepas. Curiosamente, apenas o fragmento AD que havia apresentado processo inflamatório significativo em relação aos animais do grupo controle durante a fase aguda mostrou ausência de inflamação significativa durante a fase crônica. Esse resultado também é concordante com o observado por Guedes (2006), uma vez que, na fase crônica, apenas os animais inoculados com a cepa Be-78 não apresentaram inflamação no AD significativamente superior ao dos animais controles.

O contrário pode ser observado nos tecidos dos animais infectados com a cepa Y durante a fase crônica, sendo estes os únicos que apresentaram

presença de fibrose significativamente superior aos controles. Esse resultado foi discordante dos observados por Guedes (2006), uma vez que esse autor mostrou fibrose mais intensa no AD dos animais inoculados tanto com a cepa Y como com a ABC. Vale lembrar que, na fase aguda, os animais inoculados com a cepa Y foram os que apresentaram processo inflamatório mais intenso e maior presença de células adiposas em todos os fragmentos cardíacos avaliados. Portanto, uma multiplicação silenciosa do *T. cruzi* durante a fase crônica da doença evidenciada pela presença de DNA do parasito pela PCR poderia ser responsável pelo surgimento de sucessivas zonas de destruição miocárdica seguidas de fibrose reparativa, na fase crônica.

Durante a fase crônica não foi observada presença de infiltrado de células adiposas nos fragmentos cardíacos avaliados. Entretanto, Caliari *et al.* (2002) verificaram acréscimo de células adiposas em todos os cães chagásicos crônicos infectados pelas cepas Be-62 e Be-78, porém, todos foram eutanasiados entre sete e 12 anos de infecção. Essa diferença de tempo de infecção em relação aos animais avaliados no presente estudo pode ter influenciado nos resultados, além da diferença do modelo, uma vez que os animais utilizados pelos autores foram cães sem raça definida. A interferência desta infiltração gordurosa no processo inflamatório chagásico agudo e crônico ainda precisa ser melhor estudada já que os adipócitos são capazes de produzir TNF α , MIF e TGF β , mediadores químicos envolvidos em fenômenos como a migração de leucócitos para o foco inflamatório e a deposição de colágeno (FRÜHBECK *et al.*, 2001).

Na cardiopatia chagásica crônica humana a fibrose é difusa e de grau variável, atingindo o perimísio, endomísio e ao redor dos vasos coronarianos intramiocárdicos (BOGLIOLO, 1976; ROSSI, 1991). Focos de intensa deposição de colágeno também são encontrados associados com degeneração e necrose de miocardiócitos, além de infiltrado inflamatório crônico (ROSSI, 1998). Esse aspecto de destruição miocárdica e fibrose focal e difusa que não está diretamente correlacionada com parasitismo indica uma inflamação crônica progressiva provavelmente correlacionada com mecanismos imunológicos (TAFURI, 1987; ANDRADE *et al.*, 1989; TAFURI, 1999). Tanto a fibrose difusa quanto a focal interrompem parcial ou totalmente o percurso dos feixes musculares, atingem o perimísio e unem uns aos outros fascículos adjacentes.

Portanto, a cardiopatia crônica fibrosante descompensada, com graves distúrbios do ritmo, pode ser justificada pela quantidade de fibrose focal e difusa que se acumula ao longo dos anos (MADY *et al.*, 1999).

Como sugerido por vários autores (JONES *et al.*, 1993; HIGUCHI *et al.*, 1993a; LAGES-SILVA *et al.*, 2002), o parasito deve exercer um papel importante na patogênese das lesões teciduais. A presença contínua do *T. cruzi*, demonstrada pela PCR tanto nos tecidos como no sangue, talvez seja, o principal fator responsável pelo desencadeamento dos processos que levam ao desenvolvimento de alterações cardíacas. Como consequência pode ocorrer ativação contínua da resposta imune, explicando a participação de processos autoimunes, que na verdade poderiam ser estimulados pelo próprio parasito.

Nesse estudo, foi demonstrada que a intensidade do parasitismo tecidual não está relacionada à intensidade do parasitismo sangüíneo, pois o parasito foi detectado no tecido cardíaco de todos os animais avaliados, mesmo naqueles que apresentaram testes parasitológicos e moleculares (ESF, Hc e PCR realizado no sangue) persistentemente negativos. Entretanto, apesar de o parasito ter sido detectado com frequência semelhante no tecido cardíaco dos animais inoculados com diferentes cepas do *T. cruzi* os padrões histopatológicos detectados foram variáveis. Assim, esses dados reforçam a importância da presença do parasito na formação das lesões cardíacas, mas o padrão histopatológico das lesões estaria relacionado especialmente com a população do *T. cruzi* presente.

7.4- Caracterização molecular

Estudos realizados por vários autores têm demonstrado que grande parte das populações do *T. cruzi* isoladas de diferentes hospedeiros de toda área endêmica da doença de Chagas são compostas por um conjunto de diferentes clones com características biológicas e genéticas distintas (MOREL *et al.*, 1980; DEANE *et al.*, 1984; TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1998; 1999). Essas populações do parasito podem sofrer alterações na organização de suas subpopulações devido aos métodos de isolamento e de manutenção em laboratório podendo favorecer a expansão ou a redução de determinados clones presentes na amostra natural (MACEDO &

PENA, 1998). Por outro lado, torna-se importante considerar também que a genética do hospedeiro vertebrado pode influenciar no processo seletivo de clones do parasito (ANDRADE *et al.*, 2002).

Neste trabalho, a caracterização molecular das populações do *T. cruzi* isoladas de cães foi ampliada em relação ao estudo realizado anteriormente por Veloso *et al.*, 2005. Nesse sentido, foi utilizado um número maior de cepas e os animais escolhidos, para o estudo, possuíam uma carga genética mais homogênea. As cepas Be-78, Y ou ABC utilizadas para a inoculação dos animais foram consideradas parentais. Dessa forma, a avaliação genética das populações do *T. cruzi* recuperadas 30 dias após a inoculação e também da última Hc positiva, realizada ao longo de 24 meses de infecção, foram caracterizadas por quatro técnicas diferentes, pois, segundo Tibayrenc & Ayala (1999), para aumentar o nível de resolução de uma hipótese, sobretudo nos estudos referentes a tipagem de cepas e análises filogenéticas, é necessário utilizar mais de dois marcadores genéticos desenvolvidos a partir de seqüências de DNA que apresentam diferentes taxas evolutivas.

7.4.1. Cepa Be-78

A caracterização fenotípica da cepa Be-78 utilizada para a inoculação de dois grupos experimentais distintos, um inoculado com 4000 TS e outro 2000 TS, mostrou perfil de Z2 ou ZA (MILES *et al.*, 1977; ROMANHA *et al.*, 1979), para as quatro isoenzimas estudadas (GPI, G6PD, PGM e IDH). Mesmo sendo os parasitos mantidos em camundongo e os experimentos realizados com um intervalo de 18 meses entre eles, o perfil de ZA foi mantido. Resultados semelhantes foram obtidos por Carneiro *et al.*, (1990) quando cepas do ZA foram mantidas por 18 meses em camundongos C3H. Os autores mostraram que a manutenção de cepas do *T. cruzi*, pertencentes aos ZB, ZC e ZD, em camundongos C3H, pelo mesmo período de tempo, muda o padrão de isoenzimas de algumas cepas em direção ao ZA, sugerindo que a manutenção de populações do *T. cruzi* em camundongos poderia levar a seleção de subpopulações. Lana *et al.* (1981) classificaram a cepa Be-78 como Z2, embora a ocorrência de uma banda extra no perfil eletroforético da enzima PGM e um perfil típico de ZB ou ZC para a enzima MDH, foi observado por esses autores.

Recentemente, Veloso *et al.* (2005) mostraram a existência dos zimodemas Z2, ZB e ZC na cepa Be-78 e nas quatro populações isoladas de cães experimentalmente inoculados com esta cepa. Esses zimodemas foram identificados na maioria dos isolados, em maior ou menor proporção em cada um deles ou no mesmo isolado. Foi observada inclusive a presença de dois zimodemas, ocorrendo simultaneamente, em proporções semelhantes ou não. Os autores sugeriram que as diferentes subpopulações presentes nesta cepa, poderiam apresentar flutuações temporárias em suas concentrações, que poderiam ser dependentes do relacionamento parasito/hospedeiro. Entretanto, Cruz *et al.* (2006) classificaram a cepa Be-78 como sendo do grupo genético 32 (TIBAYRENC & AYALA, 1988), equivalente ao Z2, após caracterizá-la utilizando 22 locus enzimáticos, nove iniciadores para a técnica de RAPD e sete locus de microssatélites. Os autores sugeriram ser esta população monoclonal, pelo menos dentro do limite da sensibilidade das técnicas utilizadas, uma vez que os produtos de amplificação de sete locus de microssatélites foram semelhantes entre a cepa Be-78 e quatro clones obtidos por diluições sucessivas de acordo com Gomes *et al.* (1991).

A análise do fenograma construído pela UPGMA, utilizando o pareamento de bandas compartilhadas obtidas pelo RAPD, mostrou que a cepa Be-78 e seus respectivos isolados se subdividiram em dois grupos distintos de acordo com o tamanho do inóculo, porém bem próximos geneticamente. Entre alguns isolados do *T. cruzi* obtidos de um mesmo cão ou de animais distintos pertencentes ao mesmo grupo ou não, foram observadas pequenas diferenças nos perfis de bandas, sendo que a maioria delas foi compartilhada. Esses dados sugerem a possível participação de fatores do hospedeiro nas alterações moleculares observadas no perfil de RAPD, uma vez que a cepa utilizada para a inoculação dos animais foi a mesma. Como esta cepa foi mantida em camundongo durante 18 meses até a inoculação do segundo grupo, provavelmente, a alocação destas populações em dois grupos distintos no fenograma, não foi devido ao tamanho do inóculo e sim ao manuseio, pois, esses dados embora menos evidentes, corroboram aos obtidos por Veloso *et al.* (2005) que mostraram alterações nos perfis de RAPD da cepa Be-78 e seus respectivos isolados de cães, experimentalmente inoculados com esta cepa, e reisolados

após dois a sete anos de infecção. Entretanto, as alterações observadas pelos autores nos perfis de RAPD foram acompanhadas de alterações fenotípicas, representadas pelo perfil eletroforético de isoenzimas, mostrando uma correlação entre os dois métodos, porém, os resultados obtidos no presente trabalho não mostraram alteração no perfil de isoenzima para a cepa Be-78 e seus respectivos isolados, provavelmente, o tempo transcorrido entre a inoculação e o reisolamento pode ter sido insuficiente para ocorrer alterações mais relevantes.

Posteriormente, a cepa Be-78 foi caracterizada utilizando dois marcadores moleculares que utilizam como alvos genes que apresentam taxas de evolução lenta (rDNA e DNA mit COII) e que são relacionados com o DNA genômico e mitocondrial, respectivamente. O produto da amplificação da região 3' do gene rDNA 24 S α observado (125pb) foi correspondente a linhagem 1 (SOUTO & ZINGALES, 1993; SOUTO *et al.*, 1996), enquanto os perfis apresentados para o DNAmit foram correspondentes ao grupo mitocondrial C (FREITAS *et al.* 2006). Os dois marcadores indicaram ser a cepa Be-78 e seus respectivos isolados classificados como *T. cruzi* II, corroborando com os resultados observados por Cruz *et al.* (2006).

7.4.2. Cepa Y

Como mostrado anteriormente os animais inoculados com a cepa Y apresentaram uma baixa parasitemia, conseqüentemente foram obtidos poucos isolados desta cepa, apenas três durante a fase crônica da infecção, sendo que dois foram isolados de um mesmo cão. Embora o número de amostras obtido seja pequeno, os resultados da caracterização molecular realizada nestes isolados foram surpreendentes. A cepa Y também foi utilizada para a inoculação de cães pertencentes a dois grupos distintos, como descritos para a cepa Be-78. O intervalo transcorrido entre os dois experimentos foi de apenas quatro meses. A cepa Y utilizada apresentou perfil de isoenzima Z2 ou ZA, semelhante ao observado para a cepa Be-78 em todas as enzimas, entretanto, dois isolados de animais diferentes e pertencentes a grupos experimentais distintos apresentaram perfis isoenzimáticos diferentes da cepa parental. Curiosamente, um dos isolados apresentou perfil ZB para as quatro isoenzimas

enquanto o outro apresentou perfil de ZC para a GPI e ZB para as demais enzimas. Vários autores têm relatado mudanças nos perfis de isoenzimas e de restrição do kDNA de várias cepas do parasito devido à manutenção delas em cultura ou em hospedeiros vertebrados por tempo prolongado (CARNEIRO *et al.*, 1990; ROMANHA *et al.*, 1979; VELOSO *et al.*, 2005).

A cepa Y, por ser uma cepa de referência, provavelmente tem sido uma das cepas mais citadas na literatura. Portanto, são vários os trabalhos que descrevem sua caracterização, tanto biológica quanto molecular (ANDRADE 1974; ROMANHA *et al.*, 1979; MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 1998; BARNABÉ & TIBAYRENC, 2004). Segundo, Barnabé & Tibayrenc (2004) a cepa Y é encontrada em muitos laboratórios apresentando pelo menos dois genótipos distintos, A e B correspondendo aos DTUs (*discrete typing units*) *T. cruzi* IIb e *T. cruzi* IIc, respectivamente, sendo IIc considerado híbrido. Essas subdivisões, segundo os autores, parecem ser altamente estáveis no espaço e no tempo. Entretanto, a instabilidade nesses genótipos tem sido mostrada por outros autores, inclusive neste estudo. Os resultados obtidos mostraram mudanças do perfil de ZA para ZB e ZC (GPI) corroborando com trabalhos anteriores que registraram mudanças reversíveis na mobilidade dos padrões eletroforéticos de isoenzimas descritos para esta cepa. Assim, Romanha (1982) registrou de uma maneira bastante interessante a transição entre os zimodemas A, B e C. Os autores registraram inclusive, para a enzima GPI, os estágios intermediários entre um zimodema e outro. Posteriormente, Alves *et al.* (1993) mostraram mudanças do ZA para ZB e ZC após a realização de sub-culturas de culturas clonadas da cepa Y em meios com diferentes composições ou após passagem em camundongos recém nascidos. Os autores mostraram que o ZA era observado em meio contendo sangue e os ZB e ZC em meios de cultura progressivamente menos rico em nutrientes e sem sangue. Barnabé & Tibayrenc (2004) tentaram reproduzir os resultados obtidos por Alves *et al.* (1993; 1994; 1996) com dois subclones da cepa Y pertencentes aos genótipos A e B, utilizando diferentes procedimentos de clonagem. Os autores não observaram mudanças nos padrões de isoenzimas e RAPD e atribuíram a discrepância dos resultados a diferenças entre os métodos de clonagem.

Os dados apresentados para a cepa Y nesse trabalho, confirmaram mais uma vez o caráter policlonal desta cepa. Esta característica já foi demonstrada por vários autores como Marques de Araújo & Chiari (1988) que isolaram três clones desta cepa YP1, YP2 e YP3. Esses clones foram estudados por Oliveira *et al.* (1998) que mostraram ser o Clone YP3 pertencente ao rDNA do tipo 1/2, considerado híbrido, a cepa Y e os outros dois clones apresentaram rDNA do tipo 1 (*T. cruzi* II). Desta maneira, os resultados apresentados aqui demonstram que a cepa Y quando permanece em cães *Beagle*, por um período de tempo de 12 meses e 21 meses, pode alterar seu perfil isoenzimático de ZA para ZB ou ZC, sendo esta mudança acompanhada pela alteração nos perfis de RAPD e do gene mitCOII. Porém, o resultado da técnica de rDNA não foi concordante com esse resultado, onde foi observado o fragmento de 125pb correspondente a *T. cruzi* II.

Como observado por diversos autores, dependendo do método de isolamento e do manuseio utilizados em estudos de caracterização de cepas ou clones do *T. cruzi*, é possível obter mudanças tanto no fenótipo quanto no genótipo. Mudanças nos perfis de RAPD de clones pertencentes aos quatro genótipos principais (TIBAYRENC & AYALA, 1988), foram observadas por Toledo *et al.* (2001), após tratamento com Bz, tanto na fase aguda quanto crônica da infecção pelo *T. cruzi*. Os autores sugeriram que essas mudanças poderiam estar associadas às propriedades biológicas apresentadas pelos clones estudados. Desta maneira, nos genótipos 19 e 20 foi constatada a presença de clones considerados resistentes, parcialmente resistentes e sensíveis ao Bz e, no genótipo 20, apenas clones resistentes ao Bz. Os clones desses genótipos não mantiveram o padrão inicial após sofrerem pressão do quimioterápico e passaram a apresentar além de outros perfis, o perfil híbrido, que segundo McDaniel & Dvorak (1993), dependendo do tipo de pressão seletiva, as populações do parasito passam a apresentar perfil híbrido mais adaptado para sobreviver em condições adversas.

7.4.3. Cepa ABC

Outra cepa avaliada neste trabalho foi a ABC. Esta cepa foi escolhida por ter sido isolada de uma paciente que apresentava, além da forma cardíaca, a

forma digestiva. Na maioria dos parâmetros estudados esta cepa apresentou padrão intermediário entre as cepas Be-78 e Y. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram um caráter híbrido tanto para a cepa parental quanto para os respectivos isolados na maioria dos marcadores utilizados, exceto para o rDNA. Talvez pelo fato de ser esta cepa híbrida, foi a que apresentou maior homogeneidade entre a cepa parental e os respectivos isolados. Essa homogeneidade foi evidenciada principalmente pelo maior número de bandas compartilhadas, observadas pelo resultado da análise de compartilhamento de banda realizado pelo programa DNA POP.

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

A caracterização molecular das populações do *T. cruzi* avaliada nesse trabalho, mostrou por meio de quatro marcadores moleculares, que apenas duas populações isoladas de cães *Beagle* alteraram nos perfis de RAPD e isoenzima ao longo da infecção de cães. Entretanto, a técnica de RAPD foi mais sensível em detectar estas alterações, especialmente quando os iniciadores 3302 e λ gt-11R foram utilizados. Esses resultados apontam para a teoria de que cada hospedeiro possui a sua população de parasito, que provavelmente pode ser alterada ao longo da infecção, que poderia ser modulada por cada hospedeiro. Desta maneira, é razoável supor que se cada indivíduo (no caso o cão) pode estabelecer uma relação peculiar com a sua população de parasitos ao longo de uma infecção crônica, e que esta relação pode refletir em alterações genéticas desta população, seria difícil estabelecer uma correlação definitiva entre as características genéticas de uma população do *T. cruzi* e o seu comportamento biológico.

CONCLUSÕES

- 1- As manifestações clínicas observadas durante a fase aguda da infecção de cães *Beagle* com as cepas Be-78, Y ou ABC do *T. cruzi* foram semelhantes às observadas em humanos, confirmando a importância deste animal como modelo experimental na doença de Chagas.
- 2- A sensibilidade das técnicas parasitológicas (ESF, Hc e PCR) foi dependente da cepa do *T. cruzi*.
- 3- A elevada frequência de hemocultura positiva entre os animais inoculados com as cepas Be-78 ou ABC, quando comparada com a baixa frequência de positividade dos inoculados com a cepa Y, provavelmente reflete diferenças na constituição genética das populações do *T. cruzi* estudadas.
- 4- Os resultados da PCR específica no sangue dos animais avaliados demonstram a persistência do *T. cruzi* no sangue periférico ao longo da fase crônica e também o caráter mais sensível dessa técnica em relação à hemocultura.
- 5- A técnica de imuno-histoquímica não foi sensível em detectar antígenos e/ou parasitos durante a fase crônica da infecção de cães pelo *T. cruzi*.
- 6- A PCR realizada no tecido cardíaco foi mais sensível em detectar o kDNA do *T. cruzi* em relação às técnicas realizadas no sangue (Hc e PCR), independente da cepa do parasito.
- 7- A correlação entre os níveis de parasitemia e a frequência de kDNA do parasito nos fragmentos cardíacos foi dependente da cepa do parasito.
8. Durante a fase aguda da infecção não foi observada correlação entre a intensidade e o padrão da inflamação com a presença do parasito. Mas o padrão de resposta inflamatória foi correlacionado à cepa do parasito.

9- Durante a fase crônica, o padrão histopatológico das lesões cardíacas não foi relacionado com a presença do parasito (detectado pela PCR), mas foi relacionado com a população do *T. cruzi* presente no tecido.

10- O perfil de isoenzima da cepa Y pode ser alterado durante a fase crônica da infecção de cães, sendo esta mudança acompanhada pela alteração nos perfis de RAPD e para o gene mitocondrial COII.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAD, S. J.; ANDRADE, D. C. S.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.33(6), p.443-450, 1991.
- ALVES, A. M.; TANURI, A.; DE ALMEIDA, D. F.; VON KRUGER, W. M. Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, v.77(2), p.246-253, 1993.
- ALVES, A. M.; DE ALMEIDA, D. F.; VON KRUGER, W. M. Changes in *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA minicircles induced by environmental conditions and subcloning. *J. Eukaryot Microbiol.*, v.41(4), p.415-419, 1994.
- ALVES, A. M.; DE ALMEIDA, D. F.; VON KRUGER, W. M. Genomic variation in *Trypanosoma cruzi* clonal cultures. *Parasitol. Res.* v.82(5), p.410-415, 1996.
- ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol.*, v.100, p.269-275, 2002.
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev. Patol. Trop.*, v.3, p.65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G.; GRIMAUD, J. A.; STOCKER-GUERRET, S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.40 p.252-260, 1989.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, p.27-35, 1997.
- ANDRADE, Z. A. The canine model of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.79, p.77-85, 1984.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. A patologia da doença de Chagas experimental no cão. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.75, p.77-95, 1980.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M. Damage and healing in the conducting tissue of the heart (an experimental study in dogs infected with *Trypanosoma cruzi*). *J. Pathol.*, v.143(2), p.93-101, 1984.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M.; LIMA, J. A. C. Doença de Chagas experimental no cão. Relação morfológica e eletrocardiográfica na fase aguda da infecção. *Arq. Bras. Cardiologia*, v.35, p.485-500, 1980.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M.; MAGUIRE, J. H. Experimental Chagas' Disease in Dogs. A Pathologic and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.105, p.460-464, 1981.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M.; CÂMARA, E. J. N. Pathology of complete atrioventricular block in chronic Chagas' myocarditis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, p.7-13, 1988.

AÑEZ, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALES, N.; PERCOCO, E.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J. L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.60, p.726-732, 1999.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94(Supl. II), p.513-517, 1999.

ANSELMÍ, A.; GUERDIEL, O.; SUAREZ, J. A.; ANSELMÍ, G. Disturbance in the AV conduction system in Chagas' myocarditis in the dog. *Circ. Rev.*, v.20, p.56-64, 1967.

ANSELMÍ, A.; PIFANO, F. C.; SUAREZ, A.; DOMINGUEZ, A.; VAZQUEZ, A. O.; ANSELMÍ, G. Experimental *Schizotrypanum cruzi* myocarditis. Correlation between histopathologic and eletrocardiografic findings in experimental Chagas' heart disease. *Am. Heart. J.*, v.70(4), p.638-656, 1965.

ANSELMÍ, A.; PIFANO, F. C.; SUAREZ, J. A.; GURDIEL, O. Miocardiopathy in Chagas' disease. Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas myocarditis. *Am. Heart. J.*, v.72(4), p.469-481, 1966.

ARAÚJO, F. M.; BAHIA, M. T.; MAGALHÃES, N. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; TAFURI, W. L.; LANA, M. Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Trop.*, v.81, p.21-31, 2002.

AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S. M.; PENA, S. D. J.; MACHADO, C. R.; Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* *MSH2* gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics*, v.164, p.117-126, 2003.

AVILA, H. A.; GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. C.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplifiable minicircle variable region sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.42, p.175-188, 1990.

ÁVILA, H. A.; PEREIRA, J. B.; THIEMANN, O.; DE PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.2421-2426, 1993.

ÁVILA, H. A.; SIDMAN, D. S.; COHEN, L. M.; MILLIKAN, R. C.; SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.48, p.211-222, 1991.

AZOGUE, E.; LA FUENTE, C.; DARRAS, C. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.79(2), p.176-80, 1985.

BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CALIARI, M. V.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; COELHO, G. L.; LANA, M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.35, p.339-345, 2002.

BAMBIRRA, E. Trypanosomíase cruzi: A follow-up study of tissue reacting immunoglobulins in infected purebred *Pinscher* dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.17, p.205-208, 1984.

BARBOSA, A. J. A. Método imunocitoquímico para a identificação de amastigotas do *Trypanosoma cruzi* em cortes histológicos de rotina. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.27, p.293-297, 1985.

BARNABE, C.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: long-term sub-cultures in two different culture media do not confirm the existence of highly versatile multilocus genotypes. *Int. J. Parasitol.*, v.34(7), p.779-784, 2004.

BARRETTO, A. C. P.; MADY, C.; ARTEAGA-FERNANDEZ, E.; STOLF, N.; LOPES, E. A.; HIGUCHI, M. L.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am. Heart. J.*, v.111, p.307-312, 1986.

BELLOTTI, G.; BOCCHI, E. A.; HIGUCHI, M. L.; BARBERO-MARCIAL, M.; SOSA, E.; ESTESVES-FILHO, A.; KALIL, R.; WEISS, R.; JATENE, A.; PILEGGI, F. *In vivo* detection of antigens in heart of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am. Heart. J.*, v.131, p.301-307, 1996.

BEN ABDERRAZAK, S.; GUERRINI, F.; MATHIEU-DAUDÉ, F.; TRUC, P.; NEUBAUER, K.; LEWICKA, K.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Isozyme electrophoresis for parasite characterization. In: HYDE, J.E. (Ed.), *Methods in Molecular Biology, Protocols in Molecular Parasitology*, vol. 21. *Humana Press, Totowa, NJ*, p.361-382, 1993.

BITTENCOURT, A. L.; VIEIRA, G. O.; TAVARES, H. C.; MOTA, E.; MAGUIRE, J. Esophageal involvement in congenital Chagas' disease. Report of a case with megaesophagus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.33(1), p.30-33, 1984.

BOGLIOLO, A. R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W. C. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Trop.*, v.61, p.31-40, 1996.

BOGLIOLO, L. As causas anatômicas da insuficiência cardíaca na cardiopatia (miocardite) chagásica crônica, estudadas comparativamente com as causas anatômicas da insuficiência cardíaca noutras cardiopatias. Parte 11. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.29, p.479-483, 1976.

BORGES-PEREIRA, J.; COURA, J. R. Morbidade da doença de Chagas em populações urbanas do Sertão da Paraíba. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.20, p.101-107, 1987.

BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A. C.; SANTOS, L. C.; DE CASTRO, J. A.; DE ARAÚJO, I. B.; COURA, J. R. Xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. I. The sensitivity of *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans* *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.29(4), p.341-347, 1996.

BORGES-PEREIRA, J.; WILLCOX, H. P. F.; COURA, J. R. Morbidade da doença de Chagas. III – Estudo longitudinal de seis anos em Virgem da Lapa, MG, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.80, p.63-71, 1985.

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

BRENER, Z. Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO, Scientific Publication*, v.347, p.11-21, 1977.

BRENER, Z. Chagas disease and the nervous system. *PAHO Scientific Publ.*, v.547, p.30-46, 1994.

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

BRENER, Z. Immune response and immunopathology in *Trypanosoma cruzi* infection. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E., Rassi, A. *Chagas disease (Americam Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo ISBT BRAZIL SBHH*, p.31-47, 1992.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.82, p.205-212, 1987.

BRENER, Z. Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.79, p.149-155, 1984.

BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.63 (2), p.215 - 220, 1969.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma Cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.19, p.220-224, 1963.

BRISSE, S.; HENRIKSSON, J.; BARNABE, C.; DOUZERY, E. J.; BERKVEN, D.; SERRANO, M.; DE CARVALHO, M. R.; BUCK, G. A.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.*, v.2(3), p.173-183, 2003.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; WINCKER, P.; MOREL, C. M. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood sample and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.88, p.171-172, 1993.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; VANNI, C. M.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S. S.; OELEMANN, W.; SANTORO, A.; PIRMEZ, C.; MOREL, C. M.; WINCKER, P. Polymerase chain reaction for detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitol.*, v.110, p.241-247, 1995.

BRITTO, C.; SILVEIRA, C.; CARDOSO, M. A.; MARQUES, P.; LUQUETTI, A.; MACEDO, V. FERNANDES, O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodignosis and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, p.823-826, 2001.

CALIARI, M. V.; LANA, M.; OLIVEIRA, E. R.; BARBOSA, A. J.; TAFURI, W. L. Immunocytochemical study of tissue parasitism of dog adrenal glands in experimental Chagas' disease. *Parasite*. v.1(4), p.397-400, 1994.

CALIARI, M. V. Estudo histopatológico, imuno-histoquímico e morfométrico da miocardite chagásica aguda e crônica de cães experimentalmente infectados, 100f. Tese de Doutorado, - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 2001.

CALIARI, M. V.; DO PILAR MACHADO, R.; DE LANA, M.; CAJA, R. A.; CARNEIRO, C. M.; BAHIA, M. T.; DOS SANTOS, C. A.; MAGALHÃES, G. A.; SAMPAIO, I. B.; TAFURI, W. L. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.44, p.273-278, 2002.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I - Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.6, p.93-100, 1964.

CARNEIRO, M.; CHIARI, E.; GONÇALVES, A. M.; PEREIRA, A. A. S.; MOREL, C. M.; ROMANHA, A. J. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.*, v.47, p.35-45, 1990.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A. J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p.387-393, 1991.

CARRASCO, H. J.; FRAME, I. A.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.54, p.418-424, 1996.

CASTRO, A. M.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.*, v.99(4), p.379-383, 2006.

CASTRO, C.; PRATA, A.; MACÊDO, V. The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38(1), p.1-6, 2005

CASTRO, A. M.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; RASSI, G. G.; CHIARI, E.; GALVAO, L. M. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, v.88(10), p.894-900, 2002.

CASTRO, C.; ALVES, M. T.; MACÊDO, V. Influência da parasitemia no quadro clínico da doença Chagas. *Rev. Pat. Trop.*, v.9, p.73-136, 1980.

CASTRO, C.; ALVES, M. T.; MACÊDO, V. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.16, p.98-103, 1983.

- CASTRO, C.; MACÊDO, V.; PRATA, A. Comportamento da parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi* em chagásicos crônicos durante 13 anos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.32, p.157-165, 1999.
- CASTRO, M. A.; BRENER, Z. Estudo parasitológico e anatomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.18(4), p.223-229, 1985.
- CERISOLA, J. A.; ROHWEDDER, R.; SEGURA, E. L.; DEL PRADO, C. E.; ALVAREZ, M.; DE MARTINI, G. J. W. El xenodiagnostico. Ministério de Bienestar Social, Buenos Aires, Argentina, p.84. 1974.
- CHAGAS, C. Estado atual da tripanosomíase americana. *Rev. Biol. Hig.*, v.5, p.58-64, 1934.
- CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.3, p.219-275, 1911.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.1, p.159-218, 1909.
- CHIARAMONTE, M. G.; FRANK, F. M.; FURER, G. M.; TARANTO, N. J.; MARGNI, R. A.; MALCHIODI, E. L. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. *Acta Trop.*, v.72(3), p.295-308, 1999.
- CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M.; CHIARI, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.22, p.19-23, 1989.
- CHOCAIR, P. R.; AMATO NETO, V.; SABRAGA, E.; TORRECILLAS, H. Aspectos clínicos-epidemiológicos em pacientes submetidos a transplantes renais e imunodeprimidos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.17, p.8-15, 1984.
- COSSIO, P. M.; DIEZ, D.; SZARFMAN, A.; ARANA, R. M. Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gamma globin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, v.49, p.13-21, 1974.
- COURA, J. R.; ABREU, L. L.; DUBOIS, L. E. G.; CORREIA-LIMA, F.; ARRUDA, J. R. E.; WELLCOX, H. P. F., ANUNZIOTO, N.; PESTANA, W. Morbidade da doença de Chagas. II – Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.79, p.101-124, 1984.
- CRUZ, R. E.; MACEDO, A. M.; BARNABE, C.; FREITAS, J. M.; CHIARI, E.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; LANA, M. Further genetic characterization of the two *Trypanosoma cruzi* Berenice strains (Be-62 and Be-78) isolated from the first human case of Chagas disease (Chagas, 1909). *Acta Trop.*, v.97(3), p.239-246, 2006.

DEANE, M. P.; JANSEN, A. M.; MANGIA, R. H. R.; GONÇALVES, A. M.; MOREL, C. Are our laboratory strains representative samples of *Trypanosoma cruzi* populations that circulate in nature? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.72(Suppl.), p.19-24, 1984.

DIAS, J. C. P.; BRENER, Z. Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.79(Suppl.), p.139-147, 1984.

DIAS, J. C. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39(4), p.370-375, 2006.

DIAS, J. C. P. Epidemiology of Chagas Disease. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. E. Rassi, A. Chagas disease (Americam Trypanosomiaseis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo ISBT BRAZIL – SBHH, 13-19, 1992.

DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V.; GONZALES, A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.46, p.616-623, 1992.

DVORAK, J. A. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.* v.24, p.357-371, 1984.

ELIAS, F. E.; VIGLIANO, C. A.; LAGUENS, R. P.; LEVIN, M. J.; BEREK, C. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.68(2) p.242-247, 2003.

FERNANDES, C. D.; MURTA, S. M. F.; CERÁVOLO, I. P.; KRUG, L. P.; VIDIGAL, P. G.; STEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.92, p.343-351, 1997.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.58(6), p.807-811, 1998.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.81, p.755-759, 1987.

FRANCOLINO, S. S.; ANTUNES, A. F.; TALICE, R.; ROSA, R.; SELANIKIO, J.; REZENDE, J. M.; ROMANHA, A. J.; DIAS, J. C. P. New evidence of spontaneous cure in human Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, p.103-107, 2003.

FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONCALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.*, v.2(3) e 24, p.226-235, 2006.

FRÜHBECK, G.; GÓMES-AMBROSI, J.; MURUZÁBAL, F. J.; SURREI, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.280, p.E827-E847, 2001.

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol.*, v.19(1), p.19-22, 2003.

GODFREY, D. G. Biochemical strain characterization of trypanosomes. In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Pan American Health Organization, *Washington Res. Pub.*, v.318, p.91-97, 1976.

GOMES M. L.; GALVAO, L. M.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D.; CHIARI, E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.60(2), p.205-210, 1999.

GOMES, M. L.; ARAÚJO, S. M.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: growth of clones on solid medium using culture and blood forms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p.131-132, 1991.

GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J.; CHIARI, E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSP-PCR analysis. *Acta Trop.*, v.69, p.99-109, 1998a.

GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R.; PENA, S. D. J.; GALVÃO, L. M. C.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of Polymerase Chain Reaction for Detection in Human Blood. *Exp. Parasitol.*, v.88, p.28-33, 1998b.

GREENE, C.E. Clinical microbiology and infectious disease of the dog and cat. Ed. Greene, C. E., W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1984.

GUEDES, P. M. Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências/Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

GUEDES, P. M.; VELOSO, V. M.; CALIARI, M. V.; CARNEIRO, C. M.; SOUZA, S. M.; LANA, M.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T.; GALVAO, L. M. *Trypanosoma cruzi* high infectivity *in vitro* is related to cardiac lesions during long-term infection in *Beagle* dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.102(2), p.141-147, 2007.

GUEDES, P. M.; VELOSO, V. M.; TAFURI, W. L.; GALVÃO, L. M. C.; CARNEIRO, C. M.; LANA, M.; CHIARI, E.; SOARES, K. A.; BAHIA, M. T. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop.*, v.84(1), p.9-17, 2002.

HIGO, H.; YANAGI, T.; MATTA, V.; AGATSUMA, CRUZ-REYES, A.; UYEMA, N.; MONROY, C.; KANBARA, H.; TADA, I. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in american continents: special emphasis on sexual reproduction in Central Am. *Parasitol.*, v.121(4), p.403-408, 2000.

HIGUCHI, M. L. Chagas disease. Importance of the parasite in the pathogenesis of the cardiac chronic disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.64(3), p.251-254, 1995.

HIGUCHI, M. L.; BRITO, T.; REIS, M. M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A. C.; PILEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.*, v. 2, p.1 01-106, 1993a.

HIGUCHI, M. L.; GUTIERREZ, P. S.; AIELLO, V. D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic Chagas' disease myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, v.423, p.157-160, 1993b.

HIGUCHI, M. L.; REIS, M. M.; AIELLO, V. D.; BENVENUTI, L. A.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.56(5), p.485-489, 1997.

JONES, M. E.; COLLEY, D. E.; TOSTES, S.; LOPES, E. R.; VNENCAK-JONES, C. L.; MCCURLEY, T. L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.48, p.348-357, 1993.

JUNQUEIRA, C. V.; CHIARI, E.; WINCKER P. Comparasion of polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for diagnosis of Chagas`disease in a endemic region of north-eastern Brasil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.90, p.129-132, 1996.

- KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.12, p.210-223, 1999.
- KÖBERLE, F. Cardiopatia chagásica. *O hospital*. v.53(3), p.9-50, 1958.
- KÖBERLE, F. Patologia da moléstia de Chagas. Estudo dos órgãos musculares ocos. *Rev. Goiana Med.*, v.3, p.155-157, 1957.
- KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, v.6, p.63-116, 1968.
- KRAMER, A. W. JR. Experimental Chagas disease in purebred *Beagle* dogs acutely infected with *Trypanosoma cruzi* (B strain). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v.14(5), p.291-300, 1972.
- LAGES-SILVA, E. *Caracterização do Trypanosoma cruzi nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com ênfase no megaesôfago e na reativação*. 2001. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências/Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L. E.; SILVA-VERGARA, M. L.; CHIARI, E. Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Infect. Dis.*, v.34(1), p.118-123, 2002.
- LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L. E.; MACEDO, A. M.; PENA, S. D.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65(5), p.435-441, 2001.
- LANA, M. *Caracterização do Trypanosoma cruzi, cepa Berenice, isolada da mesma paciente em diferentes períodos*. 1981. 91 f. Tese (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1981.
- LANA, M.; CHIARI, C. A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenece-78 de *Trypanosoma cruzi*, isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.81(3), p.247-253, 1986.
- LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L. Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.87(1), p.59-71, 1992.
- LANA, M.; TAFURI, W. L.; CALIARI, M. V.; BAMBIRRA, E. A.; CHIARI, C. A.; LEITE, V. H. R.; BARBOSA, A. J. A.; TOLEDO, M. J. O.; CHIARI, E. Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanosomíase cruzi experimental no cão. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.21, p.113-121, 1988.

- LAURIA-PIRES, L.; BOGLIOLO, A. R.; TEIXEIRA, A. R. L. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients II. Isozyme and RFLP characterizations. *Exp. Parasitol.* v.82, p.182-190, 1996.
- LAURIA-PIRES, L.; SANTANA, J. M., TAVARES, F. S.; TEIXEIRA, A. R. L. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and Clones Derived from Chagas Disease Patients: I - Behavioral Characterization *in vitro*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, p.187-192, 1997.
- LARANJA, F. S. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. *Rev. Bras. Med.*, v.10(7), p.482-491, 1953.
- LARANJA, F. S.; PELLEGRINO, J.; DIAS E. Experimental Chagas' disease. *Am. Heart J.*, v.4, p.646, 1949.
- LEON, J. S.; GODSEL, L. M.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas heart disease. *Infect. Immun.*, v.69, p.5643-5649, 2001.
- LUMB, G.; SKACKLETT, R. S.; DAWKINS, W. A. The cardiac conduction tissue and its blood supply in the dog. *Am. J. Path.*, v.35, p.467-487, 1959.
- LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnostico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Neto, M. (eds). 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p.344-478, 2000.
- LUZ, Z. M. P.; COUTINHO, M. G.; CANÇADO, J. R. & KRETTLI, A. U. Hemocultura: Técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.27, p.143-148, 1994.
- MACEDO, A. M.; MARTINS, M. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.55, p.147-154, 1992.
- MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today*, v.14, p.119-124, 1998.
- MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. J.; MURTA, S. M.; VITOR, R. W.; CAMILO, D. J. JR.; PINHEIRO, S. W.; LOPES, E. R.; ADAD, S. J.; ROMANHA, A. J.; PINTO DIAS, J. C. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65(6), p.958-965, 2001.
- MADY, C.; LANNI, B. M.; ARTEAGA, E.; MONTES, G. S.; CALDINI, E. G.; ANDRADE, G.; GIORGI, M. C. P.; SALDIVA, P. H. N. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. *Am. J. Cardiol.* v.84, p.354-356, 1999.

- MAGALHÃES, B. F.; FREIRE, A. S. O eletrocardiograma na doença de Chagas experimental. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.41(1), p.243-261, 1945.
- MARCON, G. E.; ANDRADE, P. D.; DE ALBUQUERQUE, D. M.; WANDERLEY, J. S.; DE ALMEIDA, E. A.; GUARIENTO, M. E.; COSTA, S. C. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v.43, p.39-43, 2002.
- MARCONDES, C. B.; PINTO DIAS, J. C.; GUEDES, L. A.; FERRAZ FILHO, A. N.; RODRIGUES, V. L. C. C.; MENDONÇA, D. D. Estudo epidemiológico de fontes de alimentação sanguínea dos triatomíneos da fazenda Aroeira (Catolé do Rocha, Paraíba) e circunvizinhanças. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.24, p.137-140, 1991.
- MARQUES DE ARAÚJO, S.; CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C₃H isogênicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.83, p.175-181, 1988.
- MARSDEN, P. D.; HAGSTROM, J. W. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in *Beagle* puppies. The effect of variations in the dose and source of infecting trypanosomes and the route of inoculation on the course of the infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.62(6), p.816-824. 1968.
- MATTEI, D. M.; GOLDENBERG, S.; MOREL, C.; AZEVEDO, H. P.; ROITMAN, I. Biochemical strain characterization of *Trypanosoma cruzi* by restriction endonuclease cleavage of kinetoplast-DNA. *Febs Letters*, v.74, p.264-268, 1977.
- MACDANIEL, J. P.; DVORAK, J. A. Identification, isolation and characterization of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.57, p.213-222, 1993.
- MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.*, v.64, p.475-482, 1978.
- MILES, M. A.; CIBULSKIS, R. E. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, v.4, p.94-97, 1986.
- MILES, M. A.; SOUZA, A.; PÓVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v.272, p.819-821, 1978.
- MILES, M. A.; TOYÉ, P. J.; OSWALD, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brasil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.71, p.217-225, 1977.

- MINTER-GOEDBLOED, E.; MINTER, D. M.; MARSHAL, T. F. C. Quantitative comparison between xenodiagnóstico and hemoculture in detection of *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) in experimental and natural chronic infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.72, p.217-225, 1978.
- MIROWSKI, M.; LAU, S. H; BOBB, G. A. Steiner C, Damato AN. Studies on left atrial automaticity in dogs. *Circ. Res.*, v.26(3), p.317-325, 1970.
- MORA, M. X. C. Avaliação de uma técnica modificada de Hemocultura para *T. cruzi*, na forma crônica da doença de Chagas em uma área endêmica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.29, p.515-516, 1996.
- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.77, p.6810-6814, 1980.
- MOREL, C.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.29, p.1070-1074, 1980.
- MOURÃO, O. G.; MELLO, O. C. Hemocultura para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.9, p.183-188, 1975.
- OKUMURA, M.; CORREA NETO, A. Produção experimental de “megas” em animais inoculados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Hosp. Clin.*, v.16, p.338-341, 1961.
- OLIVEIRA, R. P.; BROUDE, N. E.; MACEDO, A. M.; CANTOR, C. R.; SMITH, C. L.; PENA, S. D. J. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with microsatélites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.3776-3780, 1998.
- OLIVEIRA, R. P.; MELO, A. I. R.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: Expanded analyses of 54 strains using eight polymorphic microsatélites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94, p.65-70, 1999.
- ORTIZ-ORTIZ, L.; ORTEGA, T.; CAPIN, R.; MARTINEZ, T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol.*, v.50, p.232-242, 1976.
- PALACIOS-PRU, E.; CARRASCO, H.; SCORZA, C.; ESPINOZA, R. Ultrastructural characteristics of different stages of human chagasic myocarditis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.41(1), p.29-40, 1989.
- PELLEGRINO, J. O eletrocardiograma na doença de Chagas experimental no cão. *Brasil Médico* v.41(33), p.9-11, 1947.

- PENA, S. D. J.; BARRETO, G.; VAGO, A. R.; DE MARCO, L.; REINACH, F. C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.91, p.1946-1949, 1994.
- PENA, S. D. J.; NUNES, A. DNA-POP and PATER two simple computer programs for population studies and paternity analyses with DNA fingerprintings. *Fingerprintings news*, v. 2, p. 7-8, 1990.
- PORTELA-LINDOSO, A. A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev. Saúde Pública*, v.37(1), p.107-115, 2003.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.*, v.1, p.92-100, 2001.
- REIS, M. M.; HIGUCHI, M. L.; BENVENUTI, L. A.; AIELLO, V. D.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v.83(2), p.165-172, 1997.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R.; HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi*: Immunological consequences of parasite modification of cells. *Clin. Exp. Immunol.*, v.40, p.36-41, 1980.
- ROMANHA, A. J. *Heterogeneidade enzimática em Trypanosoma cruzi*. 110 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.
- ROMANHA, A. J.; PEREIRA, A. A. S.; CHIARI, E.; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp. Biochem. Physiol.* v.62, p.139-142, 1979.
- ROSSI, M. A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *Int. J. Cardiol.*, v.66, p.183-194, 1998.
- ROSSI, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol.*, v.30, p.335-340, 1991.
- ROSSI, M. A.; BESTETTI, R. B. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology* v.86, p.1-7, 1995.

- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M. C.; MINOPRIO, P.; HONTEYBERIE-JOSKOWICZ, M. The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. *Immunol. Lett.*, v.49(3), p.163-168, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: Laboratory Manual. 2^a ed New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Book 01, 1989.
- SANCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C.; CARRASCO, A. E.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; DE ISOLA, E. D.; STOPPANI, A. O. Rapid evolution of kinetoplast DNA mini-circle subpopulations in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.11, p.169-178, 1984.
- SANTOS, F. R.; PENA, S .D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, v.90, p.655-656, 1993.
- SCHENONE, H.; ROJO, M.; ROJAS, A.; CONCHA, L. Positividad diurnal y nocturna del xenodiagnóstico en un paciente com infección chagásica crónica de paratemia permanente. *Bol. Chil. Parasitol.*, v.32, p.63-66, 1977.
- SCHMUÑIS, G. Autoimmunity in Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.82(Suppl.), p.287-310, 1987.
- SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, v.20, p.191-203, 1953.
- SIMPSON, L. The Kinetoplast of hemoflagellates. *Int. Rev. Cytol.* v.32, p.139-207, 1972.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. Statistical methods ed.Yowa State University press. 8^a edição. *Ames Yowa*. 1989.
- SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.83, p.141-152, 1996.
- SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribossomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.62, p.45-52, 1993.
- STEINDEL, M.; DIAS-NETO, E.; MENEZES, C. L. P.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, A. J. G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.60, p.71-80, 1993.
- STUART, K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.9, p.93-104, 1983.

- STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, v.33(3), p.269-279, 2003.
- STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.33, p.205-214, 1989.
- TAFURI, W. L. Immunopathology of Chagas disease - a historical overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94, p.247-248, 1999.
- TAFURI, W. L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.29, p.194-199, 1987.
- TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.5(4), p.400-419, 1992.
- TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aethiology of Chagas' disease. *Int. J. Parasitol.*, v.31, p.550-554, 2001.
- TARLETON, R. L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.*, v.62, p.1820-1829, 1994.
- TEIXEIRA, A. R.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V.; PRATA, A. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated 51CR release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.27(6), p.1097-1107, 1978.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes and Infection*. v.1, p.465-472, 1999.
- TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid. Biol. Dis.*, v.28, p.2-12, 2003.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, v.42, p.277-292, 1988.
- TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C.; GUERRINI, F.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D.; AYALA, F. J. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90, p.1335-1339, 1993.
- TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.83, p.15-119, 1986.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.*, v.18, p.405-410, 2002.

TOLEDO, M. J. O. Comportamento biológico em camundongos de clones de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a diferentes genótipos. 162 f., Tese (doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

TOLEDO, M. J.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TIBAYRENC, M.; BARNABE, C.; TAFURI, W. L.; DE LANA, M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.47(1), p.223-230, 2003.

TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M. T.; VAN, M. E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN-gama is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.*, v.146, p.3626-3632, 1991.

TOYÉ, P. J. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.68, p.147, 1974.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; REIS, D. A.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES, S.; MOREIRA, M. C. V.; FILHO, G. B.; PENA, S. D. J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Am. J. Pathol.*, v.156, p.1805-1809, 2000.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, v.348, p.891-892, 1996a.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; ANDRADE, L. O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; SIMPSON, A. J. G.; TOSTES, S.; PENA, S. D. J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.*, v.149, p.2153-2159, 1996b.

VAN DE PEER, Y.; DE WACHTER, R. TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows Environment. *Compt. Applic. Biosci.*, v.10, p.569-570, 1994.

VELOSO, V. M. Análise da variabilidade de populações do *Trypanosoma cruzi* isoladas de cães após 2 A 17 anos de infecção. 124 f. Dissertação de Mestrado – NUPEB, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2000.

VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; TOLEDO, M. J. O.; LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T. Variation in susceptibility to benzimidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* original strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96(7), p.1005-1011, 2001.

VELOSO, V. M.; ROMANHA, A. J.; LANA, M.; MURTA, S.M.F.; CARNEIRO C.M.; ALVES, C. F.; BORGES, E. C.; TAFURI, W. L.; MACHADO COELHO, G. L. L.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol. Res.*, v.96, p.383-389, 2005.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.3(7), p.1005-1011, 1911.

WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *Genomics*. v.22, p.7-60, 2006.

WHO – World Health Organization. Report of the scientific working group on the development and evaluation of animal models for Chagas’ disease. *Geneva* 1984.

WILLIAM, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, v.18, p.6531-6535, 1990.

WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J.B.; CARDOSO, M.A.; OELEMANN, W.; MOREL, C.M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.51 (6), p.771-777, 1994.

ZELEDÓN, R.; DIAS, J. C. P.; BRILLA-SALAZAR, A.; REZENDE, J. M.; VARGAS, L. G.; URBINA, A. Does a spontaneous cure for Chagas’ disease exist? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21(1), p.15-20, 1988.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int. J. Parasitol.* v.28(1), p.105-112, 1998.